



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ELABORACIÓN DE DOS TIPOS DE TE A PARTIR DE HOJAS DE
MORINGA OLEIFERA COMBINADO CON LIPPIA ALBA Y
CYMBOPOGON CITRATUS.

CRUZ ALVIA CINTHIA MABEL
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CUNALATA CUEVA GABRIELA VIVIANA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ELABORACIÓN DE DOS TIPOS DE TE A PARTIR DE HOJAS DE
MORINGA OLEIFERA COMBINADO CON LIPPIA ALBA Y
CYMBOPOGON CITRATUS.

CRUZ ALVIA CINTHIA MABEL
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CUNALATA CUEVA GABRIELA VIVIANA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

ELABORACIÓN DE DOS TIPOS DE TE A PARTIR DE HOJAS DE MORINGA
OLEIFERA COMBINADO CON LIPPIA ALBA Y CYMBOPOGON CITRATUS.

CRUZ ALVIA CINTHIA MABEL
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CUNALATA CUEVA GABRIELA VIVIANA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CAMPO FERNANDEZ MERCEDES

MACHALA, 11 DE FEBRERO DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

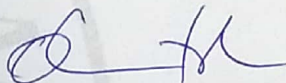
Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado ELABORACIÓN DE DOS TIPOS DE TE A PARTIR DE HOJAS DE MORINGA OLEIFERA COMBINADO CON LIPPIA ALBA Y CYMBOPOGON CITRATUS., hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



CAMPO FERNANDEZ MERCEDES
0959164625
TUTOR - ESPECIALISTA 1



MARQUEZ HERNANDEZ INGRID
0959479577
ESPECIALISTA 2



CUESTA RUBIO OSMANY
0959164716
ESPECIALISTA 3

Machala, 11 de febrero de 2019

Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS MO MA HL.docx (D47381004)
Submitted: 1/29/2019 6:58:00 PM
Submitted By: cinthiacruz2010@gmail.com
Significance: 5 %

Sources included in the report:

Tesis URKUN.docx (D41014810)
BASTIDAS BASTIDAS ELSA VIVIANA_SOJOS ASECIO CARLA GABRIELA_PT-010517.pdf (D30208007)
Trabajo de Titulacion_Lenin Alvarez_Alex Tene.docx (D40910226)
TITULACIÓN-3.docx (D41078546)
para urkund.docx (D41014585)
SILVA SUSCAL KARLA MARIA_PT-010517.pdf (D29624353)
Tesis URKUN.docx (D41014722)
Relación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de Bougainvillea glabra Choisy recolectadas en la Provincia de EL Oro. Autores (Armijos y Cedeño).docx (D47081877)
Caracterización físico-química de la cascarilla de Theobroma cacao L, variedades Nacional y CCN-51.docx (D30207946)
<https://docplayer.es/87871728-David-alberto-arguello-alba.html>

Instances where selected sources appear:

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Las que suscriben, CRUZ ALVIA CINTHIA MABEL y CUNALATA CUEVA GABRIELA VIVIANA, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado ELABORACIÓN DE DOS TIPOS DE TE A PARTIR DE HOJAS DE MORINGA OLEIFERA COMBINADO CON LIPPIA ALBA Y CYMBOPOGON CITRATUS., otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

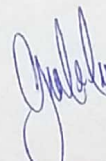
Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 11 de febrero de 2019



CRUZ ALVIA CINTHIA MABEL
0950365700



CUNALATA CUEVA GABRIELA VIVIANA
0707070272

DEDICATORIA

Mi tesis se la dedico con mucho amor a Dios por darme fuerzas a pesar de todas las adversidades que se me presentaron en el transcurso de mi carrera y que gracias a él he logrado uno de mis anhelos más deseados.

Con mucho cariño a mis padres que han estado conmigo en todo momento por su amor y mucho sacrificio en todos estos cinco años porque gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí. Solamente les agradezco por todo, ahora solo les estoy devolviendo lo que ustedes me brindaron en un principio.

A mis hermanos Nathaly, Niurka y José gracias por apoyarme y estar conmigo a lo largo de esta etapa, los quiero mucho.

A la Dra. Mercedes Campo, millón gracias quien durante todo este proceso nos ayudó con su conocimiento, enseñanza, paciencia y permitió el desarrollo de este trabajo.

A mi abuelito por quererme y apoyarme desde el primer día que empecé mi carrera, es por ello que hoy te dedico este trabajo de tesis.

A mí enamorado muchas gracias por su amor, comprensión, por tantas ayudas y tantos aportes en el desarrollo de mi tesis. Este trabajo no fue fácil pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían. Te lo agradezco mucho amor por haber llegado a mi vida.

A todos mis compañeros y docentes que me acompañaron en a mi formación tanto profesional y como ser humano.

Finalmente a mis amigas que estuvieron durante toda esta etapa conmigo apoyando cuando más lo necesite y por extender su mano en mis momentos difíciles, de verdad mil gracias, siempre las llevo en mi corazón.

No me puedo ir sin decirles gracias a todos, sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado y aquí está el fruto de tanto esfuerzo. Los quiero mucho y nunca los olvidaré.

Cinthia Cruz Alvia

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios un amigo fiel que ha estado junto a mí, en cada momento de mi vida, ayudando, en la buenas y malas dándome fuerza y valor en cada momento que gracias a él hoy estoy cumpliendo esta meta propuesta en mi vida.

A mis padres pilares fundamentales en mi vida quienes me han brindado su amor, comprensión y a su apoyo incondicional en estos cinco años de formación académica, que este título académico sea la recompensa de todo su esfuerzo y confianza brindada.

A mi hermano por brindarme su apoyo, su afecto y confianza en este proceso académico.

A mi compañero de vida Bryan Minta que ha estado presente en toda mi carrera universitaria quien me ha dado su apoyo, consejos y ganas de seguir superándome cada día.

A mi hija Camila Minta un angelito que transformó mi vida, que me enseñó amar incondicionalmente y el motivo de querer ser mejor persona cada día.

A la Doctora Mercedes Campo quien nos brindó la mano, sus conocimientos y su paciencia para lograr desarrollar este trabajo de titulación, muchísimas gracias de todo corazón.

De igual manera dedico este trabajo a mis tres amigas, con las cuales convivimos estos cinco años de la carrera, experimentando y conociendo muchas cosas donde el día de hoy llego el deseo más anhelado y esperado por nosotras muchas gracias por su amistad.

Finalmente dedico este trabajo a mi familia, allegados y amistades que me brindaron sus consejos, hoy he dado un paso, más en mi vida y esto es el fruto del esfuerzo realizado.

Gabriela Cunalata Cueva

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, por ser nuestro apoyo y por habernos dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad.

A nuestros padres por ser los principales promotores de nuestros sueños, quienes nos apoyaron en todo lo indispensable, por los valores - principios que nos han inculcado, por confiar y creer en nuestras expectativas.

A la Universidad Técnica de Machala y a los docentes que con sus conocimientos aportaron a lo largo de la preparación de nuestra profesión.

A nuestra tutora Dra. Mercedes Campo Fernández, gracias por su paciencia, dedicación, amistad y por la enseñanza de sus valiosos conocimientos que nos brindó en todo el transcurso del proceso de titulación.

Cinthia Cruz y Gabriela Cunalata

RESUMEN

El trabajo de investigación que ocupa utiliza tres especies vegetales de amplio uso tradicional. *Moringa oleifera* Lam es una planta medicinal que posee propiedades farmacológicas y nutritivas. *Cymbopogon citratus* es una especie que se utiliza con fines medicinales, de igual manera, *Lippia alba* Mill es un arbusto aromático, donde sus hojas se utilizan en infusión para tratamientos gastrointestinales.

El objetivo de la investigación fue elaborar dos formulaciones para preparar como infusiones, usando hojas de *M. oleifera* como principal ingrediente activo, combinadas con hojas de *L. alba* y *C. citratus*; para obtener bebidas que ayuden a mejorar las funciones fisiológicas en el organismo, previniendo el riesgo a determinadas enfermedades. Se realizaron los correspondientes ensayos físicos-químicos a las drogas de las tres especies en estudio, obteniéndose una humedad residual de 6,42% para *M. oleifera*; 8,70% para *C. citratus* y 10,91% para *L. alba*; cenizas totales de 10,41%; 8,64% y 11,19%, respectivamente y cenizas insolubles en HCl al 10%, disminuyendo los valores a 1,94%; 4,71% y 6,94%, respectivamente. Dada la elevada concentración de materia inorgánica se procedió a descartar la presencia de los metales pesados Arsénico y Plomo en las tres drogas, dando como resultado que en los tres casos los niveles no superaron los límites establecidos en la norma INEN 2392-2013. El estudio de cuantificación de los minerales permitió conocer el aporte de macrominerales y microminerales de las tres especies, resultando, la *L. alba* con los valores más altos, en particular para el Fe con 745,9 p.p.m.

El estudio químico cualitativo de los extractos acuosos se realizó mediante el tamizaje fitoquímico, sugiriendo la presencia de compuestos fenólicos, azúcares reductores y aminoácidos libres, en las tres drogas estudiadas; sin embargo, flavonoides y alcaloides solo resultaron positivos para *M. oleifera* y *L. alba*. Al realizar el análisis mediante cromatografía en capa delgada (CCD), se observó la presencia de compuestos químicos con grupos cromóforos conjugados, muchos de los cuales pudieran ser compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Adicionalmente, se sugiere la presencia de estructuras de naturaleza terpénica y compuestos aminoacídicos, estos últimos, principalmente, en la moringa.

Mediante el método de Bradford se cuantificó las proteínas en los extractos acuosos de las tres drogas crudas, de las cuales dos de ellas dieron valores de 35,99 mg/100g de droga

cruda para *M. oleifera* y para *L. alba* el valor fue 14,07 mg/100g de droga cruda, mientras que para *C. citratus* el contenido de proteína fue despreciable.

Con respecto a la cuantificación de fenoles se siguió la metodología de Folin-Ciocalteu mostrando que la *M. oleifera* posee un mayor contenido de dichos metabolitos (2127,35 mg EAG/100 g de droga cruda), siguiendo la *L. alba* (1335,86 mg EAG/100 g de droga cruda) y por último *C. citratus* (1048,05 mg EAG/100 g de droga cruda). Como parte de los compuestos fenólicos se realizó la cuantificación, en particular, de los flavonoides, resultando que los extractos acuosos de *L. alba* y *M. oleifera* presentaron los mayores valores (38,16 mg EQ/ g ES; 37,61 mg EQ/ g ES, respectivamente), los que difirieron estadísticamente del de hierba luisa, siendo en este caso menor (32,61 mg EQ/ g ES).

La capacidad secuestradora de radicales libres frente al DPPH de los extractos acuosos de las drogas estudiadas, demostró que el extracto de mayor capacidad antioxidante, con $IC_{50} = 0,1242$ mg/mL, fue el de *L. alba*, seguido del de *M. oleifera* ($IC_{50} = 0,1518$ mg/mL) y finalmente, el de *C. citratus* con $IC_{50} = 0,2101$ mg/mL, lo que guarda relación directa con el contenido de polifenoles y flavonoides antes referidos.

Las formulaciones se determinaron mediante un diseño experimental completamente al azar en donde se combinó *M. oleifera* / *C. citratus* y *M. oleifera* / *L. alba* en proporciones de 80:20, 70:30 y 60:40, para ambos casos. Se realizó la evaluación sensorial con 30 jueces resultando que para *M. oleifera* / *C. citratus*, la proporción de mayor agrado fue de 60:40 y 80:20 para *M. oleifera* / *L. alba*. Las formulaciones de mayor aceptación se envasaron en fundas de papel filtro sellable y se les evaluó algunos parámetros de calidad que permitieron la caracterización de las infusiones, tales como: índice de refracción, grados Brix, azúcar invertida, glucosa, fructosa, pH, densidad relativa, capacidad antioxidante y fenoles totales.

Con la presente investigación se llegó a la conclusión que ambas infusiones, además de ser aceptadas sensorialmente, se las pudiera considerar como bebidas que aportan nutrientes y biomoléculas capaces de mejorar algunas funciones fisiológicas en el organismo y prevenir daños ocasionados por radicales libres.

Palabras claves: *Moringa oleifera*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, actividad antioxidante, fenoles, flavonoides.

ABSTRACT

The research work that occupies uses three plant species of wide traditional use. *Moringa oleifera* Lam is a medicinal plant that with pharmacological, nutritional properties. *Cymbopogon citratus* is a species that is used for medicinal purposes, likewise, *Lippia alba* Mill is an aromatic shrub, where its leaves are used in infusion for gastrointestinal treatments.

The objective of the research was to develop two formulations to prepare as infusions, using leaves of *M. oleifera* as the main active ingredient, combined with leaves of *L. alba* and *C. citratus*; to obtain a drink that helps to improve the physiological functions in the organism, preventing the risk to certain diseases. The corresponding physical-chemical tests were carried out on the drugs of the three species under study, obtaining a residual moisture of 6.42% for *M. oleifera*; 8.70% for *C. citratus* and 10.91% for *L. alba*; total ashes of 10.41%; 8.64% and 11.19%, respectively, and insoluble ashes in 10% HCl, decreasing the values to 1.94%; 4.71% and 6.94%, respectively. Given the high concentration of inorganic matter, the presence of the heavy metals Arsenic and Lead in the three drugs was ruled out, resulting in the three levels not exceeding the limits established in the INEN 2392:2013 standard. The study of quantification of the minerals allowed to know the contribution of macrominerals and microminerals of the three species, resulting, the *L. alba* with the highest values, in particular that of the Fe mineral with 745.9 p.p.m.

The qualitative chemical study of the aqueous extracts was carried out through phytochemical screening, suggesting the presence of phenolic compounds, reducing sugars and free amino acids, in the three drugs studied; however, flavonoids and alkaloids were only positive for *M. oleifera* and *L. alba*. When performing the analysis by thin layer chromatography (CCD), the presence of chemical compounds with conjugated chromophore groups was observed, many of which could be phenolic compounds with antioxidant capacity. Furthermore, the presence of structures of terpenic nature and amino acid compounds is suggested, the latter mainly in moringa.

Bradford's method quantified the proteins in the aqueous extracts of the three crude drugs, of which two of them gave values of 35.99 mg/ 100 g of crude drug for *M. oleifera* and for *L. alba* the value was 14.07 mg/ 100 g of crude drug, while for *C. citratus* the protein content was negligible.

Regarding phenol quantification, the Folin- Ciocalteu methodology was used, showing that *M. oleifera* has a higher content of these metabolites (2127.35 mg EAG / 100 g of crude drug), following *L. alba* (1335.86 mg EAG/ 100 g of crude) and finally *C. citratus* (1048.05 mg EAG / 100 g of crude). As part of the phenolic compounds, the quantification, in particular, of the flavonoids was carried out, resulting in the aqueous extracts of *L. alba* and *M. oleifera* having the highest values (38.16 mg EC/ gES, 37.61 mg EQ/ g ES, respectively, those that differed statistically from that of case smaller (32.61 mg EQ/ g ES).

The capacity to scavenge free radicals against DPPH of the aqueous extracts of the drugs studied showed that the extract with the highest antioxidant capacity, with IC₅₀= 0.1242 mg/mL, was that of *L. alba*, followed by *M. oleifera* (IC= 0.1518 mg/mL) and finally, that of *C. citratus* with IC₅₀= 0.2101 mg/mL, which is directly related to the content of polyphenols and flavonoids mentioned above.

The formulations were determined by a completely randomized experimental design in which *M. oleifera* / *C. citratus* and *M. oleifera* / *L. alba* were combined in proportions of 80:20, 70:30 and 60:40, for both cases. The sensory evaluation was carried out with 30 judges, resulting that for *M. oleifera* / *C. citratus*, the proportion of greatest pleasure was 60:40 and 80:20 for *M. oleifera* / *L. alba*. The most accepted formulations were packed in sealable filter paper covers and evaluated some quality parameters that allowed the characterization of the infusions, such as: refractive index, Brix degrees, invert sugar, glucose, fructose, pH, relative density, antioxidant capacity and total phenols.

