

Evaluación farmacognóstica de extractos de hojas secas de *Moringa oleifera* Lam. del ecotipo *criolla* cultivada en Cuba

Pharmacogenetic evolution of dry leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. of the native ecotype grown in Cuba

Ernesto Almora Hernández^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1431-7004>

Vivian Lago Abascal¹ <https://orcid.org/0000-0002-3229-1872>

Raisa Monteagudo Borges¹ <https://orcid.org/0000-0002-4926-8783>

Olga Echemendía Arana¹ <https://orcid.org/0000-0002-2916-1524>

Kethia González García² <https://orcid.org/0000-0003-1485-9249>

Yasnay Hernández Rivero² <https://orcid.org/0000-0001-7013-9540>

Efraín Rodríguez Jiménez¹ <https://orcid.org/0000-0002-8315-4413>

¹Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Productos Bionaturales. La Habana, Cuba.

²Instituto de Ciencias del Mar. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: ealmora@bionaturasm.cu

RESUMEN

Introducción: En los últimos años se ha incrementado vertiginosamente las investigaciones sobre *Moringa oleifera*. Esta planta es conocida en Cuba como tilo blanco o palo blanco, y su cultivo se ha extendido a todo lo largo y ancho del país.

Objetivo: Describir la composición química y la actividad antimicrobiana de los fitocompuestos de *Moringa oleifera*.

Métodos: Se realizó el tamizaje fitoquímico con solventes de diferentes polaridades. El contenido de polifenoles se determinó según el método Folin-Ciocalteu y para el de flavonoides se utilizó el cloruro de aluminio. Los extractos se enfrentaron a cepas de referencias y asilamientos clínicos por el método de microdilución.

Resultados: En el tamizaje se visualizó una alta reacción para triterpenos/esteroides, azúcares reductores, fenoles/taninos, flavonoides, aminoácidos, alcaloides, aceites y

grasas. Se identificó la isoquercetina como principio activo. Los extractos mostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras. Los extractos hidroalcohólicos presentaron polifenoles a una concentración que varió entre 45,08 y 71,23 mg EAG/g de material seco y la concentración de flavonoides entre 47,96 y 80,91 mg EQ/g de material seco.

Conclusiones: Los extractos obtenidos mostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas evaluadas. Se identificó la isoquercetina como el compuesto mayoritario en el extracto hidroalcohólico al 70 % (v/v).

Palabras claves: *Moringa oleifera*; polifenoles totales; flavonoides; actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Introduction: Research about *Moringa oleifera* has increased dramatically in recent years. This plant species is known in Cuba as “tilo blanco” or “palo blanco” and its cultivation has extended across the entire country.

Objective: To describe the chemical composition and antimicrobial activity of the phytochemicals of *Moringa oleifera*.

Methods: Phytochemical screening was conducted with solvents of varying polarity. Polyphenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method, whereas aluminum chloride was used to determine flavonoid content. The extracts were tested against reference strains and clinical isolates by the microdilution method.

Results: Screening revealed a high reaction for triterpenes / steroids, reducing sugars, phenols / tannins, flavonoids, amino acids, alkaloids, oils and fats. Isoquercetin was identified as the active principle. The extracts displayed antimicrobial activity against strains of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and yeasts. The hydroalcoholic extracts were found to contain polyphenols at a concentration ranging from 45.08 to 71.23 mg EAG/g of dry material, and flavonoids at a concentration ranging between 47.96 and 80.91 mg EQ/g of dry material.

Conclusions: The extracts obtained displayed antimicrobial activity against the strains evaluated. Isoquercetin was identified as the most abundant compound in the 70% hydroalcoholic extract (v/v).

Keywords: *Moringa oleifera*; total polyphenols; flavonoids; antimicrobial activity.

Recibido: 16/04/2021

Aceptado: 04/01/2022

Introducción

Moringa oleifera Lam. es una planta que pertenece al género *Moringa* de la familia Moringaceae. Este género está constituido por 13 especies, de las que *Moringa oleifera* es la más diseminada, presente en climas tropicales y subtropicales.⁽¹⁾ Posee diferentes ecotipos entre los que se encuentran Supergenius, Plain y Criolla, los cuales se cultivan bajo las condiciones climatológicas específicas de cada país. En Cuba esta planta es conocida como “tilo blanco” o “palo blanco” y se distribuye a lo largo del territorio nacional.

La población la reconoce por las propiedades nutritivas y medicinales que posee. Es un árbol rico en vitaminas, minerales, pigmentos, polifenoles y flavonoides, y posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucemiantes, hipolipemiantes, estimulantes cardíacos y circulatorios, antihipertensivos y antimicrobianos.⁽²⁾ Debido a estas propiedades y su actividad biológica se considera una de las plantas medicinales más estudiada. Sus órganos (hojas, ramas, flores y frutos) contienen principios activos y sustancias inactivas que influyen en la acción de los componentes activos.

La actividad antimicrobiana posee un gran interés porque en el contexto actual de la resistencia antimicrobiana (RAM), es uno de los grandes retos que afronta el desarrollo de los fármacos. Los mecanismos evolutivos y de adaptación generan cepas patógenas con resistencia múltiple a un amplio rango de los antibióticos disponibles.⁽³⁾ *Moringa oleifera* posee compuestos fenólicos que desempeñan un papel importante en la actividad antimicrobiana y manifiestan su actividad biológica a través de interacciones en las membranas celulares.⁽⁴⁾

Teniendo en cuenta los aspectos antes expuestos y la necesidad de aprovechar las potencialidades de *Moringa oleifera*, el objetivo del presente trabajo consistió en describir la composición química y la actividad antimicrobiana de fitocompuestos de moringa, para lo que se evaluaron los extractos hidroalcohólicos de hojas secas del ecotipo Criolla de *Moringa oleifera* Lam. cultivada en Cuba.

Métodos

Material vegetal

El material vegetal que se utilizó correspondió a hojas secas de *Moringa oleifera* Lam. del ecotipo Criolla, cosechada en el mes de junio del año 2018 en la Unidad Productiva Finca “Futuro Lechero”, municipio Playa, perteneciente al Centro de Investigación de Plantas Proteicas y Productos Bionaturales. La recolección se realizó de forma manual, en condiciones asépticas. Las hojas se colocaron en cajas plásticas situadas sobre mantas en la tierra y se transportaron en un vehículo cerrado. Las hojas se despalillaron, se lavaron con agua potable de forma mecanizada y se colocaron en bandejas de acero inoxidable. El proceso de secado se realizó en hornos CONAS, con tiro de aire continuo a una temperatura menor de 45 °C hasta alcanzar un valor de humedad menor de 12 %.

La identificación botánica de la planta corresponde a la especie *Moringa oleifera* Lam. 1783, perteneciente al género *Moringa*, familia Moringaceae, orden Brassicales, superorden Rosanae, grupo monofilético Eudicotiledóneas, del reino Plantae. La semilla básica, procedente por donación de la India, se encuentra conservada en el Banco Nacional de Germoplasmas de la Unidad Básica Productiva “El Pitirre”, Los Palacios, Pinar del Río, perteneciente al Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Productos Bionaturales.

Determinación cualitativa de metabolitos en el material vegetal

El tamizaje fitoquímico se realizó mediante el método propuesto por Miranda y Cuéllar que consistió en la preparación de 3 extractos con solventes de diferente polaridad. Luego de la preparación de los extractos se realizaron los ensayos para determinar la presencia de los metabolitos de interés por la aparición o no de color, o precipitados.⁽⁵⁾

Obtención y caracterización cualitativa del extracto hidroalcohólico

A partir de las hojas secas de *Moringa oleifera* se prepararon los extractos hidroalcohólicos al 30, al 50 y al 70 % (v/v) de etanol. La extracción se realizó por el método de maceración a una proporción de 1/10 durante 6 días a temperatura entre 25 y 28 °C. Se realizó el cambio del solvente al 3er. día.⁽⁵⁾

Determinación del contenido de polifenoles totales

Se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Farmacopea Británica con el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. La concentración de polifenoles se detectó mediante

la formación de sales de tungsteno y molibdeno, donde se utilizó el ácido gálico (Merck) como patrón. La curva patrón se preparó a una concentración de 0,5 mg/mL, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 0,005 mg/mL y 0,050 mg/mL. Se tomaron 96 µL de cada concentración de los extractos, se mezclaron con 480 µL de agua destilada, 48 µL del reactivo ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin-Ciocalteu) y 576 µL de Na₂CO₃ 29 % (p/v). Se utilizó como blanco agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente, durante 30 minutos, protegida de la luz y se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV160-A). Los ensayos se realizaron por triplicado. El resultado se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco (mg EAG/g).⁽⁶⁾

Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides se determinó por el método modificado por *Woisky*.⁽⁷⁾ Se empleó como patrón de referencia la quercetina, a razón de 10 mg disueltos en etanol al 80 % (v/v) para preparar concentraciones de 0,025 mg/mL y 0,100 mg/mL. Se tomó 0,5 mL de cada muestra y se trató con 1,5 mL de etanol 95 % (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio (10 % p/v), 0,1 mL de acetato de potasio (1 Molar) y 2,8 mL de agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 415 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV160-A). El contenido de flavonoides totales se expresó como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/g). El ensayo se realizó por triplicado.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Determinación de la concentración mínima letal (CML)

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de microdilución, según el Comité Nacional de Laboratorio Clínico Estándar (NCCLS, por sus siglas en inglés).⁽⁸⁾ Las cepas utilizadas fueron de referencia de bacterias y levaduras: *Vibrio cholerae* (ATCC 7258), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* Thyphi (ATCC 9992). Fueron recomendadas por el NCCLS para el estudio de sensibilidad antimicrobiana y los microorganismos *Staphylococcus aureus* (3 cepas), *Acinetobacter iwoffii* (2 cepas), *Enterobacter agglomerans* (1 cepa), *Pseudomonas aeruginosa* (1 cepa),

Escherichia coli (2 cepas), aislados a partir de muestras clínicas del Hospital Pediátrico “Juan Márquez”, La Habana.

Se prepararon inóculos de las cepas microbianas analizadas ajustados a 0,5 de la escala de Mc. Farland, a partir de crecimiento bacteriano en placas con Agar Triptona Soja (Merck) y de levaduras en medio Sabouraud (BIOCEN, Cuba). Se incubaron a 37 °C, durante 18-24 h. Posteriormente, se prepararon diluciones dobles del extracto, desde 100 mg/mL hasta 0,78 mg/mL y se determinó la CML como la concentración más baja del extracto que fue capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo correspondiente. Se empleó como control negativo la incubación con solución de etanol al 70 % (v/v).