With the present investigation, it was concluded that both infusions, in addition to being sensory accepted, could be considered as beverages that provide nutrients and biomolecules capable of improving some physiological functions in the organism and preventing damage caused by free radicals.

Keywords: *Moringa oleifera*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, antioxidant activity, phenols, flavonoids.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | |
| HIPÓTESIS | |
| OBJETIVOS | |
| Objetivo General | |
| Objetivo Específicos | |
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| MARCO TEÓRICO | 3 |
| I.1 Uso de plantas medicinales en la actualidad | 3 |
| I.2 <i>Moringa oleifera</i> Lam | 3 |
| I.2.1 Generalidades | 3 |
| I.2.2 Descripción botánica | 4 |
| I.2.3 Composición química | 5 |
| I.2.4 Usos tradicionales..... | 5 |
| I.2.5 Actividad biológica demostrada | 6 |
| I.3 <i>Cymbopogon citratus</i> | 6 |
| I.3.1 Generalidades | 6 |
| I.3.2 Descripción botánica | 6 |
| I.3.3 Composición química | 7 |
| I.3.4 Usos tradicionales..... | 7 |
| I.3.5 Actividad biológica demostrada | 8 |
| I.4 <i>Lippia alba</i> Mill..... | 8 |
| I.4.1 Generalidades | 8 |
| I.4.2 Descripción botánica | 9 |
| I.4.3 Composición química | 9 |
| I.4.4 Usos tradicionales..... | 10 |
| I.4.5 Actividad biológica demostrada | 10 |
| I.5 Infusiones..... | 10 |
| I.6 Requisitos de hierbas aromáticas..... | 10 |
| I.7 Envasado y rotulado | 11 |
| CAPÍTULO II..... | 12 |
| II MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| II.1 Cosecha de las materias primas vegetales..... | 12 |

| | |
|--|----|
| II.2 Tratamiento postcosecha de las drogas vegetales | 12 |
| II.3 Técnicas de análisis fisicoquímicos de las drogas crudas | 13 |
| II.3.1 Determinación de humedad | 13 |
| II.3.2 Determinación de cenizas totales..... | 13 |
| II.3.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico..... | 13 |
| II.4 Determinación de minerales..... | 14 |
| II.5 Determinación de arsénico y plomo..... | 14 |
| II.6 Tamizaje fitoquímico | 14 |
| II.7 Cromatografía en capa delgada (CCD) | 15 |
| II.8 Determinación de proteínas..... | 15 |
| II.8.1 Preparación de la muestra | 15 |
| II.8.2 Procedimiento del ensayo | 16 |
| II.9 Determinación del contenido total de flavonoides por el método colorimétrico de cloruro de aluminio..... | 16 |
| II.9.1 Preparación de la muestra | 16 |
| II.9.2 Procedimiento del ensayo | 16 |
| II.10 Cuantificación de fenoles totales..... | 17 |
| II.10.1 Preparación de la muestra | 17 |
| II.10.2 Procedimiento del ensayo | 17 |
| II.11 Elaboración del extracto acuoso seco..... | 18 |
| II.12. Determinación de la capacidad antioxidante secuestradora de radicales libres frente al 2,2 difenil - 1 - picrilhidracilo (DPPH) | 18 |
| II.12.1 Preparación de la muestra | 18 |
| II.12.2 Procedimiento del ensayo | 18 |
| II.13 Diseño de formulación | 19 |
| II.14 Control de calidad de las infusiones..... | 19 |
| II.14.1 Determinación del peso promedio | 19 |
| II.14.2 Determinación de grados Brix, índice de refracción, azúcar invertida, glucosa y fructosa..... | 20 |
| II.14.3 Determinación de pH..... | 20 |
| II.14.4 Determinación de densidad relativa..... | 20 |
| II.14.5 Determinación de fenoles al producto terminado por el método de Folin-Ciocalteu..... | 20 |
| II.14.6 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) al producto terminado | 21 |

| | |
|---|----|
| II.15 Análisis estadístico | 21 |
| CAPÍTULO III | 22 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| III.1 Análisis físico-químico de las drogas crudas..... | 22 |
| III.2 Determinación de minerales | 24 |
| III.3 Determinación de arsénico y plomo | 27 |
| III.4 Tamizaje fitoquímico | 28 |
| III.5 Cromatografía en capa delgada (CCD)..... | 30 |
| III.6 Cuantificación de proteínas, fenoles totales y flavonoides totales | 32 |
| III.7..Determinación de la capacidad antioxidante secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)..... | 37 |
| III.8 Diseño de formulación..... | 39 |
| III.9 Embalaje y ensobrado | 42 |
| CAPÍTULO IV | 46 |
| CONCLUSIONES..... | 46 |
| CAPÍTULO V..... | 47 |
| RECOMENDACIONES..... | 47 |
| ANEXOS | 48 |
| BIBLIOGRAFÍA | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>M. oleifera</i> (moringa)..... | 5 |
| Tabla 2 Clasificación taxonómica de <i>C. citratus</i> (hierba luisa) | 7 |
| Tabla 3 Clasificación taxonómica de <i>L. alba</i> (mastranto)..... | 9 |
| Tabla 4 Diseño experimental completamente al azar | 19 |
| Tabla 5 Análisis físico-químico de las drogas crudas | 23 |
| Tabla 6 Minerales presentes en las hojas secas de las drogas | 25 |
| Tabla 7 Minerales presentes en <i>M. oleifera</i> reportado por otros autores | 25 |
| Tabla 8 Minerales presentes en <i>C. citratus</i> reportado por otro autor | 26 |
| Tabla 9 Minerales presentes en <i>L. alba</i> reportado por otro autor..... | 26 |
| Tabla 10 Resultado de los contaminantes presentes en <i>M. oleifera</i> , <i>C. citratus</i> y <i>L. alba</i> .. | 27 |
| Tabla 11 Tamizaje fitoquímico en el extracto acuoso de las tres especies en estudio | 28 |
| Tabla 12 Cuantificación de proteínas, fenoles totales y flavonoides en las tres drogas crudas..... | 32 |
| Tabla 13 Capacidad antioxidante secuestradora de radicales libres frente al DPPH de las tres drogas vegetales..... | 38 |
| Tabla 14 Resultados del control de calidad en las infusiones moringa/mastranto y moringa/hierba luisa | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Ensayos realizados al extracto acuoso de las tres especies | 15 |
| Figura 2 Cromatografía en capa delgada de las tres drogas crudas | 30 |
| Figura 3 Determinaciones de fenoles totales, flavonoides y la IC50 de las tres especies en estudio..... | 38 |
| Figura 4 Diagrama de caja y bigotes para la evaluación sensorial de ordenamiento de la infusión moringa/mastranto..... | 40 |
| Figura 5 Diagrama de caja y bigotes de la evaluación sensorial de ordenamiento de la infusión moringa/hierba luisa..... | 41 |
| Figura 6 Diseño de parte externa e interna de la caja para funditas de infusiones de moringa/mastranto..... | 43 |
| Figura 7 Diseño de la parte externa e interna de la caja para funditas de infusiones de moringa/hierba luisa..... | 44 |
| Figura 8 Etiquetas de las funditas del té | 45 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1 Composición química de <i>M. oleifera</i> | 48 |
| Anexo 2 Actividad biológica de la <i>M. oleifera</i> | 50 |
| Anexo 3 Composición química del <i>C. citratus</i> | 51 |
| Anexo 4 Actividad biológica del <i>C. citratus</i> | 52 |
| Anexo 5 Composición química de <i>L. alba</i> | 53 |
| Anexo 6 Actividad biológica de <i>L. alba</i> | 54 |
| Anexo 7 Requisitos establecidos en la Norma INEN 2392:2013..... | 55 |
| Anexo 8 Contenido de contaminantes establecidos en la Norma INEN 2392:2013 | 56 |
| Anexo 9 Hojas de <i>M. oleifera</i> en diferentes procesos | 56 |
| Anexo 10 Análisis de varianza de la infusión moringa/mastranto | 56 |
| Anexo 11 Prueba de rango múltiple de la infusión moringa/mastranto | 57 |
| Anexo 12 Análisis de varianza de la infusión moringa/hierba luisa | 57 |
| Anexo 13 Prueba de rango múltiple de la infusión moringa/hierba luisa | 57 |

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las hierbas son usadas empíricamente de forma curativa para tratar diferentes enfermedades. Los farmacéuticos llevan a cabo diversos proyectos utilizando plantas medicinales para la creación de medicamentos o cosméticos, con el fin de elevar la calidad de vida de las personas. ¹

Las plantas medicinales son de gran interés e importancia, por lo cual la organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda diferentes programas cuyo objetivo es incentivar a las personas al uso de hierbas medicinales como parte de la atención primaria en los hogares. ¹

Se estima que alrededor del 80% de la población acude a la medicina ancestral herbolaria. Según estadísticas se puede decir que Asia y Cuba son los principales consumidores de plantas medicinales, aprovechando todas las partes que conforman una planta, porque en cada una de ellas se encuentra algún principio activo importante. ¹

La investigación desarrollada tiene como precedente el diseño de dos formulaciones para consumir en forma de infusión, en donde se combinó la moringa con plantas que contribuyeron, no solo a mejorar las propiedades organolépticas del extracto acuoso, sino que aportaron metabolitos que reforzaron las propiedades nutricionales y antioxidantes de la moringa. ¹

Un primer estudio se realizó mezclando las hojas de moringa como ingrediente activo esencial (76% aproximadamente), *Theobroma cacao* (cascarilla de cacao) en polvo y ácido cítrico. ² Un segundo diseño evaluó las características físico-químicas y sensoriales de la combinación moringa y flor de Jamaica (50:50). ³ En ambos casos las infusiones diseñadas tuvieron las características necesarias para ser consideradas, por sus propiedades nutricionales y antioxidantes, como bebidas beneficiosas para la salud humana y con gran aceptación desde el punto de vista sensorial.

La *M. oleifera* pertenece a la familia Moringaceae, es un árbol que crece en climas tropicales y subtropicales, existe un sin número de especies, pero la que destaca por sus propiedades terapéuticas es la *M. oleifera* este árbol es muy conocido como el árbol de la vida, es originario del sur del Himalaya. ⁴

M. oleifera es rica en vitamina A, C, calcio, hierro, potasio así como proteínas, aminoácidos esenciales, fenoles, flavonoides, taninos, entre otros metabolitos la cuales otorgan a la plantan múltiples beneficios. ⁴

Las hojas de *M. oleifera* rson ricas en compuestos de valor nutricional como betacarotenos, vitaminas C, proteína, minerales como calcio y potasio. Estas actúan como fuente de antioxidantes, lo que mejora la vida media de los alimentos que presentan en su estructura grasas. Entre estos compuestos químicos encontramos ácido ascórbico, flavonoides, compuestos fenólicos y carotenoides. ⁵

La *L. alba* (mastranto) es una hierba medicinal perenne, erecta, que logra alcanzar hasta los 2 metros de altura, debido a su rusticidad esta hierba crece en diferentes tipos de suelos como lo son arcillosos y limosos. ⁶

En su composición química destacan una gran variedad de aceites esenciales, así como también metabolitos secundarios tales como taninos y alcaloides. Dentro de sus propiedades terapéuticas podría citarse que funciona como antiespasmódica, sedante, emenagoga y, además, ayuda en diferentes trastornos digestivos. ⁶

El *C. citratus* es una planta perenne de la familia Poáceas originaria del sur de Asia que crece en regiones tropicales y sabanas. ⁷

Su uso tradicional ancestral es antiespasmódico, antipirético, tranquilizante, anticatarral, sedante, entre otras propiedades terapéuticas; atribuido a que en su composición química se pueden encontrar saponinas, taninos, polifenoles, malonilglucósidos, glucósidos fenólicos, ácidos grasos y alcaloides. ^{7 8}

Como se puede apreciar las tres plantas antes comentadas presentan reconocidos usos en la medicina natural tradicional, incluso vale destacar que las tres se consumen de diversas maneras, como por ejemplo en infusiones.

Por lo antes expuestos este trabajo tiene como objetivo diseñar 2 formulaciones que se presentan como bolsitas para preparar infusiones utilizando como materias primas, hojas de moringa combinada con mastranto y hierba luisa, de manera independiente. Lo anterior se debe a que si bien la moringa posee múltiples bondades nutricionales y terapéuticas, esta presenta olor y sabor desagradable, lo que podría ser enmascarado con dichas plantas por el contenido en aceites esenciales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de elaborar dos formulaciones para preparar como infusiones, a partir de hojas de *M. oleifera* como principal ingrediente activo, combinadas con hojas de *L. alba* y *C. citratus*, para obtener infusiones que ayuden a mejorar las funciones fisiológicas en el organismo, previniendo el riesgo a determinadas enfermedades.

HIPÓTESIS

Será posible diseñar dos formulaciones para la elaboración de infusiones, aprovechando los compuestos orgánicos hidrosolubles e inorgánicos, que brindan las hojas de *M. oleifera*, combinadas con hojas de *L. alba* y *C. citratus*. Las bebidas resultantes, más allá de ser aceptadas organolépticamente, tributan de manera favorable a la salud humana por su capacidad antioxidante.

OBJETIVOS

Objetivo General

Elaborar dos formulaciones para preparar como infusiones, usando hojas de *M. oleifera* como principal ingrediente activo, combinadas con hojas de *L. alba* y *C. citratus*; para obtener una bebida que ayude a mejorar las funciones fisiológicas en el organismo, previniendo el riesgo a determinadas enfermedades.

Objetivos Específicos

- Evaluar los parámetros fisicoquímicos que definen la calidad y eficacia de las tres drogas vegetales utilizadas como materias primas.
- Diseñar una formulación a base de hojas de *M. oleifera* con *L. alba* y una segunda combinado moringa con *C. citratus*; ambas para consumir en forma de infusión.
- Evaluar la calidad de ambas formulaciones.
- Diseñar el empaque para los productos terminados.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

I.1 Uso de plantas medicinales en la actualidad

Desde la antigüedad la medicina tradicional ha desempeñado un importante papel para satisfacer necesidades básicas como alimentación, terapia medicinal o aliviar enfermedades.⁹

La medicina natural es de gran interés y uso en la población, pues se estima que un 80% de las personas acuden al tratamiento médico con medicamentos, que contienen en su formulación al menos un ingrediente proveniente de una planta medicinal.¹⁰ El papel que desempeñan las plantas medicinales es mejorar la salud e incrementar la calidad de vida, evitando el uso de fármacos que se obtienen por un sin número de procesos químicos.¹¹

En la actualidad el consumo de hierbas ha vuelto a resurgir gracias al desarrollo científico de los bioquímicos farmacéuticos¹¹, los que se proponen transformar y reemplazar los medicamentos con principios activos sintéticos, por formulaciones químicas a base de productos que contengan como ingredientes farmacéuticos activos (IFA), extractos provenientes de plantas medicinales. En otro sentido, los productos naturales han incrementado su aceptación en la sociedad porque existen numerosos artículos que demuestran su calidad y eficacia.¹

I.2 *Moringa oleifera* Lam

I.2.1 Generalidades

La moringa pertenece al género Moringaceae de la cual se conocen 13 especies diferentes, siendo la más destacada la *M. oleifera*, árbol que proviene de la región del sur del Himalaya.⁸ *M. oleifera* posee una gran cantidad de nutrientes y efectos terapéuticos por lo que se ha hecho muy común su uso, logrando extenderse a diferentes continentes como Asia, África, Centroamérica y América del sur.⁴

En los diferentes países se la conoce con diversos nombres comunes (árbol de la vida, árbol milagroso, flor de jacinto)¹², de igual manera sus usos varían de un país a otro. En algunos países es usado como una planta ornamental y en otros con fines terapéuticos. Tiene un crecimiento muy rápido, logrando alcanzar de 10 a 12 metros de altura. Este árbol es muy beneficioso pudiendo aprovecharse de él las vainas, hojas, flores y hasta sus raíces.⁴