Identificación de isoquercetina por cromatografía de capa fina (CCF)

La presencia de isoquercetina en el extracto se realizó por CCF pre elaboradas de sílica gel 60, F 254.⁽⁹⁾ Se utilizó como patrón isoquercetina a una concentración de 1 mg/mL, en metanol. La aplicación del extracto se efectuó mediante capilares y se realizaron corridas en las que se utilizó indistintamente como fase móvil la mezcla de los solventes acetato de etilo, agua destilada, ácido fórmico (8:0.5:0.5) o acetato de etilo, metanol, agua destilada y ácido fórmico (30:2:1:1). Las placas se sometieron a tinción con cloruro férrico (FeCl₃) 5 % (v/v) en etanol 5 % (v/v) como agente cromogénico y se incubaron a 105 °C por 5 min para la detección de las bandas correspondientes. Se visualizaron con luz UV a las longitudes de onda de 254 y 365 nm.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se emplearon las medias y las desviaciones estándar como medidas descriptivas de la tendencia central y dispersión de datos, respectivamente. Previo al procesamiento se evaluó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y el test de Bartlett, respectivamente. La comparación entre grupos se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA). Las medias se compararon a través de la prueba de Duncan. Por otro lado, las correlaciones entre los componentes mayoritarios y la CML se analizaron mediante cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos se efectuaron mediante el paquete estadístico SPSS 10.0.1.

Resultados

El estudio químico detallado del material vegetal se inició con el conocimiento cualitativo de los metabolitos secundarios o grupos de compuestos presentes. Como muestra la tabla 1, el tamizaje realizado del ecotipo Criolla de *Moringa oleifera* Lam. visualizó una alta reacción para los aceites y grasas, triterpenos/esteroides y alcaloides para el reactivo de Wagner. En la fracción etanólica se observó una reacción positiva a triterpenos/esteroides, azúcares reductores, fenoles/taninos, flavonoides, aminoácidos y alcaloides con el reactivo de Wagner. Se mostró una reacción media a catequinas. En la fase acuosa se encontró una alta reacción a fenoles y taninos, flavonoides y azúcares reductores y una débil reacción a alcaloides con el reactivo de Dragendoff.

Tabla 1 - Análisis fitoquímico de *M. oleifera* del ecotipo Criolla

Metabolitos ensayados	Extractos		
	Etéreo	Etanólico	Acuoso
Aceites y grasas	+++	NR	NR
Alcaloides	+++	+++	+
Lactonas y coumarinas	-	-	NR
Triterpenos y/o esteroides	+++	+++	NR
Catequinas	NR	++	NR
Azúcares reductores	NR	+++	+++
Fenoles y taninos	NR	+++	+++
Flavonoides	NR	+++	+++
Aminoácidos	NR	+++	NR
Quinonas	NR	-	NR
Glicósidos cardiotónico	NR	-	NR
Antocianidina	NR	-	NR
Esteroles	-	NR	NR
Resinas	NR	-	NR
Saponinas	NR	-	-

NR: no se realiza; +: poco; ++: presencia; +++: abundancia; -: no presencia.

La extracción hidroalcohólica al 70 % (v/v) presentó una concentración de polifenoles significativamente mayor (71,23 mg EAG/g), mientras que el menor valor se mostró en el extracto hidroalcohólico 30 % (v/v) con 45,08 mg EAG/g. Se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medias de las concentraciones de polifenoles de cada extracto analizado (Tabla 2).

Tabla 2 - Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos hidroalcohólicos a partir de hojas secas de *Moringa oleifera* del ecotipo Criolla

Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g)			Concentración de flavonoides totales (mg EQ/g de material seco)		
30 % (v/v)	50 % (v/v)	70 % (v/v)	30 % (v/v)	50 % (v/v)	70 % (v/v)
45,08±1,64 c	49,66±0,06 b	71,23±0,38 a	47,96±1,10 b	48,64±0,97 b	80,91±1,64 a

a, b y c: diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentos de etanol por el test de Bartlett.

El contenido de flavonoides mostró resultados similares a los obtenidos en la cuantificación de polifenoles. La extracción hidroalcohólica al 70 % (v/v) presentó una concentración de flavonoides significativamente mayor (80,91 mg EQ/g) con respecto a las obtenidas en los otros extractos. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las medias de las concentraciones de flavonoides de los extractos al 30 y el 50 % (v/v).

Se realizó un análisis estadístico de correlación entre el contenido de polifenoles y flavonoides presentes en los extractos hidroalcohólicos. Este análisis demostró que existe una correlación positiva y altamente significativa entre las concentraciones de estos dos grupos de metabolitos secundarios ($r = 0,995$).

En la tabla 3 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos estudiados. Se encontró diferencias significativas entre los grupos de extractos hidroalcohólicos ($p < 0,05$). La mayor actividad antimicrobiana correspondió al extracto hidroalcohólico al 70 % (v/v), el cual afectó el crecimiento de las 15 cepas evaluadas y alcanzó los mejores valores de CML (3,13 mg/g material seco) frente a las de cepas de *Vibrio cholerae* (ATTC7258), *Salmonella enterica* Typhi (ATCC9992), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) y *Acinetobacter iwoffii*, en comparación con el control negativo.

La evaluación general arrojó que todos los extractos hidroalcohólicos presentaron actividad antimicrobiana y se resaltó el efecto de los extractos al 70 % (v/v) por mostrar mayor inhibición.