Este árbol es muy utilizado para la alimentación humana e incluso animal por su elevado contenido en vitaminas, proteínas y minerales.⁸

M. oleifera es conocido como el árbol de la vida porque cada una de sus partes posee un alto contenido de nutrientes. Las hojas se pueden secar a la sombra y almacenar enteras o molidas sin perder sus propiedades, en cambio sus flores se pueden consumir crudas o cocinadas y poseen un alto contenido de calcio y potasio.^{5 4}

Las semillas del árbol son utilizadas para la extracción de un aceite muy parecido al aceite de oliva y se pueden consumir tiernas y hervidas en agua o secas y tostadas. Su fruto o vainas tienen propiedades afrodisíacas y sobre todo, son ricas en aminoácidos esenciales, proteínas y vitaminas.⁴

I.2.2 Descripción botánica

La moringa es un árbol perenne muy poco longevo ya que solo alcanza un tiempo de vida de 20 años, es una especie que tiene un rápido crecimiento y que además aporta una elevada cantidad de nutrientes al suelo.¹²

En su hábitat natural crece hasta los 1.400 m de altitud, es resistente a las sequías y se cultiva en regiones semiáridas y áridas. Los sembríos de *M. oleifera* ubicados en Centroamérica resisten temperaturas entre 6 a 38°C, pero con la diferencia que a temperaturas menores de 14°C no son capaces de florecer.¹³

Sus flores son bisexuales con pétalos de color blanquecinos y estambres de color amarillo, las flores están unidas en grupos grandes panículas axilares formadas por cinco pétalos desiguales y blancos.¹⁴

Su fruto es una vaina capsular que tiene un tamaño de 40 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho, en cada vaina podemos encontrar entre 12 a 25 semillas. Las semillas tienen una forma redondeada de color castaño oscuro y presentan 3 alas blanquecinas.¹³

Las hojas están agrupadas en folículos con cinco pares ubicados sobre el pecíolo principal y un folículo en su parte final.¹⁵

El Sistema Informado Integrado de Taxonomía (ITIS) indica la información taxonómica de la planta que se refiere en la tabla 1.¹⁶

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *M. oleifera* (moringa)



| | |
|--------------------|--------------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Tracheophyta |
| Subdivisión | Spermatophytina |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Brassicales |
| Familia | Moringaceae |
| Género | Moringa |
| Especie | <i>Moringa oleifera</i> (Lam.) |

I.2.3 Composición química

El árbol de la vida posee múltiples compuestos nutricionales, entre ellos destaca proteínas, fibras, carbohidratos, aminoácidos esenciales, vitamina A, vitamina B₁, B₂, B₃, vitamina C, vitamina E y vitamina K; de igual manera presenta una gran variedad de minerales como potasio, calcio, magnesio, fósforo, cobre, hierro, litio, sodio, entre otros.¹⁷

En sus semillas se encuentra el ácido oleico, en cambio las hojas presentan el ácido linoleico y en el resto del árbol se encuentra el ácido palmítico junto los omega 3 y 6.¹⁷

De igual manera se han referido una gran variedad de metabolitos secundarios como taninos, saponinas, flavonoides tales como campferol, quercetina, mirecetina, isoramnetina, glucósidos de campferol, además, glucósidos cardiacos, glucósidos fenólicos, isotiocianatos, esteroides y glucoesteroles, ácidos grasos, alcaloides y algunos compuestos minoritarios como los glucosinolatos. En el anexo 1 se relacionan diversos metabolitos aislados de la especie.¹⁸

I.2.4 Usos tradicionales

Según investigaciones realizadas la *M. oleifera* es un árbol que muestra una gran versatilidad por los múltiples beneficios de todas sus partes.¹⁹

La infusión de las hojas se utiliza como purgante, para tratar dolores de cabeza, hemorroides, fiebre, dolor de garganta, bronquitis, escorbuto, infecciones del oído y los ojos, regulan los niveles de glucosa en sangre y reduce la hinchazón glandular.²⁰

La corteza del tallo es utilizada como vesicante rubefaciente, previene el agrandamiento del bazo y la formación de las glándulas tuberculosas alrededor del cuello, puede destruir tumores y sanar las úlceras peptídica.¹⁹

La goma del árbol de la vida es utilizada para combatir las caries dentales, la mezcla de goma con aceite de sésamo se utiliza contra dolores de cabeza, molestias intestinales, para enfermedades respiratorias como el asma e incluso, a veces, es utilizado como abortivo.¹⁹

La flor es un gran estimulante afrodisíaco utilizado para inflamaciones y enfermedades musculares.¹⁹

Además de los usos terapéuticos, también es utilizado en la industria química para el tratamiento de aguas, en la fabricación de cosméticos utilizando los aceites esenciales de la planta y en las industrias alimenticias para el consumo humano o animal.^{19 21}

I.2.5 Actividad biológica demostrada

Estudios realizados por varios autores demuestran la actividad biológica que posee la *M. oleifera* donde se analizaron diferentes extractos como etanólicos, acuosos y metanólicos de la hoja de *M. oleifera*. Se demostró que posee actividad biológica como antioxidante, antiulcerosa, hepatoprotectora, antimicrobiana entre otras las cuales se describen en el anexo 2.

I.3 *Cymbopogon citratus*

I.3.1 Generalidades

El *C. citratus* pertenece a la familia Poaceae, se conocen cerca de 140 especies siendo la mayoría nativas de Asia y África, algunas especies que conforman este vasto grupo son utilizadas en la perfumería, fabricación de productos de aseo personal, condimentos alimenticias y productos farmacéuticos.²²

Esta hierba se la conoce con diferentes nombres comunes como hierba luisa, caña santa, limoncillo entre otros nombres.²³


I.3.2 Descripción botánica

C. citratus pertenece a la familia Poaceae, es originaria del sureste de Asia, pero se ha logrado extender alrededor de todo el mundo en regiones tropicales y sabanas.²⁴

Es una planta perenne, que crece en grupos densos de hasta 3 m de altura con unos rizomas muy cortos, sus hojas son glabras planas, erectas de más 1 m de largo y de 5 a 15 mm de ancho, su borde superior es cerrado en la base, tiene márgenes rugosos y lígulas membranosas o áridas de 4 a 5 mm de largo.⁷

En la tabla 2 se presenta la descripción taxonómica de la planta, según el Sistema Informado Integrado de Taxonomía (ITIS).¹⁶

Tabla 2 Clasificación taxonómica de *C. citratus* (hierba luisa)

| | | |
|--|--------------------|--|
|  | Reino | Plantae |
| | División | Tracheophyta |
| | Subdivisión | Spermatophyta |
| | Clase | Magnoliopsida |
| | Orden | Poales |
| | Familia | Poaceae |
| | Género | Cymbopogon |
| | Especie | <i>Cymbopogon citratus</i> (Stapf.) |

I.3.3 Composición química

El *C. citratus* se caracteriza por presentar en su composición química una variedad de aceites esenciales así como metabolitos secundarios.²³

El *C. citratus* es una planta rica en compuestos químicos como terpenos, alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres, los cuales se refieren como los compuestos principales de esta planta, pero la parte más interesante de esta planta es su gran variedad de aceites esenciales.²⁵

También se encuentran metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, saponinas, antraquinonas, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides, que se detallan en el anexo 3.²⁶

I.3.4 Usos tradicionales

En la medicina tradicional el *C. citratus* se utiliza en infusión y ayuda a aliviar una variedad de enfermedades. Entre sus propiedades terapéuticas se señala: anticatarral,

antiespasmódico, hipotensor, antipirético, sedante, hipocolesterolémica, antiinflamatoria, hipoglicemiante, antioxidante y antifúngica.²⁷

Su aceite esencial también tiene propiedades terapéuticas muy conocidas como bactericidas, ansiolíticas, sedativas y anticonvulsionantes.⁹

I.3.5 Actividad biológica demostrada

Existe una variedad de estudios farmacológicos que demuestran sus propiedades terapéuticas los cuales se han realizado con los extractos de las hojas de *C. citratus* en diferentes menstros demostrando su capacidad antioxidante, sedante, antiinflamatorio, entre otros los que se describen en el anexo 4.

I.4 *Lippia alba* Mill

I.4.1 Generalidades

L. alba pertenece a la familia Verbenaceae, en la que se incluyen cerca de 98 géneros y, aproximadamente, 2500 especies. Esta planta se distribuye en regiones tropicales y subtropicales como El caribe, América Central, América del Sur y África.²⁸ Así mismo, crece espontáneamente en suelos arenosos que están alrededor de ríos, lagos, estanques y, frecuentemente, son cultivadas en jardines de los hogares.²⁹

La planta es conocida popularmente en diferentes países como orégano de cerro, pronto alivio, curatodo, erva-cidreira, cidrón, hierba luisa, poleo, juanilama y quita dolor.^{30 31}

De acuerdo a las investigaciones realizadas, la planta presenta metabolitos secundarios con un contenido mayoritario de carvona seguido de limoneno. Si se cosecha la planta en estado de floración, el contenido de aceites esenciales será mayor.³²

Dicha planta presenta un olor característico que a su vez es muy llamativo, además, tiene varias aplicaciones en la industria ya sea farmacéutica, textil, alimentos y, sobre todo, en cosmética.³²

La composición química de la planta depende del lugar de procedencia ya sea por factores intrínsecos como la edad, factores biológicos y el cultivo. También se ve afectada por factores extrínsecos como el clima, naturaleza del suelo y su debida recolección.³⁰

I.4.2 Descripción botánica


Es una planta que crece en forma de arbusto y puede alcanzar entre 1,7 m a 2 m de altura. Las hojas son opuestas, las cuales miden de 2 a 7 cm de largo por 1,2 a 2,3 cm de ancho, con un ápice agudo, base cuneada, margen serrado y con nervadura pinnada.³³

Posee una inflorescencia axilar capitada con una corola tipo hipocraterimorfa que es de color blanco y a su vez pétalos lila que pueden alcanzar un tono azul. Sus bractéolas miden de 3 a 5 mm de largo, posee estambres didínamos y anteras ovadas.³³

Cuando el fruto se madura se divide en dos pirenos los cuales contienen semillas de color marrón.³³

El Sistema Informático Integrado de Taxonomía (ITIS) indica la información taxonómica de la planta que se presenta en la tabla 3:¹⁶

Tabla 3 Clasificación taxonómica de *L. alba* (mastranto)

| | | |
|--|--------------------|----------------------------|
|  | Reino | Plantae |
| | División | Tracheophyta |
| | Subdivisión | Spermatophytina |
| | Clase | Magnoliopsida |
| | Orden | Lamiales |
| | Familia | Verbenaceae |
| | Género | Lippia L. |
| | Especie | <i>Lippia alba</i> (Mill.) |

I.4.3 Composición química

Los compuestos químicos que se encuentran en la planta de *L. alba* son flavonoides, alcaloides y aceite esencial.³⁰ La composición del aceite esencial es muy variable ya sea por su estado fenológico o la parte a utilizar por eso actualmente se han reconocido doce quimiotipos, los cuales se clasifican en: citral, linalol, carvona, limoneno, γ -terpineno, citral-mirceno, citral-limoneno, citral- β -cariofileno, citral D-germacreno, carvona limoneno, 1,8-cineol-alcanfor, 1,8-cineol-limoneno y limoneno piperitona.³⁴

Se sugiere otra clasificación como lo indica Hennebelle (2006)²⁸ de acuerdo a la composición y la vía de biosíntesis del aceite esencial. Esta propone siete quimiotipos: I

(citral, linalol y β -cariofileno), II (tagetenona), III (limoneno y carvona), IV (mirceno), V (γ -terpineno), VI (alcanfor-1,8-cineol) y VII (estragol). En el anexo 5 se detalla la composición química de *L. alba*.

I.4.4 Usos tradicionales

En la medicina natural se utilizan las hojas y flores de *L. alba* para preparar infusiones debido a que se le atribuyen diversas propiedades medicinales, tales como: carminativa, sedante, antibacteriana, antifúngica, antiespasmódica, antiinflamatoria, citotóxica, antiviral, antipirética, antidiarreica, antiprotozoario, antihipertensiva y contra la anemia.^{35 36}

Otro uso común de la *L. alba* es que se utiliza para tratamientos respiratorios tales como gripe, resfriado, tos, bronquitis y asma.³⁷

I.4.5 Actividad biológica demostrada

Se ha mencionado en diferentes artículos que la *L. alba* tiene diversos usos comerciales asociados con sus propiedades terapéuticas, además otros autores han demostrado que el mastranto posee actividades biológicas en diferentes extractos y en el aceite esencial obtenido de las hojas. Se plantea que posee actividad antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antibacteriana, antiviral, neurosedante, antiulcerosa entre otras.³⁸

Varios autores han demostrado la actividad biológica mediante ensayos realizados a los extractos de la hoja de *L. Alba* los cuales se indica en el anexo 6.

I.5 Infusiones

Es un método de extracción y a su vez una manera de elaborar bebidas, en la que se ocupan, generalmente, las partes blandas o secas de las hojas o flores de las hierbas aromáticas. Permite la extracción de los metabolitos hidrosolubles al añadir agua en su punto de ebullición sobre la droga cruda, para posteriormente, dejar reposar de cinco a quince minutos.³⁹

I.6 Requisitos de hierbas aromáticas

Las normas INEN 2392:2013⁴⁰ documentan que las hierbas aromáticas deben cumplir con algunos límites establecidos como los que se detallan en los anexos 7 y 8.

I.7 Envasado y rotulado

Según indica la normativa INEN 2392:2013, el material de la bolsita filtrante debe ser adecuado para el uso que se dará y a su vez cumplir con las especificaciones establecidas por el Codex Alimentarius, legislación nacional, FDA (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y otros organismos. El embalaje debe realizarse en condiciones tales que garantice se mantengan las características durante el almacenamiento, transporte y expendio del producto.⁴⁰

El rotulado a realizar en la caja de embalaje del producto está establecido en el reglamento técnico ecuatoriano RTE INEN 022, además, debe indicar en el envase la preparación del producto. El producto terminado no debe adjuntar en su rotulado indicación terapéutica ni descripción de característica que no han sido comprobadas.⁴⁰

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Cosecha de las materias primas vegetales

Se efectuaron dos cosechas de las hojas de *M. oleifera* en las instalaciones de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, las cuales fueron realizadas el 2 y 9 de Octubre del 2018 (20 meses de crecimiento), iniciando la recolección a las 08:00 am y finalizando a las 09:30 am. Al momento de cosechar las hojas, la planta estaba en estado fenológico de germinación.

De igual manera se realizó la cosecha de las hojas de *C. citratus* y *L.alba* en la localidad de Vernaza-Bebo del cantón Salitre la cual fue realizada el 16 de Septiembre del 2018, iniciando la recolección a las 12:00 pm y finalizando a las 2:00pm.

II.2 Tratamiento postcosecha de las drogas vegetales

El tratamiento que se le realizó a las hojas de las tres plantas fue el siguiente: se lavaron y desinfectaron en una mezcla de 20 L de agua potable añadiendo 15 mL de NaClO sumergiendo las hojas durante dos minutos. Se realizó un primer secado en secadores artificiales a temperatura ambiente por 3 días para las hojas de *M. oleifera* en cambio para las hojas de *C. citratus* y *L.alba* se colocaron por 5 horas.

Posteriormente, se procedió a desprender las hojas de moringa de sus raquis tomando en cuenta que las hojas no deben estar deterioradas, ni de color amarillo. Así mismo se desprende las hojas de mastranto del tallo y las hojas de la hierba luisa se trocearon en fragmentos no muy pequeños.

Para finalizar se procedió a colocar las hojas de *M. oleifera* en las bandejas de acero inoxidable ubicándose en la estufa (MEMMERT) con las siguientes condiciones; a una temperatura de 40 °C. Las hojas de *C. citratus* - *L. alba* se colocó a una temperatura de 35 °C con ventilación lo que permitió la circulación del aire forzado y trampilla abierta durante 20 horas. Después del tiempo transcurrido se colocaron las hojas de las tres plantas en fundas de cierre hermético y se almacenaron a temperatura ambiente.