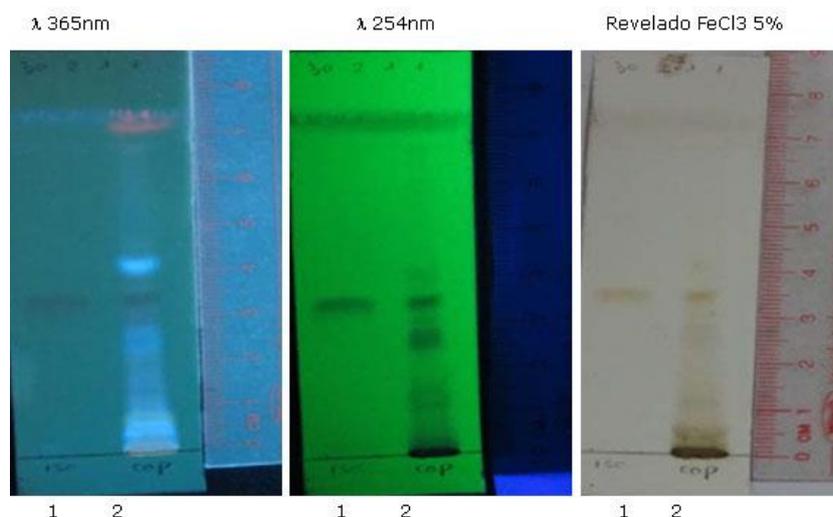
Tabla 3 - Actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos a partir de hojas secas de *M. oleifera* del ecotipo Criolla

Microorganismos	CML (mg/mL)		
	30 % (v/v)	50 % (v/v)	70 % (v/v)
<i>Vibrio cholerae</i> (ATCC 7258)	10 c	7,7 b	3,13 a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	N	N	12,55
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	N	N	12,55

<i>Salmonella enterica</i> Typhi (ATCC 9992)	N	5,90 b	3,13 a
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	10	5,90 b	3,13 a
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	N	5,90 b	3,13 a
<i>Staphylococcus aureus</i> (19)	10 c	5,90 b	3,13 a
<i>Staphylococcus aureus</i> (21)	10 c	7,7 b	3,13 a
<i>Staphylococcus aureus</i> (23)	5 b	7,7 bc	3,13 a
<i>Acinetobacter iwoffii</i> (2)	10 c	7,7 b	3,13 a
<i>Acinetobacter iwoffii</i> (5)	10	N	12,55
<i>Enterobacter agglomerans</i> (20)	N	N	12,55
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (5/022)	N	30,8 b	12,55 a
<i>Escherichia coli</i> (18)	N	30,8 b	12,55 a
<i>Escherichia coli</i> (261)	N	30,8 b	12,55 a

N: crecimiento normal; a, b y c: diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones para la ecotipo Criolla por el test de Bartlett. La numeración que aparece entre paréntesis junto a las especies microbianas corresponde en unos al código en la Colección Americana de Cultivos Tipos (ATCC) y en otros al código asignado durante el aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas del Hospital Pediátrico "Juan M. Márquez".

El análisis cualitativo que se le realizó a los extractos hidroalcohólicos al 70 % (v/v) mostró resultados colorimétricos positivos para la presencia de grupos fenólicos. Este procedimiento de la extracción al 70 % (v/v) mostró ser positivo para la presencia de grupos fenólicos característicos de los flavonoides. En la corrida cromatográfica (Fig. 1) se observaron bandas auténticas de isoquercetina a diferentes longitudes de ondas λ (365 y 254 nm) y con valores Rf (distancia recorrida por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa) de 3,4 cm.



1: patrón de isoquercetina; 2: extracto hidroalcohólico 70 % (v/v) revelado con FeCl₃ 5 % (p/v)/etanol.

Fig. 1 - Presencia de isoquercetina a λ (365-254 nm) en el extracto hidroalcohólico 70 % (v/v) por TLC.

Discusión

Ensayos fitoquímicos realizados por *Guaycha* y otros (2017)⁽¹⁰⁾ y *Campo* y otros (2020)⁽¹¹⁾ a las hojas secas de *Moringa oleifera* evidenciaron la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, saponinas y azúcares reductores. Los resultados observados en el presente estudio para el ensayo de alcaloides sugieren la presencia de este metabolito en las tres fases. Sin embargo, *Torres*⁽¹²⁾ en otros estudios no evidenció la presencia de taninos. Por otra parte, investigaciones desarrolladas por *Linares*⁽¹³⁾ no reportaron la presencia de saponinas y coumarinas en esta especie, ni la presencia de glicósidos cardiotónicos y quinonas.

Estos compuestos (saponinas, coumarinas, glicósidos cardiotónicos y quinonas) ocasionan trastornos nutricionales cuando están presentes en niveles elevados en el material vegetal debido a que los mecanismos de detoxificación no pueden eliminar los metabolitos intermedios derivados de estos grupos moleculares.

Según *Campo* y otros⁽¹¹⁾ y *Linares*,⁽¹³⁾ al realizar una comparación de la cantidad de compuestos fenólicos que podrían ser extraídos de las hojas de *Moringa oleifera*, utilizando diferentes métodos de extracción y etanol como disolvente, pudieron apreciar una concentración de compuestos fenólicos de 21,27 y 24,86 mg EAG/g, respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en el presente estudio (tabla 2).

Si bien es cierto que tanto los alcoholes de bajo peso molecular, como las mezclas hidroalcohólicas, logran extraer mayor cantidad de compuestos fenólicos, el objetivo en este trabajo se enfocó en la extracción en un medio hidroalcohólico. La concentración de polifenoles encontrados en las extracciones etanólicas realizadas en este trabajo concordaron con los resultados obtenidos por *Siddhuraju y otros* (2003)⁽¹⁴⁾ y *González y otros* (2020),⁽¹⁵⁾ quienes plantearon que las mezclas hidroalcohólicas son frecuentemente empleadas para la extracción de polifenoles totales en *Moringa oleifera*, por ser eficaces para extraer una elevada concentración de este compuesto fenólico.