La molienda se le realizó a las tres drogas vegetales crudas en un molino artesanal (MAGRICO) donde se utilizó un tamiz con un diámetro de 1mm. Las drogas trituradas fueron almacenadas en un lugar fresco y en recipiente de vidrio con tapa de rosca para garantizar hermeticidad y conservación de metabolitos.

II.3 Técnicas de análisis fisicoquímicos de las drogas crudas

II.3.1 Determinación de humedad

Se utilizó el analizador de humedad (OHAUS MB90) donde se colocó, aproximadamente, 2 g de cada muestra. El equipo automáticamente procedió a secar la droga a 105 °C hasta obtener una masa constante. Este proceso se realizó por triplicado reportándose el valor medio y la desviación estándar.

II.3.2 Determinación de cenizas totales

La determinación de la materia inorgánica total se realizó por triplicado. Se debe tener previamente tarados los crisoles que se van a utilizar, luego se pesó, aproximadamente, 2 g de muestra en el crisol.

Se procedió a colocar los crisoles en la mufla a una temperatura entre 700 – 750 °C por dos horas. Transcurrido ese tiempo se retiraron los crisoles de la mufla y se los llevó al desecador por 30 minutos. Luego de esperar el tiempo requerido se pesaron los crisoles. Se repite el procedimiento anterior hasta obtener un peso constante (no difieran en más de 0,5 mg de peso). Para obtener los resultados se realizaron los cálculos utilizando la siguiente fórmula:

$$C_T = \frac{C_2 - C}{C_1 - C} \times 100$$

CT: Porcentaje de cenizas totales

C: masa del crisol vacío (g)

C₁: masa del crisol más la muestra (g)

C₂: masa del crisol con la ceniza (g)

100: factor matemático

II.3.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Una vez obtenido el peso constante de las cenizas totales se añadieron 2 mL de ácido clorhídrico al 10%. Se procedió a tapar los crisoles con la luna de reloj y se colocaron a baño maría por 10 minutos. A continuación, se retiraron los crisoles del baño, se lavaron las lunas de reloj con 5 mL de agua destilada caliente y se añadió al crisol. Luego se filtró con papel libre de cenizas y se realizaron varios lavados con agua destilada caliente. Se le añadieron dos gotas de AgNO₃ al residuo para comprobar la ausencia de cloruros. Una vez

realizado el paso anterior se colocó el papel filtro con su residuo en el crisol inicial y se llevó a la mufla a una temperatura de 700 – 750 °C por 2 horas.

Transcurrido el tiempo se retiraron los crisoles y se colocaron en el desecador por 30 minutos para luego pesarlos. Este proceso se repitió hasta obtener un peso constante. Para obtener los resultados se realizaron los cálculos utilizando la siguiente fórmula:

$$C_A = \frac{C_2 - C}{C_1 - C} \times 100$$

CA: porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

C: masa del crisol vacío (g)

C₁: masa del crisol más la muestra (g)

C₂: masa del crisol con ceniza (g)

100: factor matemático

II.4 Determinación de minerales

Se realizó el análisis foliar a las tres drogas vegetales en el Laboratorio de análisis agrícola NEMALAB S.A. El método que se utilizó fue el de digestión húmeda en el cual se determinó el porcentaje de minerales presente en las hojas de *M. oleifera*, *C. citratus*, *L. alba*.

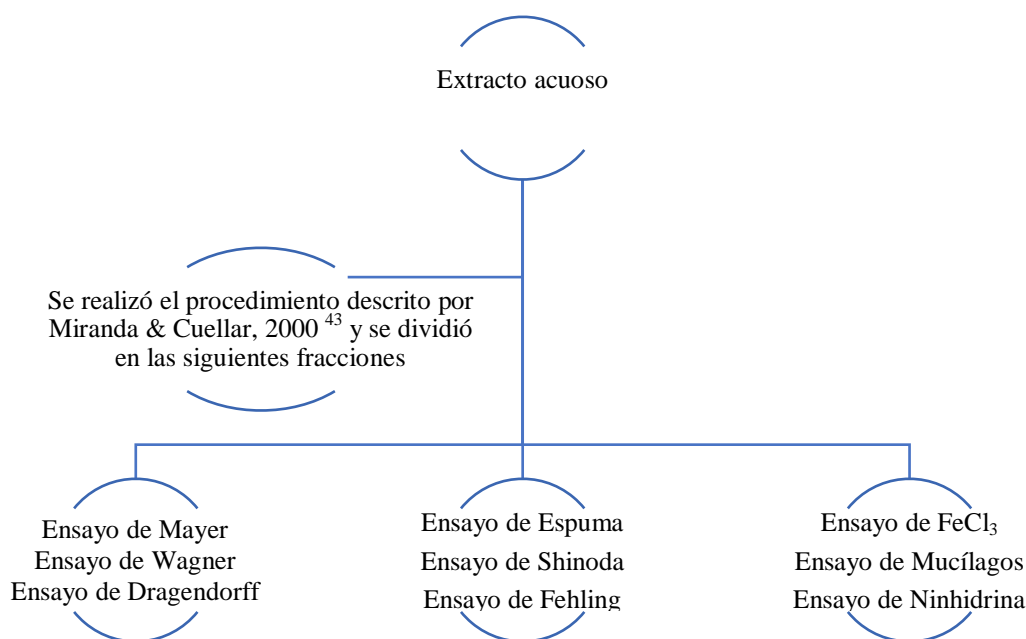
II.5 Determinación de arsénico y plomo

Se realizó en el laboratorio AVVE, siguiendo la metodología MMQ-AAS-04 para determinar As, y la metodología MMQ-AAS-28 para el Pb. Se tomó como referencia la Norma NTE INEN 2392:2017 – 04 Segunda Revisión para hierbas aromáticas.

II.6 Tamizaje fitoquímico

Se elaboraron extractos a partir de 15 gramos de cada droga cruda y se le añadieron 150 mL de agua destilada. La extracción se realizó por maceración ultrasónica durante 30 minutos y se filtró. En la figura 1 se muestran los ensayos realizados en los extractos acuosos de cada una de las drogas siguiendo la metodología de Miranda & Cuellar (200).⁴¹

Figura 1 Ensayos realizados al extracto acuoso de las tres especies



II.7 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Los extractos antes elaborados fueron analizados por CCD utilizando como fase estacionaria placas de Sílica gel GF₂₅₄. Se desarrolló la corrida utilizando como fase móvil BAW (Butanol – Ácido acético – Agua) en proporciones 65:25:10.

Luego de la corrida se procedió a sacar la placa de Sílica gel GF₂₅₄ de la cámara de vidrio y se secó a temperatura ambiente en la campana extractora de vapores. Los sistemas de revelado se muestran a continuación.

- Físico utilizando una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 254 nm y 365 nm lo cual indica que tiene grupo cromóforos conjugados.
- Mixto
 - ✓ H₂SO₄ al 50% / calor/vainillina al 1%/ calor
 - ✓ FeCl₃ al 5%
 - ✓ Ninhidrina al 0,2% en acetona/ácido acético (gotas) /calor
 - ✓ 2,2 difenil - 1 - picrilhidracilo (DPPH) al 2% en MeOH

II.8 Determinación de proteínas

II.8.1 Preparación de la muestra

Se pesó, aproximadamente, 1 g de cada droga cruda (*M. oleifera*, *C. citratus*, *L. alba*), se transfirió a un balón aforado y se le añadió 50 mL de H₂O destilada. Luego el balón se

llevó al baño ultrasónico por 30 minutos para hacer una maceración como proceso de extracción y para finalizar se filtró.

II.8.2 Procedimiento del ensayo

El ensayo de cuantificación de proteínas se realizó a través del método de Bradford. Este método se basa en cuantificar la unión del colorante azul de coomassie G-250 a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar, en este caso albúmina de suero Bovino (ASB).⁴²

El ensayo se realizó por triplicado y para la cuantificación de proteínas se elaboró una curva de calibración con albúmina de suero bovino (ASB) en concentraciones de 2,27 µg/mL a 13,64 µg/mL.

En los tubos de ensayo se colocaron 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µL del patrón (ASB a 0,5 mg/mL) y se completó con agua destilada hasta 200 µL en cada tubo. Para el blanco se colocaron 200 µL de H₂O destilada y para las muestras se tomaron 50 µL del extracto y 150 µL de H₂O destilada. En todos los casos se añadieron 2 mL del reactivo de Bradford, se homogenizó la mezcla en el Vortex y se esperaron dos minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (UV- Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 595 nm.

Con los resultados de la curva de calibración se realizó el análisis de regresión lineal donde se obtuvo la ecuación:

$$\text{absorbancia} = 0,0356573 + 0,0276514 * \text{concentración}$$

El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,992646.

II.9 Determinación del contenido total de flavonoides por el método colorimétrico de cloruro de aluminio.

II.9.1 Preparación de la muestra

Se pesó aproximadamente 0,05 g de extracto seco de las tres drogas crudas y se los transfirió a un balón aforado de 10 mL donde se le añadió H₂O destilada hasta aforar.

II.9.2 Procedimiento del ensayo

Para la curva de calibración se utilizó como estándar quercetina en concentraciones de 25 y 125 µg/mL.

De las diferentes concentraciones del estándar y de las muestras (extractos) se tomaron 0,5 mL y se mezclaron con 1,5 mL de H₂O destilada en tubos de ensayo. A los mismos se le añadieron 100 µL de cloruro de aluminio, 100 µL de acetato de potasio y por último 2,8 mL de H₂O destilada. Los distintos tubos se los dejó reposar por 40 minutos a temperatura ambiente, para, posteriormente, efectuar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

Con los resultados de la curva de calibración se realizó el análisis de regresión modelo lineal donde se obtuvo la ecuación:

$$\text{absorbancia} = -0,0182 + 0,00728 * \text{concentración}$$

El coeficiente de regresión lineal fue de: 0,998.

II.10 Cuantificación de fenoles totales

II.10.1 Preparación de la muestra

Se pesó, aproximadamente, 1g de cada droga cruda (*M. oleifera*, *C. citratus*, *L. alba*) y se transfirió a un balón aforado al que se le añadió 50 mL de H₂O destilada y se llevó al baño ultrasónico por 30 minutos para hacer una maceración como proceso de extracción.

II.10.2 Procedimiento del ensayo

La determinación de fenoles totales en los extractos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita por Singleton *et al*, 1999, con algunas modificaciones. Se tomaron 50 µL de muestra, patrón (ácido gálico) y en el caso del blanco, agua destilada y se colocaron en tubos de ensayo de, aproximadamente, 10 mL de capacidad. Se le adicionaron 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (10%) y 450 µL de agua destilada. Todos los tubos se los pasó por el agitador Vortex, se esperó 5 minutos y posteriormente, se añadieron 2 mL de Na₂CO₃ (7,5%) a todos los tubos, homogeneizando nuevamente con el agitador Vortex. Luego de transcurridas 2 horas se efectuó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda 765 nm.

Se realizó la cuantificación mediante una curva de calibración con ácido gálico (Sigma Aldrich) en concentraciones entre 0,1 y 0,9 mg/mL. Cada una de las diluciones y las muestras se analizaron por triplicado. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación como resultado:

$$\text{absorbancia} = -0,0182 + 0,00728 * \text{concentración}$$

El coeficiente de correlación obtenido fue de: 0,998535

II.11 Elaboración del extracto acuoso seco

Se pesaron 20 g de cada droga cruda y se transfirieron a un matraz de manera individual, se agregaron 25 mL de H₂O destilada y se llevó al baño ultrasónico por 30 minutos. Posteriormente, se filtró el extracto y se realizó nuevamente la extracción por sonicación con 25 mL de H₂O destilada y se filtró. Los extractos obtenidos de una misma droga se mezclaron y concentraron a sequedad en un rotaevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001) el mismo que para su funcionamiento tiene acoplado el criostato (LAUDA ALPHA RA8) y bomba de vacío de diafragma (VACUUBRAND PC600).

Para cada uno de los extractos obtenidos se realizó el cálculo del porcentaje de rendimiento.

II.12 Determinación de la capacidad antioxidante secuestradora de radicales libres frente al 2,2 difenil - 1 - picrilhidracilo (DPPH)

II.12.1 Preparación de la muestra

Se pesó 0,01g del extracto seco y se diluyó volumétricamente en 10 mL de agua destilada, para lograr una concentración de 1 mg/mL.

II.12.2 Procedimiento del ensayo

Se preparó el DPPH a una concentración de 0,1 mM usando como disolvente metanol, el que se puso a reaccionar con distintas concentraciones de extractos acuosos de las hojas de *M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba*.

De la muestra preparada a una concentración de 1 mg/mL, se prepararon diluciones acuosas de concentraciones 0,025; 0,050; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 mg/mL. De las diferentes diluciones se tomaron 500 µL y se mezclaron con 1,5 mL de DPPH, se homogeneizó debidamente con un agitador Vortex y se esperaron 30 minutos bajo condiciones de oscuridad. Finalmente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 516 nm.

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente fórmula a las tres drogas vegetales:

$$\% DPPH = \frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \times 100$$

A_{blanco} : Absorbancia del DPPH

A_{muestra} : Absorbancia de la muestra

100: factor matemático

La actividad antioxidante de cada droga cruda se la determinó mediante la concentración inhibitoria media IC_{50} que indica la concentración requerida por cada muestra para disminuir la absorbancia del DPPH al 50%.

Para el dicho cálculo se graficó la concentración vs porcentaje de inhibición y la IC_{50} se la realizó mediante un análisis de regresión lineal.

II.13 Diseño de formulación

Las formulaciones se realizaron mediante un diseño experimental completamente al azar, teniendo como variable independiente el porcentaje de cada droga cruda en la formulación tanto de *M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba* tal como se observa en la tabla 4. Se utilizó como variable dependiente la respuesta sensorial de 30 jueces que consumieron las combinaciones, aplicando una prueba de preferencia por ordenamiento.

Tabla 4 Diseño experimental completamente al azar

| Variantes | <i>M. oleifera</i> | <i>C. citratus</i> o <i>L. alba</i> |
|-----------|--------------------|-------------------------------------|
| A | 80 | 20 |
| B | 70 | 30 |
| C | 60 | 40 |

Para seleccionar la mejor formulación se trabajó con el programa *Statgraphics Centurion XVII* en donde, con los resultados de la prueba de preferencia por ordenamiento, se realizó un análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples.

La formulación con mayor agrado por parte de los jueces fue envasada en fundas de papel filtro sellable, con ayuda de una envasadora automática para bolsitas de té (ECUAPACK) de dosificación fija.

II.14 Control de calidad de las infusiones

II.14.1 Determinación del peso promedio

Para este parámetro se calculó el peso promedio de 20 bolsitas de té en donde se procedió a pesar en la balanza analítica (RICE LAKE TA-200).

II.14.2 Determinación de grados Brix, índice de refracción, azúcar invertida, glucosa y fructosa

Se realizó la prueba por triplicado utilizando un refractómetro (ANTON PAAR) en donde se colocó una gota de la infusión moringa/mastranto y moringa/hierba luisa en la cámara de lectura del equipo. Los resultados refieren el valor medio/desviación estándar para cada infusión.

II.14.3 Determinación de pH

Para la determinación se utilizó el pH-metro (FISHERBRAND ACCUMET AE150), previamente calibrado. Los resultados responden a la media de tres determinaciones/desviación estándar.

II.14.4 Determinación de densidad relativa

Se pesó el picnómetro vacío y seco utilizando una balanza (Rice Lake TA series), se procedió a llenarlo con cada una de las muestras y se dejó reposar por quince minutos a la temperatura de 25 °C (± 1 °C). Luego de retirar el exceso con papel de filtro, se secó el picnómetro por fuera y se procedió a pesar. Dicho procedimiento también fue realizado con H₂O destilada para realizar los cálculos correspondientes. El ensayo se efectuó por triplicado en cada infusión, reportando media/desviación estándar.

Para tener como resultado la densidad relativa se aplicó la siguiente fórmula:

$$Dr = \frac{P_1 - P}{P_2 - P}$$

Dr: densidad relativa

P: peso del picnómetro vacío (g)

P₁: peso del picnómetro con muestra (g)

P₂: peso del picnómetro con H₂O destilada (g)

II.14.5 Determinación de fenoles al producto terminado por el método de Folin-Ciocalteu

Se le realizó a las ambas combinaciones siguiendo el mismo procedimiento del ensayo anteriormente descrito en el epígrafe II.10.

II.14.6 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) al producto terminado

Se realizaron ambas infusiones y el procedimiento empleado fue el mismo descrito en el epígrafe II.12.

II.15 Análisis estadístico

Se realizó mediante EXCEL 2013 para calcular la media y desviación estándar. El análisis de regresión modelo lineal se determinó con el programa *Statgraphics Plus versión 5.0*. Dicho paquete estadístico también permitió estimar si existían diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los parámetros evaluados, a través del análisis de varianzas y del test de rangos múltiples.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Análisis físico-químico de las drogas crudas

El objetivo en que se centra dicha investigación es el diseño de dos formulaciones para preparar como infusiones, usando hojas de *M. oleifera* combinadas con hojas de *L. alba* y *C. citratus*, de manera independiente.

Como todo trabajo que inicia con la cosecha de la materia prima, se deben realizar una serie de procesos que satisfagan las exigencias actuales de las entidades internacionales, en cuanto a seguridad, calidad y eficacia, como lo indica la normativa vigente INEN 2392:2013.⁴⁰

Luego de la recolección, todas las materias primas vegetales frescas se sometieron a un minucioso proceso de selección, donde se eliminaron hojas que no cumplieron con la calidad física requerida. Posteriormente, se procedió al lavado y desinfección para eliminar materias extrañas como tierra, polvo, insectos; de esta manera se pueden evitar daños de los metabolitos activos presentes en las materias primas.

Las hojas de moringa se secaron primero a la sombra y en un segundo instante a la estufa. De esta manera primero se eliminó el exceso de agua y en segundo lugar, se facilitó la separación de las hojas de los raquis. Se lograron hojas secas con un color verde intenso muy similar al material vegetal fresco como se muestra en el anexo 9.

Con relación a las hojas de hierba luisa y mastranto, se fue muy cuidadoso en el proceso de secado, pues ambas plantas se caracterizan por la presencia de aceites esenciales. Por tal motivo la temperatura de secado fue inferior (35 °C), con el objetivo de evitar la volatilización de los aceites esenciales necesarios como correctores del sabor y olor de las bebidas.

El secado en una estufa con recirculación de aire forzado, favoreció la velocidad de dicho proceso y contribuyó a la preservación de las características físico-químicas de la droga cruda.³ Una vez secas se molieron las drogas vegetales y se almacenaron en fundas de nylon herméticas en un lugar, oscuro, fresco y seco, para garantizar su conservación hasta la correspondiente evaluación de la calidad.

En la tabla 5 se observan los valores de humedad residual, cenizas totales y cenizas insolubles en HCl al 10% que se obtuvieron luego de realizar el procedimiento correspondiente a cada droga.

Tabla 5 Análisis físico-químico de las drogas crudas

| DROGAS CRUDAS | PARÁMETROS | | |
|--------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| | Humedad residual | Cenizas totales | Cenizas insoluble en HCl |
| | Media/DS | Media/DS | Media/DS |
| <i>M. oleifera</i> | 6,42% / 0,00 | 10,41% /0,06 | 1,94% /0,68 |
| <i>C. citratus</i> | 8,70% / 0,09 | 8,64% /0,32 | 4,71% /0,26 |
| <i>L. alba</i> | 10,91% / 0,27 | 11,19% /0,07 | 6,94% /0,12 |

La humedad residual es un parámetro farmacognóstico de mucha importancia ya que este permite establecer la calidad de la droga cruda. Si la droga no cumple con el porcentaje establecido puede que se promueva el crecimiento de microorganismos, hongos, insectos, así mismo podría ocurrir el deterioro de la droga con la consecuente alteración de su composición química.

El porcentaje de humedad de las tres drogas *M. oleifera*, *C. citratus*, *L. alba* se encuentra dentro del rango establecido por la Norma INEN 2392:2013 para hierbas aromáticas que tiene como límite máximo un 12%. Además, se revisaron literaturas donde se encontró que el porcentaje de humedad de las hojas de *M. oleifera* fue de 12,63% el mismo que también es aceptado en la farmacopea española, aunque este valor se encuentra elevado comparado al de nuestra droga, aspecto lógicamente relacionado con la efectividad del proceso de secado.⁴³

Otro parámetro que se analizó fue el de cenizas totales. Las cenizas contienen los elementos inorgánicos, muchos de ellos son de interés nutricional como el calcio, sodio, magnesio y fósforo. El resultado de este parámetro guarda estrecha relación con el suelo donde se cosecharon las drogas. En muchas ocasiones se pueden acumular en el suelo metales pesados, los mismos que afectan a la salud humana, aspecto que debe ser determinado siempre que los niveles de cenizas insolubles en ácido rebasen los límites permitidos por las monografías.⁴⁴

Según lo que indica la Farmacopea Española 2^{da} edición, el valor de las cenizas totales no debe ser mayor al 12%. De igual manera el porcentaje de cenizas totales que indica la FAO⁴⁵ (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) para *L. alba* y *C. citratus* es de 12% y 8%. Respectivamente tomando en consideración lo antes expuesto las drogas objeto de estudio presentan valores cercanos a lo establecido en las diferentes normativas.

Al comparar las cenizas totales de las hojas de *M. oleifera* con los valores obtenidos por Guaycha *et al.* (2017)⁴³, Burgos *et al.* (2018)³ y Sojos *et al.* (2107)²: 9,76%, 9,46% y 8,65%, respectivamente, estos resultan ser inferiores a los obtenidos en este estudio y a su vez están dentro del rango que indica la Farmacopea Española 2^{da} edición.

Con respecto a los resultados de las cenizas insolubles en HCl al 10% la única droga cruda que cumple con el porcentaje establecido en la Norma INEN 2392:2013 para hierbas aromáticas es la *M. oleifera*. Las dos drogas crudas restantes presentan valores superiores a lo indicado, lo que sugiere la necesidad de descartar la presencia de metales pesados.

Tomando en consideración los elevados valores de cenizas totales se procedió a la cuantificación, no solo de los minerales beneficiosos, sino también de aquellos que podrían ser dañinos para el organismo, sobre todo, a largo plazo por efecto acumulativo.

III.2 Determinación de minerales

El análisis foliar es un método de diagnóstico que determina el contenido de nutrientes que se encuentran en las hojas y de manera indirecta evalúa la fertilidad del suelo. Los objetivos de realizar el análisis foliar son: realizar a tiempo correcciones de fertilización durante el ciclo de crecimiento, confirmar un diagnóstico a partir de síntomas visibles, identificar carencias ocultas que aún no producen síntomas y determinar los nutrientes que ha absorbido la planta.⁴⁶ Lógicamente, al cuantificar estos elementos inorgánicos no solo se está evaluando la calidad del suelo y su influencia en el vegetal, sino que también puede conocerse el aporte que estas materias primas tendrían para el humano, una vez que se consuman.

El contenido de minerales de las hojas secas de *M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba* se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Minerales presentes en las hojas secas de las drogas

| DROGAS CRUDAS | % en materia seca | | | | | p.p.m mg/kg | | | | | |
|------------------|-------------------|------|------|------|------|-------------|------|-------|------|-------|------|
| | N | P | K | Ca | Mg | Zn | Cu | Fe | Mn | Na | B |
| M. oleífera | 1,57 | 0,19 | 1,82 | 0,84 | 0,24 | 23,7 | 10,8 | 239,8 | 48,2 | 85,2 | 13,5 |
| C. citratus | 5,15 | 0,46 | 2,14 | 1,82 | 0,25 | 28,5 | 15,2 | 155,9 | 65,5 | 122,3 | 18,9 |
| L. alba | 3,59 | 0,69 | 1,68 | 2,03 | 0,34 | 26,5 | 35,5 | 745,9 | 74,3 | 153,2 | 22,1 |

Según los valores presentados se puede observar que la *L. alba* es la que presenta mayor contenido de minerales, tanto de macro y micro elementos, a excepción del N y el K. Lo anterior guarda relación con el porcentaje de cenizas totales antes referido en la tabla 5, donde dicha especie fue la que presentó mayor valor (11,19 %).

Se realizó una comparación del contenido de minerales en las hojas de *M. oleifera* con los que reportan otros autores para dicha droga cosechada en el mismo sitio, solo que en épocas diferentes y con diferente grado de madurez (tabla 7).

Tabla 7 Minerales presentes en *M. oleifera* reportado por otros autores

| DROGA CRUDA | % | | | | | p.p.m mg/kg | | | | |
|--|------|------|------|------|------|-------------|------|-------|-------|------|
| | N | P | K | Ca | Mg | Zn | Cu | Fe | Mn | B |
| <i>M. oleifera</i> (Bastidas <i>et al.</i> , 2017) ² | 3,20 | 0,33 | 2,67 | 0,92 | 0,23 | 18,60 | 9,10 | 78,50 | 49,00 | - |
| <i>M. oleifera</i> (Burgos <i>et al.</i> , 2018) ³ | 3,82 | 0,45 | 2,58 | 2,43 | 0,26 | 18,60 | 12,2 | 114,9 | 39,4 | - |
| <i>M. oleifera</i> Droga actual | 1,57 | 0,19 | 1,82 | 0,84 | 0,24 | 23,7 | 10,8 | 239,8 | 48,2 | 13,5 |

Como se puede apreciar los niveles de N, P, K y Ca resultan ser inferiores en la droga actual en comparación con los referidos en los dos trabajos citados ^{2,3}. Sin embargo, los valores de los micro elementos de la droga actual, en particular Zn y Fe se encuentran superiores a los de los autores referidos ^{2,3}. Tomando en cuenta que las tres drogas se cosecharon en el mismo lugar, esto puede ser por diversos factores como la edad de recolección ya que la primera cosecha fue a los 3 meses de crecimiento, la siguiente a los 15 meses y la de la droga actual a los 20 meses. También pudieran estar asociados al estado fisiológico del vegetal.

Existen varios factores que influyen en los resultados del análisis foliar como por ejemplo el correcto muestreo. Para esta técnica se debe tener en cuenta la localización de la hoja

que será recogida, sugiriéndose sea a una altura media entre 1 a 1,5 m y que tenga una coloración normal. La época en que se debe tomar la muestra también puede influir, para lo cual es recomendable que se encuentre de 100 a 150 días después del estadio de floración, la hora del día y las condiciones climáticas.⁴⁷ El estudio de estos aspectos fue sugerido a los ingenieros agrónomos, sobre todo, para el correcto cuidado de la moringa que se cultiva en los terrenos de la UACA. Con ellos se tendría un insumo más para decidir la mejor época de recolección de la especie, si se desea aprovechar de ella el contenido de minerales.

Realizando una comparación de los resultados obtenidos para las hojas de hierba luisa en estudio, con los valores referidos por Uraku *et al.* (2015)⁴⁸, se pueden apreciar valores superiores de micronutrientes a los de la droga actual, como se muestra en la tabla 8. La diferencia de resultados puede ser, sobre todo, por el lugar de cosecha el cual se dio en Nigeria.

Tabla 8 Minerales presentes en *C. citratus* reportado por otro autor

| DROGA CRUDA | p.p.m mg/kg | | | | |
|---|-------------|------|-------|------|-------|
| | Zn | Cu | Fe | Mn | Na |
| <i>C. citratus</i> (Uraku <i>et al.</i> , 2015) ⁴⁸ | 30 | 390 | 110 | 2570 | 410 |
| <i>C. citratus</i> Droga actual | 28,5 | 15,2 | 155,9 | 65,5 | 122,3 |

En relación al análisis foliar de *L. alba*, Schroeder *et al.* (2013) ha referido los macro y microelementos que se muestra en la tabla 9.

Tabla 9 Minerales presentes en *L. alba* reportado por otro autor

| DROGA CRUDA | % | | | p.p.m mg/kg | | | |
|--|------|------|------|-------------|------|-------|------|
| | N | P | K | Zn | Cu | Fe | Mn |
| <i>L. alba</i> (Schroeder <i>et al.</i> , 2013) ⁴⁹ | 2,6 | 0,4 | 3 | 70 | 50 | 350 | 150 |
| <i>L. alba</i> Droga actual | 3,59 | 0,69 | 1,68 | 26,5 | 35,5 | 745,9 | 74,3 |

Como se observa en la tabla 9 los valores de macro elementos de la droga en estudio difieren con respecto a los referidos por Schroeder *et al.* (2013).⁴⁹ En cambio los valores

de micro elementos de la droga actual son inferiores a los del autor excepto Fe ya que su resultado fue de 745,9 p.p.m. Las diferencias pueden ser atribuidas a los factores antes referidos para moringa y hierba luisa, teniendo en cuenta, sobre todo, que la droga con la que se compara fue cosechada en Argentina, donde existen diversos aspectos asociados al entorno que pudieran estar influyendo en el resultado.

De las tres drogas analizadas el mineral que se presenta en mayor cantidad fue el hierro, elemento esencial para los seres humanos, porque está presente en las funciones enzimáticas que involucran el metabolismo energético, transporte de oxígeno y síntesis de ADN. Así mismo si al hierro se lo consume en exceso podría producir daños estructurales en el ADN, lípidos y proteínas ya que es tóxico. Del total de hierro que la persona ingiere en su dieta diaria se pierde solo una pequeña proporción ya sea en la descamación celular, orina, sudor y heces, por esta razón se debe consumir un aporte pequeño para reponer la pérdida del mineral. Se recomienda ingerir de 10 a 20 mg de hierro en la dieta diaria ya que se lo utiliza en múltiples biomarcadores para saber su estatus en el organismo. Una de las enfermedades que se presenta en la población es la anemia, la cual pudiera estar ocasionada por el déficit de hierro en su ingesta diaria.⁵⁰

III.3 Determinación de arsénico y plomo

Generalmente, los metales pesados mercurio, cadmio, cromo, talio, plomo, arsénico, entre otros se encuentran como componentes de la corteza terrestre en forma de sales, minerales y otros compuestos. Los metales pesados son de gran importancia ya que algunos son esenciales para las células, pero a su vez en altas concentraciones son tóxicos para los seres vivos.⁵¹

Los resultados obtenidos para el contenido de contaminantes fueron igual para *C. citratus* y *L. alba* a diferencia de *M. oleifera*, que mostró un valor superior en el parámetro de plomo con relación al de las dos especies mencionadas anteriormente (tabla 10).

Tabla 10 Resultado de los contaminantes presentes en *M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba*

| Parámetro | Resultados | |
|--------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| | <i>M. oleifera</i> | <i>C. citratus</i> / <i>L. alba</i> |
| Arsénico mg/kg | < 0,005 | < 0,005 |
| Plomo mg/kg | < 0,09 | < 0,003 |

Los resultados de las tres especies cumplen con lo establecido en la Norma INEN 2392:2013 para hierbas aromáticas donde se indica que para arsénico el límite máximo de contaminante es 1,0 mg/kg y para plomo el límite es de 0,5 mg/kg.

III.4 Tamizaje fitoquímico

Las técnicas de tamizaje tienen gran utilidad desde el punto de vista cualitativo por ser simples, rápidas, diseñadas para un mínimo de equipamiento y razonablemente selectivas para la clase de compuestos en estudio. Un resultado positivo pudiera ser real, aunque hay que considerar la posibilidad de falsos positivos por compuestos que interfieren. De ahí la importancia de la revisión bibliográfica y del conocimiento de las relaciones taxonómicas, que permiten conocer la real posibilidad de tales interferencias. Un resultado negativo debe ser debidamente analizado, ya que puede estar provocado por la ausencia del metabolito en la droga vegetal o por la metodología empleada (Farnsworth *et al.*, 1966).⁵²

Para la realización del tamizaje fitoquímico se informan en la literatura varios esquemas de trabajo, donde se usan diferentes métodos de extracción; sin embargo, en la presente investigación se realizó la evaluación solo en extractos acuosos, debido a que la formulación a elaborar es para consumir en forma de infusión.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico realizado a las tres drogas crudas.