Además, es necesario adicionar agua al solvente entre 30 y 40 % (v/v) para favorecer la extracción, ya que los compuestos fenólicos están presentes en el reino vegetal y son comunes en las hojas y otras partes de la planta. Según la literatura, en los extractos de la especie *M. oleifera* referidos por varios autores, los compuestos fenólicos de mayor relevancia son el ácido caféico, el ácido cumárico, la rutina, el ácido gálico, el ácido elágico y el ácido clorogénico.^(16,17,18)

Madera⁽¹⁹⁾ publicó que los contenidos de fenoles totales en los extractos acuosos mostraron valores entre 16,19 y 18,83 mg/g para los tiempos de extracción de 10 a 30 minutos. Los valores obtenidos coincidieron con los rangos reportados por *Guzmán*,⁽²⁰⁾ que señalaron una concentración de fenoles totales de 29-47 mg/g. *Chumark*⁽²¹⁾ informó valores de 10 mg/mL de fenoles totales en extracto acuoso de hojas de moringa, inferior a los valores obtenidos en la presente investigación.

Es necesario indicar que el uso de solventes puede mejorar la extracción de compuestos fenólicos en los extractos de esta especie. Existen reportes en extractos de hojas de *Moringa oleifera* con acetona de una concentración de fenoles totales igual a 120,33±0,76 mg/g.⁽²²⁾ La concentración de fenoles superior fue debido a la diferencia de polaridades de los solventes usados para la extracción.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo tienen similitud a los obtenidos por otros autores con respecto a la elevada concentración de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos en las hojas en moringa. Son los mayores compuestos bioactivos de esta planta, con valores informados por *Moyo y otros*⁽²²⁾ y *Campo y otros*⁽¹¹⁾ de 45,1 mg QE/g y 37,60 mg QE/g, respectivamente. Según lo mencionado por otros autores, en la especie *M. oleifera* se han identificado los flavonoides miricetina, quercetina, kaempferol, isoramnetina y rutina.^(16,23)

Munevar⁽⁴⁾ señaló que los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en vegetales y como tienen una función importante como antifúngico y bactericida se ubican principalmente hacia el exterior de las plantas y las hojas.

En la presente investigación se encontró diferencias significativas entre los grupos de extractos hidroalcohólicos ($p < 0,05$). Esta diferencia significativa se debió a la elevada concentración de metabolitos presentes en los extractos hidroalcohólico que inhibieron el crecimiento bacteriano. Estos compuestos fenólicos actúan en la inhibición de enzimas por los compuestos oxidados posiblemente mediante reacciones del grupo sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas.⁽²⁴⁾

La actividad biológica de los extractos hidroalcohólicos de las hojas secas de este ecotipo inhibió el crecimiento de las cepas de *S. aureus*. Estos resultados son análogos a los informados por varios autores que plantearon que extractos de moringa presentaron efecto bactericida frente a *S. aureus*.^(4,24,25) Además, *Abubakar*⁽²⁶⁾ determinó la actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, lo que sugiere que podría ser un medicamento antibacteriano valioso en el

tratamiento de infecciones causadas por los organismos del ensayo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio donde se demostró la actividad de los extractos contra estas cepas.

Otros autores demostraron que los extractos de hojas de moringa presentaron actividad antimicrobiana frente a las cepas de enterobacterias (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y *Staphylococcus aureus*.^(27,28) Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación.

Correa⁽²⁹⁾ en la evaluación del efecto antimicrobiano de extractos hidroalcohólicos al 50 y al 75 % (v/v) de las hojas de *Moringa oleifera* demostró que presentaron actividad sobre *Staphylococcus aureus*. Estos resultados fueron semejantes a los hallados por *Salcedo*⁽³⁰⁾ al demostrar el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de moringa.

Al analizar los resultados obtenidos la relación entre el contenido de polifenoles en los extractos y la actividad antimicrobiana frente a las cuatro cepas *Salmonella enterica* Typhi, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Acinetobacter iwoffii* se encontró una correlación significativa inversa entre este metabolito y la CML. Iguales resultados mostraron los flavonoides frente a las mismas cepas, lo que significó que con una alta concentración de estos metabolitos en los extractos de *Moringa oleifera* del ecotipo Criolla se obtuvo mayor actividad antimicrobiana.

Por otra parte, lo planteado en este trabajo en cuanto a resistencia de las bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*) frente a los extractos hidroalcohólicos al 30 % (v/v) coincidió con los resultados presentados por otros autores, ya que son bacterias consideradas resistentes a los antibióticos debido al uso indiscriminado de estos compuestos, lo cual resalta la importancia de *Moringa oleifera* Lam. como alternativa diferente.^(30,31,32)

El efecto inhibitorio de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Moringa oleifera* frente a la cepa de *Salmonella* fue similar al logrado por *Doughari*⁽³³⁾ al formar un halo de inhibición de 8 mm con la técnica de difusión en placa. En el presente estudio se empleó la técnica de microdilución que resaltó mediante el efecto inhibitorio de la moringa frente a la cepa *Salmonella*. La actividad antimicrobiana hallada en los extractos se debió a la presencia de metabolitos secundarios, principalmente los flavonoides, que son derivados de una porción de tres carbonos en forma de heterociclo oxigenado el cual influye en la actividad biológica.⁽³⁴⁾

Manikandan⁽³⁵⁾ demostró la actividad antimicrobiana de las hojas de *Moringa oleifera* frente a cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* El presente estudio concuerda con esos resultados y corroboró la actividad antimicrobiana frente a las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus* y *Salmonella enterica* Typhi.

La síntesis de los metabolitos secundarios presentes en moringa está relacionada con la defensa en la planta inducida cuando queda expuesta a los agentes patógenos.⁽³⁶⁾ Según *Chambi*,⁽³⁷⁾ estos compuestos además tienen efecto nutricional en la planta, lo que ayuda al consumidor a mejorar el sistema inmune contra una amplia gama de patógenos. Además, inhiben el crecimiento de microorganismos que permiten que sean destruidos los anticuerpos generados para eliminar a los patógenos invasores.