Tabla 11 Tamizaje fitoquímico en el extracto acuoso de las tres especies en estudio

| Ensayo | Metabolitos secundarios | <i>M. oleifera</i> | <i>C. citratus</i> | <i>L. alba</i> |
|-----------------|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Dragendorff | Alcaloides | +++ | - | +++ |
| Mayer | Alcaloides | ++ | - | ++ |
| Wagner | Alcaloides | +++ | - | +++ |
| Cloruro férrico | Compuestos fenólicos | + | + | + |
| Shinoda | Flavonoides | ++ | - | +++ |
| Fehling | Azúcares reductores | + | + | + |
| Espuma | Saponinas | + | - | - |
| Ninhidrina | Aminoácidos libres | ++ | + | + |
| Mucílagos | Mucílagos | - | - | - |

Una vez realizadas las pruebas preliminares a las tres drogas crudas se observó un resultado positivo en la *M. oleifera*, para la mayoría de los ensayos, lo cual sugiere la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, aminoácidos, saponinas y azúcares reductores. Así mismo los resultados de la droga actual concuerdan con lo reportado por Guaycha *et al.* (2017)⁴³ quienes indican la presencia de metabolitos secundarios como lo son alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y principios amargos.

Ensayos fitoquímicos realizados por otros autores del extracto acuoso de *M. oleifera* han evidenciado la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, así mismo ausencia de taninos y saponinas (Torres *et al.*, 2013)⁵³. En cambio Echavarría *et al.* (2016)⁵⁴ reporta la presencia de flavonoides, flavonoles, antocianinas, polifenoles, alcaloides y taninos en un extracto alcohólico (etanol al 70%) de la droga actual.

Con respecto al extracto acuoso de *C. citratus* los ensayos realizados sugieren la presencia de compuestos fenólicos, aminoácidos libres y azúcares reductores. Comparando con los resultados reportados por Geetha *et al.* (2014)⁵⁵ este señala que los principales metabolitos encontrados en el extracto acuoso fueron fenoles, taninos, saponinas, antraquinonas y aminoácidos. Los resultados del autor difieren con los de la droga en estudio en su localización geográfica por lo cual pudiera el clima ser un factor extrínseco que incide en los resultados obtenidos, además del grado de madurez del cual no se tiene información.

El tamizaje fitoquímico para la *L. alba* sugirió la presencia de similares metabolitos a los observados en la moringa, a excepción de las saponinas. Comparando el tamizaje de la *L. alba* con el del autor Murillo *et al.* (2008)⁵⁶ este refiere la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, compuestos fenólicos, terpenos, cumarinas y saponinas. El mastranto objeto de estudio mostró el ensayo de saponinas negativo, sin embargo, para Murillo *et al.* (2008)⁵⁶ la presencia de este metabolito fue positiva. Debe tenerse en cuenta que en este último caso el extracto para realizar el tamizaje lo elaboraron con etanol, por lo que, lógicamente, los metabolitos que pueden ser extraídos pueden ser de mayor diversidad. A lo anterior se añade la localización geográfica de la droga vegetal que procede de Ibagué-Colombia, por lo que factores extrínsecos también pudieran incidir en las variaciones químicas de los extractos.

III.5 Cromatografía en capa delgada (CCD)

El estudio cualitativo de los extractos acuosos se complementa con el análisis por CCD, utilizando reveladores que permitieron sugerir la existencia de diferentes metabolitos.

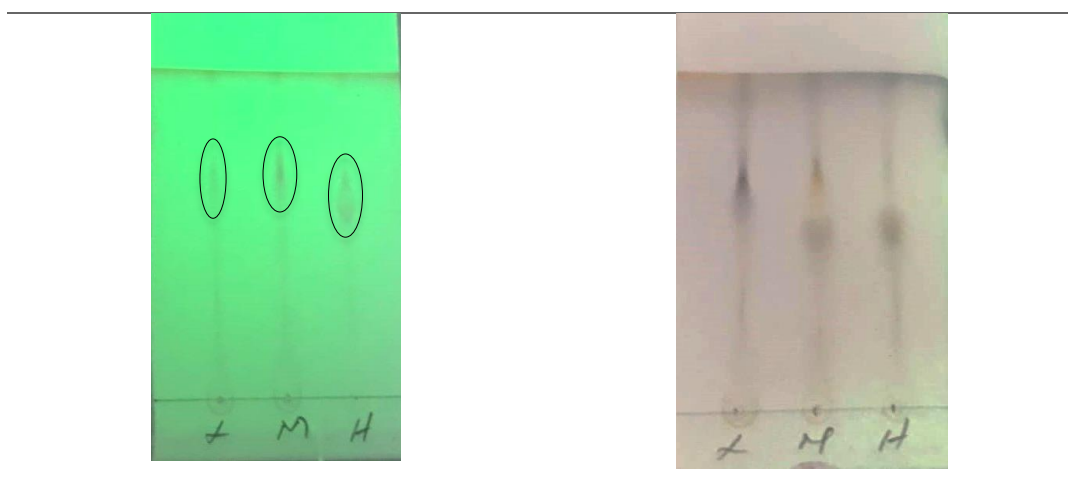
Como se puede apreciar se empleó una fase móvil relativamente común para la separación de productos naturales de elevada polaridad (BAW). La corrida cromatográfica con esta fase móvil se fundamenta en la polaridad que presentan los metabolitos que pudieron ser extraídos, luego de realizar un proceso de extracción con agua.

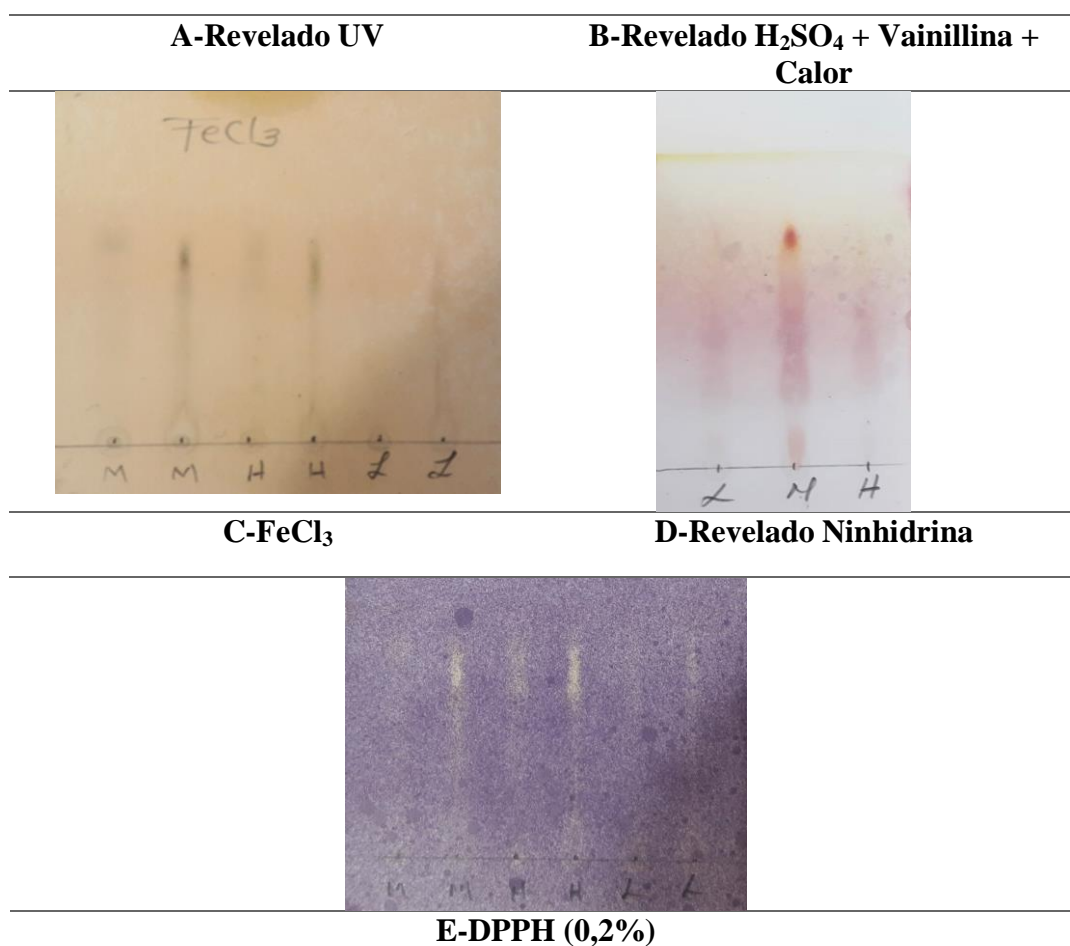
Es importante destacar que los resultados obtenidos por esta técnica no deben ser considerados de un modo absoluto y categórico. Los extractos de plantas se caracterizan por presentar una alta complejidad de acuerdo a la diversidad de metabolitos que presentan, por lo que lograr buenas resoluciones por esta técnica pudiera resultar complicado.

El resultado del análisis realizado se muestra en la figura 2. En cada corrida se puntuaron las tres muestras y en algunas placas, se puntuaron dos cantidades diferentes de un mismo extracto, sobre todo, buscando mayor concentración de los metabolitos a identificar.

Al revelar la placa con luz ultravioleta a 254 nm se observó que en los tres extractos acuosos hay compuestos químicos que presentan en su estructura grupos cromóforos conjugados, los que absorben a esta longitud de onda (figura 2A). Dichos metabolitos revelan con mayor nitidez, en los tres casos, a un Rf absoluto ligeramente superior a 0,5 cm. No obstante, en la moringa y el mastranto se observan ligeras fluorescencias desde el punto de aplicación hasta las manchas antes mencionadas.

Figura 2 Cromatografía en capa delgada de las tres drogas crudas





Nota: L: *L. alba*; H: *C. citratus*; M: *M. oleifera*. Cuando aparecen dos aplicaciones de una misma especie, la segunda corresponde a una mayor cantidad de muestra.

En el revelado con vainillina en medio ácido (B), se puede apreciar que las manchas más notables que revelan bajo tales condiciones tienen un R_f inferior a las manchas que fluorescen con mayor intensidad bajo la luz UV. Es decir, que en los tres extractos existen compuestos químicos que no tienen grupos cromóforos conjugados y que al mostrarse ante este tipo de revelado con una coloración azul discretamente violácea, pudieran corresponder con compuestos de naturaleza terpénica. Dicho revelado, luego de utilizar una fase móvil similar, es descrito por la literatura para la identificación de saponinas (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).⁵⁷ Precisamente algunos autores refieren la presencia de saponinas en la moringa, luego de realizar un tamizaje fitoquímico (Sharma *et al.*, 2012).⁵⁸

Adicional a ello, en el perfil cromatográfico de la moringa en este revelado, se observa una mancha ligeramente amarilla que pudiera sugerir compuestos de naturaleza fenólica, no solo por la coloración sino también porque a igual R_f esa mancha fluoresce a 254 nm.

Con relación al revelado con FeCl₃ se visualizaron algunas manchas, fundamentalmente, las misma zonas que revelaron bajo la luz ultravioleta, lo que sugiere la presencia de compuestos fenólicos.

Para las tres especies objeto de estudio se han referido en diversos artículos la presencia de compuestos fenólicos.^{18,59,60}

Al realizar el revelado con ninhidrina se pudo constatar la presencia de aminoácidos, fundamentalmente, en la moringa. Los aminoácidos suelen dar un color violeta, la prolina e hidroxiprolina dan amarillo y el ácido aspártico exhibe color rojo azulado (Waksmundzka *et al.*, 2008).⁵⁷

Finalmente, se realizó el análisis cromatográfico, pero utilizando como revelador una disolución al 0,2 % de DPPH en etanol. Las imágenes se tomaron luego de 30 min, pues la capacidad secuestradora de radicales libres pudiera desarrollarse paulatinamente en el tiempo (Brand-Williams *et al.*, 1995).⁶¹ Como se puede apreciar los tres extractos acuosos muestran actividad antioxidante por secuestro del radical libre DPPH, sobre todo, en aquellas zonas donde se apreció el revelado con la luz ultravioleta a 254 nm y con el FeCl₃. Los resultados refuerzan los obtenidos mediante el tamizaje fitoquímico con respecto a la identificación, sobre todo, de compuestos fenólicos y aminoácidos.

III.6 Cuantificación de proteínas, fenoles totales y flavonoides totales

En la tabla 12, se presentan los resultados correspondientes a la cuantificación de metabolitos de gran importancia desde el punto de vista nutricional y terapéutico, que serían las proteínas, fenoles totales y flavonoides. Las tres determinaciones se realizaron a partir de extractos acuosos, tomando en consideración que los beneficios de ambas infusiones estarían atribuidos a los compuestos hidrosolubles.

Tabla 12 Cuantificación de proteínas, fenoles totales y flavonoides en las tres drogas crudas

| | <i>M. oleifera</i> Media/ DS | <i>C. citratus</i> Media/ DS | <i>L. alba</i> Media/ DS |
|--|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Proteínas mg/100g de droga cruda | 35,99 ^a / 0,89 | 0 / 0 | 14,07 ^b / 0,38 |
| Fenoles mg EAG/100 g de droga cruda | 2127,35 ^c / 92,86 | 1048,05 ^d / 40,93 | 1335,86 ^e / 15,88 |

| | | | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Flavonoides µg EQ/g ES | 37,61 ^f / 0,42 | 32,61 ^g / 0,82 | 38,16 ^f / 1,48 |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|

Nota: letras diferentes para un mismo parámetro significa que hay diferencias estadísticas significativas.

En la cuantificación de proteínas se puede apreciar que los valores de *M. oleifera*, *L. alba* muestran diferencias significativas entre las media de las dos drogas, lo cual fue determinado a través del *test* de ANOVA. Así mismo al realizar la prueba de rango múltiple se confirmó dicha diferencia con un nivel de confianza del 95%. De igual manera se puede observar que el contenido de fenoles totales muestra diferencia significativa para *M. oleifera*, *L. alba* y *C. citratus* una vez realizado el test de ANOVA y de rango múltiple.

Al realizar la comparación estadística para la cuantificación de flavonoides totales se pudo apreciar que, entre *M. oleifera* y *L. alba* no existen diferencias estadísticas significativas, lo cual fue determinado en el test de rango múltiple. Dicha prueba demostró que el extracto de *C. citratus* presenta una cantidad de flavonoides significativamente inferior desde el punto de vista estadístico con relación a los dos extractos restantes.

Una de las características más relevantes en la moringa es su contenido proteico, sobre todo en las hojas, aspecto que justifica el uso de las hojas en estados de desnutrición (Fuglie *et al.*, 2001). Según Olson *et al.* (2011)¹⁴ el contenido proteínico en las hojas secas suele ser de hasta el 30% de su peso, incluso la mayor parte de sus proteínas parece ser directamente asimilable. Destaca el hecho que muchas plantas muestran un contenido elevado en proteínas, fundamentalmente, en sus frutos, sin embargo, la moringa presenta dicho nutriente en sus hojas, biomasa presente todo el año.

Generalmente, los datos de proteínas que se reportan en la literatura se obtuvieron a través del método de Kjeldahl, el que se basa en la determinación del nitrógeno orgánico. El resultado del análisis es una aproximación del contenido de proteína cruda del alimento ya que el nitrógeno puede ser encontrado en metabolitos de carácter no proteico.

Según los estudios actuales el contenido de proteínas totales para las hojas *M. oleifera* fue de 35,99 mg/100 g de droga cruda, comparando los resultados con el del autor Burgos *et al.* (2018) que fue 27,67 mg/100g, resulta inferior al de la droga en estudio, tomando en cuenta que la droga fue cosechada en el mismo lugar. Así mismo Tesfay *et al.* (2011)⁶² refiere que siguiendo la metodología del ensayo de Bradford tuvo una alta concentración

de proteínas totales con un valor de 76,1 mg/g, sin embargo, la preparación de la muestra resultó ser diferente. En la droga objeto de estudio simplemente se hace una cuantificación de las proteínas que se solubilizan en el extracto acuoso elaborado.

Para las hojas de *C. citratus* el contenido de proteínas fue realmente despreciable, de hecho se refiere como 0, pues los valores de absorbancia obtenidos quedan por debajo del valor inferior de concentración ensayado en la curva de calibración, elaborada a partir de la proteína de suero bovino. Según Berteza *et al.* (2003)⁶³ refiere que el contenido total de proteínas del extracto de hoja fue de 1,2 mg/g de droga. En este caso el autor no explica cómo se llevó a cabo la preparación de la muestra para el ensayo.

Para la *L. alba* los valores de proteínas resultan ser inferiores a los obtenidos para la moringa, lógicamente, esta especie, al igual que el *C. citratus* han sido mucho más estudiadas, no por su valor nutricional, sino por su contenido en aceites esenciales.²⁸ Comparando el resultado de proteínas de *L. alba* en estudio con el del autor Brahma *et al.* (2016)⁶⁴, éste determinó el porcentaje de proteínas mediante el método de Kjeldahl obteniendo el valor de 20,28 %.

Con relación al método de Folin Ciocalteu, es una técnica muy utilizada para sugerir la presencia de compuestos fenólicos en un extracto. A pesar de ser un método antiguo, continúa siendo ampliamente utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de matrices vegetales.⁶⁵ El reactivo de Folin está formado por la mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico que origina un color amarillo, esta mezcla de ácidos produce iones de molibdato y tungsteno. La reacción tiene lugar en medio básico y genera la formación de un complejo de coloración azul, cuya absorbancia se lee a una longitud de onda de 765 nm.^{66,67}

Los polifenoles abarcan un extenso grupo los cuales se diferencian según su estructura y propiedades químicas. Dentro de este grupo se encuentran los flavonoides, los que se caracterizan por tener actividad antioxidante, ayudando a proteger del daño oxidativo a muchas células y por tal razón evitan enfermedades degenerativas causadas por los radicales libres.⁶⁸ Estos suelen asociarse a efectos terapéuticos tales como: antiinflamatorios, hepatoprotectores, antineoplásicos, antimicrobianos, entre otros.⁶⁹ La cuantificación realizada en los extractos acuosos de *M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba*, se muestra en la tabla 12. Como se puede apreciar la moringa aportaría la mayor cantidad de compuestos fenólicos

Comparando los resultados con el estudio presentado por Bastidas & Sojos (2017), droga vegetal recolectada en el mismo lugar, esta mostró mayor cantidad de compuestos fenólicos (3521 mg EAG/ 100g de droga seca), lo que pudiera estar influenciado por la edad de la planta, pues solo tenía 3 meses de sembrada.^{2 23} No obstante, aunque en el estudio se utilizó la misma metodología, el extracto se preparó por maceración pero utilizando agua caliente.²

Por otro lado comparando los resultados actuales con los presentados por Burgos & Reyes (2018), utilizando igual preparación del extracto, similar metodología y sitio de cosecha, se puede apreciar que presentó una cantidad mayor de compuestos fenólicos (2748.26mg EAG/ 100mg de droga cruda). La diferencia estuvo en que las hojas fueron cosechadas a los 15 meses de sembrada la planta y no estaba en periodo de germinación.³

El resultado obtenido actualmente hace notar la necesidad de realizar un estudio de dinámica de acumulación en la moringa, buscando la época donde se logre obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos en las hojas.

Según Linares *et al.* (2018)⁷⁰, al realizar una comparación en la cantidad de compuestos fenólicos que podrían ser extraídos de las hojas de moringa, utilizando diferentes métodos de extracción y etanol como disolvente, se pudo apreciar que la extracción con agitación magnética logró una concentración de compuestos fenólicos de 24,86 mg/g.

Con relación a la especie *C. citratus* una investigación realizada por Alvis *et al.* (2012)⁷¹, determinó que al utilizar un menstuo hidroalcohólico (50:50) se logró extraer una mayor cantidad de compuestos fenólicos (404,4 mg EAG/L).

Estudios realizados por Yara *et al.* (2007)⁷², refieren que en la *L. alba*, al utilizar metanol como menstuo, se logran extraer 13,34 mg EAG/ g drogas seca. Si bien es cierto que tanto los alcoholes de bajo peso molecular como las mezclas hidroalcohólicas logran extraer mayor cantidad de compuestos fenólicos, nuestro objetivo estuvo centrado hacia la extracción en un medio acuoso, pues es el agua el disolvente que se emplea en la infusión.

Según la literatura en los extractos de la especie *M. oleifera* referidos por Guzmán & Díaz (2017)⁷³; Leone *et al.* (2015)¹⁸; Velázquez *et al.* (2015)⁸, los compuestos fenólicos presentes son ácido cafeico, ácido cumárico, rutina, ácido gálico, ácido elálgico y ácido clorogénico.

Hennebelle *et al.* (2007)⁵⁹; Teixeira *et al.* (2018)⁷⁴, se identificaron una variedad de compuestos fenólicos en extractos de las hojas de *L. alba* tales como Verbascoside, ácido clorogénico y ácido protocatéquico.

En el extracto de las hojas de *C. citratus* se ha reportado la presencia de metabolitos de naturaleza fenólica tales como lo reportan Custódio *et al.* (2014)⁶⁰; Nambiar *et al.* (2012)²³; Negrelle *et al.* (2007)⁷⁵, dentro de las que se mencionan al ácido cafeico, ácido cumarico, ácido clorogenico.

Respecto al método de Folin Ciocalteu debe tenerse en cuenta que los extractos vegetales, independientemente del menstuo con que se elaboren, contienen una gran cantidad de metabolitos. Estudios han determinado que algunos de ellos, aun sin poseer estructura fenólica, pueden interaccionar con dicho reactivo, lo que puede afectar los valores provocando una sobreestimación. Dentro de las biomoléculas que pueden interferir se encuentran: aminoácidos, azúcares reductores como fructosa y glucosa y ácido ascórbico.^{76,77}

Los alimentos que son de naturaleza vegetal proporcionan más antioxidantes en la dieta humana que alimentos que no son de origen vegetal. Estos efectos se atribuyen a la capacidad que tiene de eliminar los radicales libres, lo cual guarda estrecha relación con el contenido de compuestos fenólicos.⁷⁸

Los antioxidantes son utilizados para prolongar la vida útil de los alimentos y actúan como productos farmacéuticos que protegen del daño oxidativo en el cuerpo. Las plantas medicinales que poseen propiedades antioxidantes ofrecen acción quimiopreventiva o quimioprotectora en el ser humano.⁷⁸ Muchos polifenoles, además de actuar como antioxidantes, poseen efecto antiinflamatorio, vasodilatador y la capacidad de prevenir enfermedades degenerativas.⁷⁹

La cuantificación de flavonoides se realizó por medio del método colorimétrico de cloruro de aluminio. Este método se basa en la formación de complejos coloreados entre los hidroxilos fenólicos de la posición 3 y 5, y con el grupo ceto del carbono 4 de los flavonoides (flavonas o flavonoles) ambos con el tricloruro de aluminio. Adicional a ellos, puede también formarse con los hidroxilos catecólicos tanto del anillo A como del B.⁸⁰

La cuantificación de flavonoides se puede apreciar en la tabla 12 donde los extractos que presentan mayor cantidad de flavonoides son los de *L. alba* y *M. oleífera*.

Según lo mencionado por Leone *et al.* (2015)¹⁸; Canett *et al.* (2014)¹⁷; Velázquez *et al.* (2015)⁸ los flavonoides presentes en la especie *M. oleifera* son miricetina, quercetina, kaempferol, isoramnetina y rutina.

Se han identificado flavonoides en el extracto de *C. citratus* según Shah *et al.* (2012)⁸¹; Custódio *et al.* (2014)²³; Nambiar *et al.* (2012)²³; Negrelle *et al.* (2007)⁷⁵ indicando la presencia de luteolina, 6- C y 7-O glucosidos, isoorientin 2-O- ramnosido, quercetina, kaempferol y apiginina.

En los extractos de las hojas de *L. alba* se pueden apreciar diferentes flavonoides como los mencionan Chies *et al.* (2013)⁸²; Hennebelle *et al.* (2007)⁵⁹; Teixeira *et al.* (2018)⁷⁴ entre esto encontramos apigenina, catequina, epicatequina, kaempferol, luteolina, naringina, quercetina, rutina y taxifolina.

Los flavonoides son una clase importante de productos naturales; pertenecen a la familia de los polifenoles y se pueden encontrar en frutas, verduras y ciertas bebidas. Tienen diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados con diversas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, etc. Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y son un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutraceuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas. Esto se debe a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti mutagénicas y anticancerígenas. También se sabe que son potentes inhibidores de varias enzimas, como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y la fosfoinositida 3-quinasa.⁸³

III.7 Determinación de la capacidad antioxidante secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Los estudios químicos realizados a las drogas vegetales mediante la cromatografía en capa delgada y tamizaje fitoquímico sugieren la presencia de metabolitos que pudieran tener actividad antioxidante. De lo anterior surge la necesidad de cuantificar, a través del IC₅₀, la concentración a la cual se logra tal efecto. Diversos artículos hacen alusión a la capacidad antioxidante de las tres drogas vegetales, sobre todo para la moringa.^{84,53,85}

Los resultados de IC₅₀ de cada extracto se aprecian en la tabla 13.

Tabla 13 Capacidad antioxidante secuestradora de radicales libres frente al DPPH de las tres drogas vegetales

| Extractos | IC ₅₀ mg/mL |
|--------------------|------------------------|
| <i>M. oleifera</i> | 0,1518 ^a |
| <i>C. citratus</i> | 0,2101 ^b |
| <i>L. alba</i> | 0,1242 ^c |

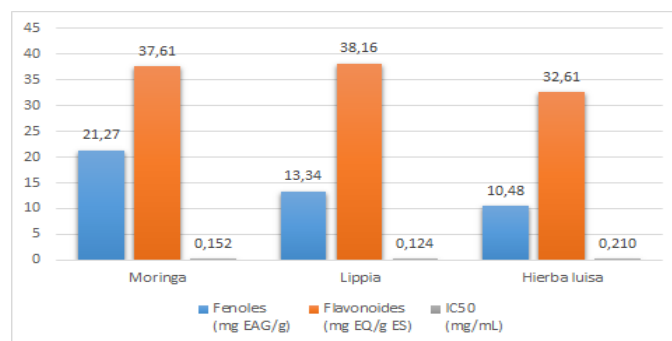
Nota: letras diferentes significa que hay diferencias estadísticas significativas.

Como se puede apreciar el extracto acuoso de *L. alba*, presenta la menor concentración para lograr inhibir el 50% de la concentración inicial del radical libre, es decir, que tiene mayor actividad antioxidante por secuestro del radical libre. Este resultado guarda estrecha relación con los valores obtenidos para fenoles totales y flavonoides de las tres especies. Al apreciar la figura 3 se puede observar que las dos especies que tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides son las que lograr una mejor capacidad secuestradora de radicales libres.

Si se analizan por separado el extracto acuoso moringa es el que presenta una mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguida del extracto de mastranto, sin embargo, ambas presentan una concentración de flavonoides que no difiere estadísticamente.

Uno de los efectos biológicos que más resalta en los flavonoides es su capacidad antioxidante. Dichos metabolitos pueden prevenir las lesiones causadas por los radicales libres de varias maneras, siendo una de ellas la eliminación directa de los radicales libres. Los flavonoides estabilizan las especies reactivas del oxígeno al reaccionar con el compuesto reactivo del radical. Debido a la alta reactividad del grupo hidroxilo de los flavonoides, los radicales se vuelven inactivos.

Figura 3 Determinaciones de fenoles totales, flavonoides y la IC₅₀ de las tres especies en estudio



Algunos flavonoides pueden eliminar directamente los superóxidos, mientras que otros eliminan el radical altamente reactivo derivado del oxígeno llamado peroxinitrito. Flavonoides como la epicatequina y la rutina son poderosos eliminadores de radicales. Adicionalmente, se ha demostrado en estudios *in vitro* que los flavonoides pueden inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Debido a esta acción protectora de las lipoproteínas de baja densidad, teóricamente, los flavonoides podrían tener una acción preventiva contra la aterosclerosis.⁸³

Comprando los resultados con los referidos por Burgos & Reyes, 2018³, en este caso se logró un valor de IC₅₀ menor (0,0866 mg/mL) para el extracto de *M. oleifera*, droga vegetal recolectada en el mismo lugar a la que se le realizó el mismo procedimiento para poder cuantificar la capacidad antioxidante. Debe señalarse que para dicho caso también este extracto presentó mayor concentración de compuestos fenólicos (2748,26 mg EAG/100g droga seca), lo que refuerza la estrecha relación que existe entre compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

Estudios realizados por otros autores refieren diversos valores de IC₅₀. Por ejemplo, Charoensin *et al.* (2014)⁸⁶, informó un IC₅₀ de 1,60 mg/mL, pero a partir de un extracto metanólico. Lógicamente, los metabolitos que se extraen con este disolvente son químicamente diferentes y pueden ser de mayor diversidad en cuanto a polaridad.

Comparando los resultados referidos por Chies *et al.* (2013)⁸² investigaciones realizadas a diferentes extractos etanólicos de *L. alba* se mostraron valores de IC₅₀ similares a los obtenidos en esta investigación.

En sentido general los antioxidantes son los compuestos que combaten los radicales libres, pudiendo intervenir en cualquiera de las etapas del proceso oxidativo mediado por radicales libres, es decir, iniciación, propagación y terminación.⁸⁷ Estos antioxidantes son producidos por el sistema biológico y se presentan de manera natural en muchos alimentos. Es el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes lo que incide en la salud.⁸⁸

III.8 Diseño de formulación

El diseño de esta formulación está basado en dos estudios anteriores referidos por Bastidas & Sojos (2017)² y Burgos & Reyes (2018)³. Este proyecto está basado en la preparación de infusiones que sean potencialmente funcionales, tomando como ingrediente activo esencial

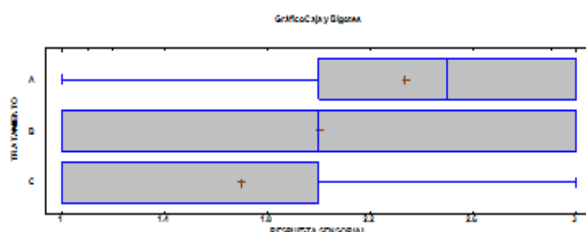
a la *M. oleifera*, sin embargo, por sus deficientes propiedades organolépticas se ha procedido a fusionarlas con otras drogas vegetales.

En esta ocasión se diseñaron tres combinaciones diferentes para cada infusión (moringa/mastranto) (moringa/ hierba luisa) en proporciones diferentes. Para la elección de la mejor combinación se realizó una evaluación sensorial según se describió en la tabla 4.

Como resultado del análisis de varianza de la infusión moringa/ mastranto, durante la evaluación sensorial se determinó que existen diferencias significativas entre las tres formulación diseñadas, con un nivel de confianza de 95,0% y una probabilidad P inferior a 0,05 (anexo 10).

Al realizar la prueba de rango múltiple se identifica que las medias son significativamente diferentes entre sí (anexo 11). Sin embargo, al analizar la distribución en el diagrama de cajas y bigotes (figura 4). Se observa que la muestra A (80:20) presenta datos dispersos entre los puntos 2 y 3, lo que indica que esta combinación tiene mayor aceptación sensorial. En la evaluación sensorial la combinación de mayor aceptación era la que mayor puntaje recibía.