La actividad antimicrobiana presente en los extractos justifica las propiedades medicinales descritas para la especie *Moringa oleifera* por *Moyo* y otros.⁽²²⁾ Demuestra la correlación encontrada en este estudio entre los metabolitos secundarios y las cepas evaluadas frente a los extractos de *Moringa oleifera*. Los flavonoides en particular, además de la actividad antimicrobiana, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, como antiinflamatorio, antialérgico, antioxidante, antitrombótico, vasodilatador y antiosteoartritis.^(38,39)

Por la razón de presentar los mejores valores de polifenoles, flavonoides y mejor CML el extracto hidroalcohólico al 70 % (v/v) de *Moringa oleifera* Lam. ecotipo Criolla se seleccionó para continuar la identificación de los metabolitos responsables de la actividad en los siguientes estudios. De acuerdo a los resultados obtenidos se evidenció que la extracción etanólica de *Moringa oleifera* mostró potencial para generar extractos con actividad antimicrobiana. Lo anterior se basó en los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos que mostraron la mayor concentración y en la positividad observada en los ensayos cualitativos para la presencia de compuestos fenólicos. Debido a la correlación de estos compuestos con la actividad antimicrobiana y la elevada capacidad extractiva de esta proporción utilizada para las hojas de *Moringa oleifera* se decidió dedicar el siguiente grupo de experimentos a profundizar en la composición y actividad biológica de los extractos obtenidos con etanol al 70 % (v/v).

La formación de un precipitado luego de la adición del acetato de plomo Pb (CH₃COO)₂ al extracto sugirió la presencia de flavonoides del tipo flavonol como quercetina o

isoquercetina, y propuso además que los flavonoides presentes contienen grupos hidroxilos catecólicos en el anillo beta o grupos hidroxilos cercanos al grupo carbonilo.

Los flavonoides son compuestos activos que presentan una fuerte actividad antimicrobiana y antioxidante que pueden ser los responsables de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos y así actuar directamente sobre enzimas que están presentes en la membrana celular.⁽²⁸⁾

Este análisis realizado al extracto etanólico al 70 % (v/v) de las hojas secas de *Moringa oleifera* cosechadas en Cuba confirmó la presencia de isoquercetina. Estos resultados se correspondieron con los informados por otro autor que encontró isoquercetina en el extracto de hojas de *Moringa oleifera* cosechadas en Pakistán.⁽²⁸⁾

A partir de resultados obtenidos por CCD para la identificación simultánea de isoquercetina, ácido criptoclorogénico y astragalina, autores informaron que la isoquercetina fue un componente mayoritario en los extractos de hojas de *Moringa oleifera*.⁽⁴⁰⁾ Los resultados obtenidos de la presencia de isoquercetina en los extractos hidroalcohólicos sugieren que este es uno de los metabolitos responsables de la acción antimicrobiana de *Moringa oleifera*.

Sarasti,⁽²⁷⁾ utilizando como marcador quercetina, determinó de forma cuantitativa mediante valoración espectrofotométrica los resultados de su concentración igual a 90,24 y 86,34 mg EQ/mL de extracto para hojas frescas y secas de la planta, respectivamente.

Un gran número de flavonas, isoflavonas, flavononas y flavonoles, así como sus derivados metoxi, isoprenil y derivados acetilados, mostraron también actividad antibacteriana. La diferencia en la susceptibilidad estuvo relacionada con la composición química de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y la posible actividad dependió de la presencia o ausencia de compuestos lipofílicos.⁽⁴¹⁾

La propiedad antibacteriana de un extracto se le atribuye en parte al contenido de isoquercetina. Sin embargo, la inhibición del crecimiento de *S. aureus* pudiera no estar relacionada a la actividad de este compuesto, ya que en sentido general algunos derivados no muestran actividad frente a cocos Gram positivos.⁽⁴²⁾

La relación entre la estructura y la actividad biológica de los flavonoides repercute en el mecanismo sobre el cual se describe su efecto. El alto contenido lipídico de la pared celular de *P. vulgaris* atrapó el compuesto y neutralizó su posible efecto. No obstante, la pared celular de *S. aureus* carece de esta capa lipídica que facilitó su paso a través de la membrana. En consecuencia, existen flavonas metiladas activas fundamentalmente frente

a bacterias Gram positivas como *S. aureus* que muestran débil actividad frente a bacilos Gram negativos como *P. aeruginosa* y *Proteus sp.*⁽⁴³⁾

En sentido general, muchas son las investigaciones sobre el efecto de los flavonoides frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilin (MRSA), *Enterococcus sp.*, resistentes a vancomicina (VRE) y bacilos Gram negativos resistentes a antibióticos. Estos pudieran constituir un blanco para la identificación de compuestos no tóxicos con actividad antimicrobiana en busca de la disminución de los efectos adversos causados por el uso excesivo de antibióticos y la aparición de nuevas cepas multi resistentes.^(28,44)

A modo de resumen se pudiera decir que el tamizaje fitoquímico de las hojas secas del ecotipo Criolla de *Moringa oleifera* Lam. cultivada en Cuba, sugirió la presencia de aceites y grasas, triterpenos y esteroides, taninos, catequinas, alcaloides y azúcares reductores. Los extractos hidroalcohólicos presentaron polifenoles a una concentración que varió entre 45,08 y 71,23 mg EAG/g de material seco y la concentración de flavonoides entre 47,96 y 80,91 mg EQ/g de material seco. Los extractos obtenidos a partir de hojas secas de la planta mostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas evaluadas. En este ecotipo se identificó la isoquercetina como el compuesto mayoritario en el extracto hidroalcohólico al 70 % (v/v).

Referencias bibliográficas

1. Doménech G, Durango A, Ros G. *Moringa oleifera*: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. Arch Latinoam Nutric. 2017 [acceso: 20/07/2019];67:86-97. Disponible en: http://ve.sciel.php?script=sci_arttext&pid=S0004-0622201700020000
2. Heleno S. Actualidad de *Moringa oleifera* en Terapéutica. [Tesis de grado]. Universidad Complutenses: Madrid; 2019.
3. Borja E. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal *Moringa oleifera* frente a microorganismos patógenos. [Tesis de grado]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas: Quito; 2018.
4. Munevar N. Evaluación del efecto antimicrobiano del polvo y del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Moringa oleifera* en un derivado cárnico (chorizo crudo). [Tesis de

- grado]. Universidad Salle: Bogotá; 2019 [acceso: 20/07/2019]. Disponible en: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/267
5. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. La Habana: Ed. Félix Varela; 2000.
 6. Indrayanto G. Recent development of quality control methods for herbal derived drug preparations. Nat Prod Com. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578x1801301208>
 7. Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apic Res. 1998;37:99-105. [acceso: 20/07/2019]. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.19998.11100961>
 8. Echemendía O, Martínez I, Carballo MT, Álvarez I, Gutiérrez M, Lago V, *et al.* Actividad “*in vitro*” del propoaromiel contra cepas aisladas de muestras clínicas. Rev CENIC Cienc Biol. 2005 [acceso: 20/07/2019];36:1-5. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525086>.
 9. Boonyadist V, Pongtip S, Wandee G. Simultaneous determination of cryptochlorogenic acid, isoquercetin and astragalín contents in *Moringa oleifera* leaf extracts by TLC-Densitometric Method. Evi Compl Alter Med. 2013;7:440-447. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/917609>
 10. Guaycha N, Jaramillo C, Cuenca S, Tocto J, Márquez I. Estudios farmacognósticos y toxicológicos preliminares de hojas, tallo y raíz de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). Rev Cienc UNEMI. 2017 [acceso: 20/07/2019];10:60-68. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=582661263006>
 11. Campo M, Cruz C, Cunalata G, Matute N. Infusiones de *Moringa oleifera* (moringa) combinada con *Cymbopogon citratus* (hierba Luisa) y *Lippia alba* (mastranto). Rev Cienc UNEMI. 2020 [acceso: 20/07/2019];13:114-126. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/1112>
 12. Torres J, Sinagawa S, Martínez G, López A, Sánchez E, Aguirre V, *et al.* *Moringa oleifera*: Phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. Rev Int Bot Exp. 2013 [acceso: 20/07/2020];82:193-202. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000200006&Ing=es&nrm=iso
 13. Linares C, Quiñones J, Pérez A, Carvajal C, Rivas M, Cid G, *et al.* Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam. mediante el uso de diferentes

métodos de extracción. Biotec Veg. 2018 [acceso: 20/07/2019];18:47-56. Disponible en:

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/575>

14. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various solvent ex-tracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. J Agric Food Chem. 2003;51:2144-2155. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf020444>

15. Gonzalez C, Prieto K. Diseño de una bebida instantánea a base de *Ananas comosus*, *Moringa oleifera* Lam. e *Hibiscus sabdariffa* Lam. [Tesis de grado]. Ecuador: Universidad Técnica Machala, Facultad de Ciencias Química y de Salud; 2020.

16. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview. Inter J Molec Sci. 2015;16:12791-835. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijms160612791>

17. Agudelo L. Empleo del polvo de hojas de *Moringa oleifera* Lam. como fortificante en un alimento enfocado a la población infantil colombiana menor de 4 años. [Tesis de grado]. Colombia: Facultad de Ingenierías; 2020.

18. Sherly E, Rina D, Ridho A. Development and analysis of analytical methods for determination of catechins and quercetin in natural products: A review. J Health Sci Res. 2020 [acceso: 20/07/2020];5:38-46. Disponible en: https://www.gijhsr.com/GIJHSR_Vol.5_Issue.3_July2020/7.pdf

19. Madera J, De Dios M, Colín C, Mariscal L, Núñez C, Veloz R, *et al.* Recubrimiento a base de quitosano y extracto acuoso de hoja de *Moringa oleifera* obtenido por UMAE y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de fresa (*Fragaria x ananassa*). Rev Cienc Biol Sal Biotec. 2019 [acceso: 20/07/2020];21:155-163. <http://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/index>

20. Guzmán S, Zamarripa A, Hernández L. Calidad nutrimental y nutracéutica de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura. Rev Mex Cienc Agric. 2015 [acceso: 20/07/2020];6:317-330. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000200008&script=sci_abstract

21. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda S, Morales N, Phivthongngam L. The *in vitro* and antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. J Ethnopharm. 2008;116:439-446. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.010>

22. Moyo B, Oyedemi S, Masika P, Muchunje V. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. Meat Sci. 2012;9:441-4471. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.029>
23. Canett R, Arvayo K, Ruvalcaba N. Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleifera* y sus posibles daños. Rev Cienc Biol Sal. 2014;6:36-43. DOI: <http://doi.org/10.18633/bt.v.16i2.45>
24. Brilhante RS, Sales JA, Pereira VS, Castelo Branco DS, Cordeiro RA, Sampaio CM. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. Asian Pacif J Trop Med. 2017;10:621-30. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.002>
25. Oliveira J, Silva G, Albuquerque R, Lira J, Hitzschki G. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic moringa leaf extracts. Asia Pacif J Trop Med. 2011;47:201-204. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60069-2](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60069-2)
26. Abubakar I, Usman A. Phytochemical and antibacterial investigations of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract on selected bacterial pathogens. J Microbiol Antimicrob. 2016;8:28-33. DOI: <http://doi.org/10.5897/JMA2016.0361>
27. Sarasti D. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal *Moringa oleifera* frente a microorganismos patógenos. [Tesis de grado]. Ecuador: Universidad Central de Ecuador; 2018.
28. Hala A, Zeibad H, Doaa A. Antimicrobial efficiency of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some multidrug resistant pathogen. Eryp J Microbiol. 2020;55:45-61. DOI: <http://doi.org/10.21608/ejm.2020.32559.1162>
29. Correa B. Actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de las hojas de *Moringa oleifera* (Moringa) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. [Tesis de grado]. Lima: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica; 2019.
30. Salcedo M. Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Moringa oleifera* (moringa) en concentraciones de 25, 50, 75 y 100 % sobre *Streptococcus mutans*. Estudio *in vitro*. [Tesis de grado]. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología; 2017.

-
31. Alarcon M, Dernandez D, Reyes D. *Moringa oleifera*: potenciales usos en odontología. Rev Fac Sal Univ Carab. 2017 [acceso: 20/07/2020];21:28-34. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375953625007>
32. Mosquera W, Criado L, Guerra B. Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales *Mammea americana* y *Moringa oleifera*. Biomed Rev Instit Nac Sal Colomb. 2020;40:55-71. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.4644>
33. Doughari J, Pukuma M. Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel and *Moringa oleifera* Lam on *Salmonella* Typhi. Afr J Biotechnol. 2007 [acceso: 20/07/2020];6:2212-2215. Disponible en: <http://www.academicjournal.org/AJB>
34. Lago V, Echemendia O, Gonzales K, Hernández Y, Almora E, Monteagudo R. Determinación de polifenoles totales, flavonoides y evaluación antimicrobiana en tres ecotipos de *Moringa oleifera* cultivadas en Cuba. Rev Cienc Farma Alim. 2020 [acceso: 20/07/2020];6:50-61. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80346/1113669612.2021.pdf?sequence=3&isAllowed=>
35. Manikandan P, Gnanasekaran G, Julikarthika P, Prasanth. Antibacterial efficacy of *Moringa oleifera* leaf against important clinical pathogens. Inter J Curr Microbiol Appl Sci. 2016;5:109-116. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.015>
36. Camacho M, Ramos D, Avila N, Sanchez E, Lopez S. Las defensas físico químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. Terra Latinoam. 2020;38:443-453. DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.629>
37. Chambi M. Avances en el conocimiento del efecto terapéutico de *Moringa oleifera*. [Tesis de grado]. Lima; Universidad Privada Autónoma del Sur, Facultad de Ciencias de la Salud; 2020.
38. Acuram L, Chichioco C. Antihypertensive effect of *Moringa oleifera* Lam. J Cog Biolog. 2019;5:1-10. DOI: <https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1596526>
39. Ramírez P, Linares C, Pozo S, Martínez J. Uso de la *Morinda citrifolia* (noni) y *Moringa oleifera* en vinoterapia para pacientes con osteoartritis. Rev Cubana Reumat. 2019 [acceso: 20/07/2019];2:1-12. Disponible en: <http://www.revreumatologia.sld.cu/index.php/reumatologia/article/view/774>
40. Hongqiang L, Hailin Z, Jing T, Han W, Zhongyao W, Pingya L, et al. Comparative nalysis of chemical constituents of *Moringa oleifera* leaves from China and India by ultra

- performance liquid chromatography coupled with Quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules*. 2019;24:942. DOI: <http://doi.org/10.3390/molecules24050942>
41. Teles Y, Sallet M, Vanderlei M. Sulphated flavonoids: Biosynthesis, structures and biological activities. *Molecules*. 2018;23:1-11. DOI: <http://doi.org/10.3390/molecules23020480>
42. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Faller P. *Medical Microbiology*. 3rd Ed. St. Louis: Mosby; 1998.
43. Zheng W, Tan R, Liu Z. Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Rev Cubana Plant Med*. 1996;62:160-2. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-2006-957841>
44. Goss M, Mafongoya P, Gubba A. *Moringa oleifera* extracts effect on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* Growth. *Asia Res J Agricul*. 2017;6:1-10. DOI: <http://doi.org/10.9734/ARJA/2017/29835>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización: Ernesto Almora Hernández, Vivian Lago Abascal.

Curación de datos: Ernesto Almora Hernández, Vivian Lago Abascal, Raisa Monteagudo Borges, Olga Echemendía Arana, Kethia Gonzalez García, Yasnay Hernández Rivero, Efraín Rodríguez Jiménez.

Análisis formal: Ernesto Almora Hernández, Vivian Lago Abascal, Raisa Monteagudo Borges.

Investigación: Ernesto Almora Hernández, Vivian Lago Abascal, Raisa Monteagudo Borges.

Metodología: Ernesto Almora Hernández, Vivian Lago Abascal, Raisa Monteagudo Borges, Olga Echemendía Arana, Kethia Gonzalez García, Yasnay Hernández Rivero.

Redacción del borrador original: Ernesto Almora Hernández, Vivian Lago Abascal, Raisa Monteagudo Borges, Efraín Rodríguez Jiménez.

Redacción, revisión y edición: Ernesto Almora Hernández, Efraín Rodríguez Jiménez.