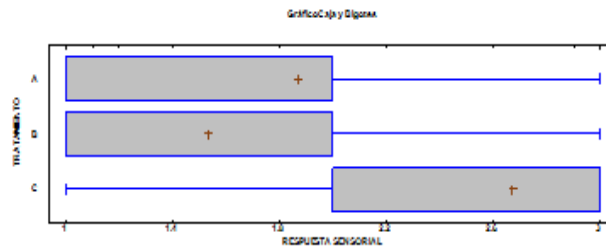
Figura 4 Diagrama de caja y bigotes para la evaluación sensorial de ordenamiento de la infusión moringa/mastranto



Realizando un análisis similar a través de un ANOVA simple para la combinación moringa/ hierba luisa se pudo apreciar que entre las tres combinación existían diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95,0% y una $P < 0,05$ (anexo 12)

Posteriormente, se procedió a realizar un análisis de rango múltiple observándose que el nivel de aceptación por parte de los consumidores presenta resultados estadísticamente diferentes (anexo 13). Al realizar el diagrama de cajas y bigotes (figura 5) se observa que la muestra C (60:40) es la que presenta datos dispersos entre los puntos 2 y 3 lo que indica que esta combinación resultó ser la de mayor agrado en la evaluación sensorial.

Figura 5 Diagrama de caja y bigotes de la evaluación sensorial de ordenamiento de la infusión moringa/hierba luisa



Las formulaciones se elaboraron a través de la mezcla de ingredientes y fueron envasadas en bolsitas de papel poroso automáticamente. El peso promedio de cada bolsita es de 1.5g.

Para preparar la infusión se añadieron 200 mL de agua hirviendo sobre la bolsita de té, se tapó el recipiente dejándolo en reposo de 5 a 7 minutos. Organolépticamente, las dos infusiones presentaron un olor agradable con coloraciones ocre claro (amarillento). En relación al sabor es discretamente picante por la presencia de la *M. oleifera*, recomendando endulzar al gusto de cada consumidor.

Una vez preparada las dos infusiones se evaluaron los parámetros de calidad, resultados que se determinaron sin endulzar las diferentes combinaciones (tabla 14).

Tabla 14 Resultados del control de calidad en las infusiones moringa/mastranto y moringa/hierba luisa

| Parámetros de control de calidad | Té de Moringa/ Mastranto | Té de Moringa/ Hierba luisa |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | Media/ DS | Media/ DS |
| Grado Brix % | 0,98/0,02 | 0,88/0,00 |
| Índice de refracción | 1,33/0,00 | 1,33/0,00 |
| Azúcar invertida % | 0,99/0,05 | 0,90/0,01 |
| Glucosa % | 0,97/0,04 | 0,89/0,01 |
| Fructosa % | 0,98/0,04 | 0,90/0,00 |
| Ph | 6,73/0,05 | 6,43/0,07 |
| Densidad relativa | 1,00/0,01 | 1,00/0,00 |
| IC ₅₀ (mg/mL) | 0,1865 | 0,2516 |
| Fenoles totales (mg EAG/funda de té) | 36,73/1,00 | 28,47/0,88 |

Como se puede apreciar la infusión que combina moringa /mastranto logró extraer mayor cantidad de compuestos fenólicos y como consecuencia de esto presentó mayor capacidad secuestradora del radical libre (DPPH), ya que su IC₅₀ resultó inferior. Resulta oportuno señalar que para esta combinación, según la evaluación sensorial, la mejor aceptación la tuvo la formulación que mayor cantidad de moringa incorporaba, aspecto que, lógicamente, influye en la concentración de compuestos fenólicos totales. Adicionalmente, ambos extractos de manera independiente, fueron los que mostraron la mayor cantidad de tales metabolitos.

Las formulaciones diseñadas podrían, sobre la base de los estudios realizados, sugerirse como posibles alimentos funcionales, debido a que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos nutricionales básicos y beneficiosos para una o varias funciones del organismo. Por tal motivo, propician mejoras para la salud humana, incluso con efecto preventivo para determinadas enfermedades, debido a su capacidad antioxidante.

III.9 Embalaje y ensobrado

Teniendo la caja donde se va a guardar las funditas de té, el rotulado debe de cumplir con las normas NTE INEN 1334-1⁸⁹, NTE INEN 1334-2⁹⁰ y NTE INEN 1334-3⁹¹.

Las normas NTE INEN 1334 parte uno, detallan los requisitos obligatorios que deben cumplir los envases en que se va a vender el producto para el consumo humano, los cuales son los siguientes: nombre del alimento, lista de ingredientes, instrucciones para el uso, contenido neto, identificación del fabricante, lote, instrucciones para la conservación, ciudad y país de origen.

Así mismo las NTE INEN 1334 parte dos, indican los requisitos que debe cumplir el rotulado nutricional del producto. La tabla de declaración obligatoria de nutrientes debe contener la cantidad de masa del nutriente, expresando los valores en gramos. Para finalizar la parte tres de las normas NTE INEN 1334 indica los requisitos para declaraciones nutricionales y saludables.

A continuación se muestra de la figura 6 a la 8 el diseño del envase final con todos los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 1334 parte 1 a la 3.

Figura 6 Diseño de parte externa e interna de la caja para funditas de infusiones de Moringa/Mastranto

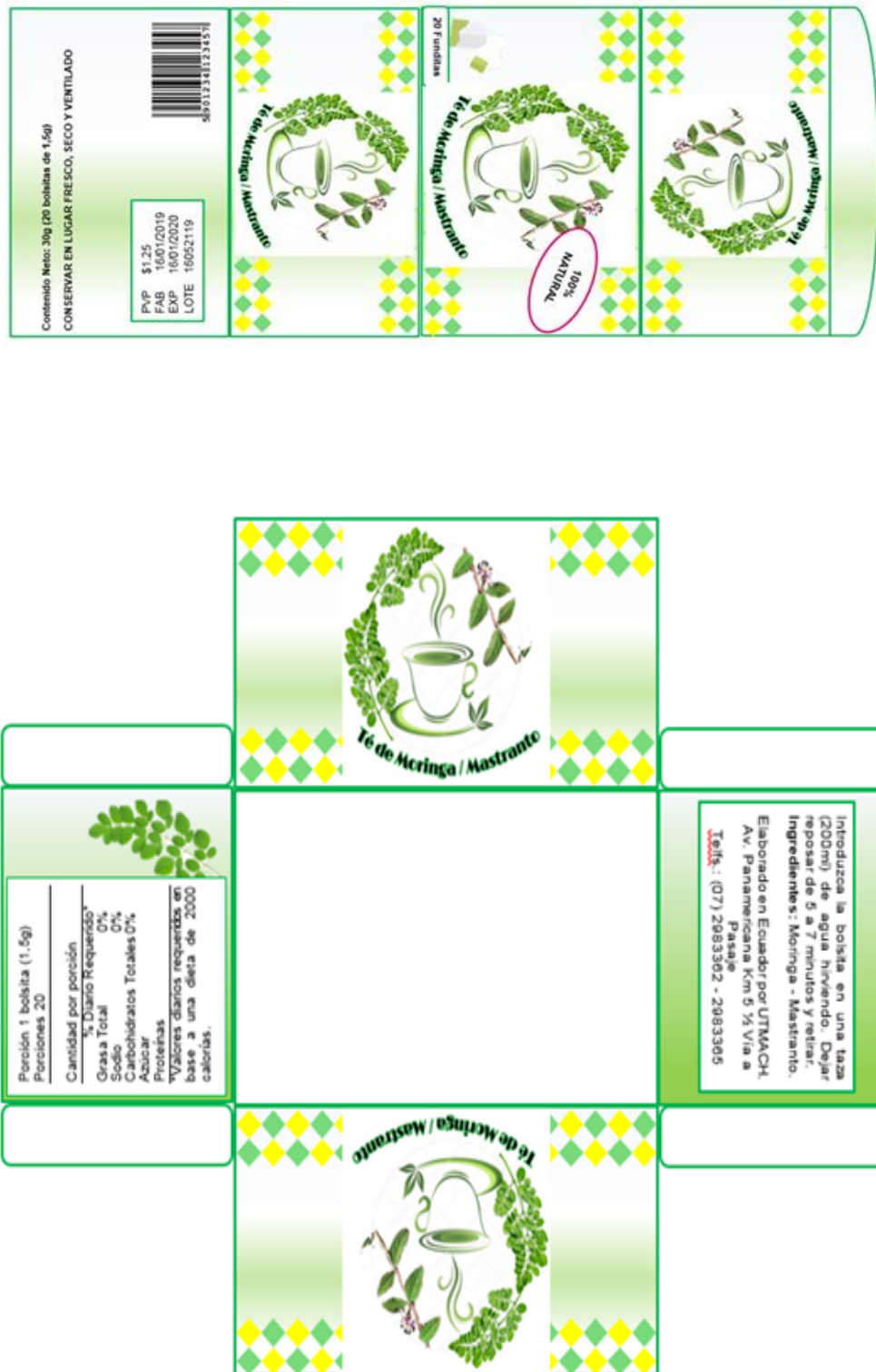


Figura 7 Diseño de la parte externa e interna de la caja para funditas de infusiones de moringa/hierba luisa

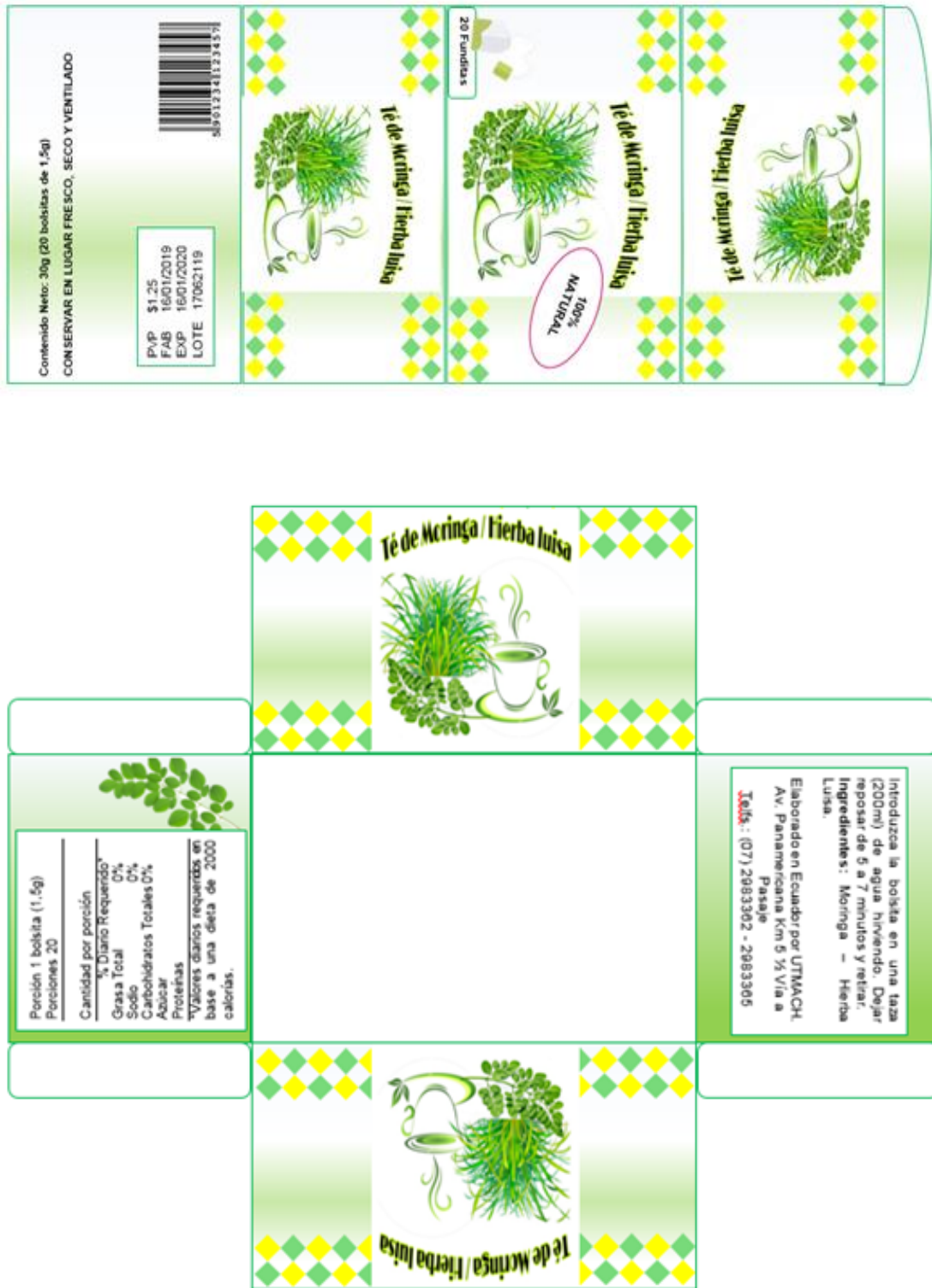


Figura 8 Etiquetas de las funditas del té



CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

- La evaluación de parámetros tales como: humedad residual, cenizas, minerales y metales pesados, realizados a las drogas crudas y molidas (*M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba*) permitió determinar que las drogas vegetales poseen la calidad requerida, según las normas consultadas.
- El tamizaje fitoquímico realizado al extracto acuoso de *M. oleifera* sugiere la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, aminoácidos, saponinas y azúcares reductores, los cuales también están presentes en la *L. alba*, a excepción de las saponinas. El análisis en el extracto de *C. citratus* solo dio positivo para compuestos fenólicos, aminoácidos y azúcares reductores.
- El análisis foliar realizado a las hojas de las tres drogas vegetales permitió conocer el aporte de minerales que tendría cada especie, resaltando los niveles de Fe, sobre todo, en las hojas de *L. alba*.
- Los estudios de cuantificación de metabolitos evidenciaron que la moringa presentaba la mayor concentración de proteínas. Así mismo, en relación a la cantidad de fenoles totales, las hojas de *M. oleifera* poseen la mayor cantidad, seguido de la *L. alba* y *C. citratus*, siendo las dos primeras las de mayor contenido de flavonoides, por lo cual tienen estas una mayor capacidad antioxidante.
- La evaluación sensorial realizada a las infusiones mostró que la de mejor aceptación en la combinación moringa/mastranto fue 80/40 y para moringa/hierba luisa 60:40. Ambas fueron evaluadas mediante pruebas fisicoquímicas, demostrándose que poseen las características necesarias para ser considerada como posibles bebidas funcionales, con beneficios para la salud humana.

CAPÍTULO V RECOMENDACIONES

- Realizar el control microbiológico a las tres especies antes de realizar la formulación y al producto final.
- Determinar la concentración y tipo de nutrientes tales como: vitaminas y aminoácidos a las tres especies *M. oleifera*, *C. citratus* y *L. alba*.
- Determinar la estabilidad de las dos formulaciones en sus envases definitivos.

ANEXOS

Anexo 1 Composición química de *M. oleifera*

| Composición | Referencias |
|--|--|
| Vitaminas A, B1, B2, B3, C, K, E | (Leone <i>et al.</i> , 2015) (Bonaf <i>et al.</i> , 2012) |
| Minerales hierro, calcio, cobre, magnesio, zinc | (Bonaf <i>et al.</i> , 2012) |
| Flavonoides miricetina, quercetina, kaempferol, isoramnetina, rutina | (Leone <i>et al.</i> , 2015) (Bonaf <i>et al.</i> , 2012) (Márquez <i>et al.</i> , 2017) |
| Ácido Fenólicos ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumarico, ácido Eágico, ácido ferúlico, ácido gálico | (Leone <i>et al.</i> , 2015) (Bonaf <i>et al.</i> , 2012) |
| Alcaloides N, ∞ - L- ramnopiranosil vincosamida 4-(∞ - L- ramnopiranosiloxi) fenilacetnitrilo pirrolemarumina 4''-O- ∞ -L.ramnopiranosil metilo 4- (∞ -L- Ramnopiranosiloxi)-benzicarbomato 4'.hidroxifeniletanamida- ∞ -L-ramnopiranosido (Marumósido A) 4'.hidroxifeniletanamida- ∞ -L-ramnopiranosido (Marumósido B) | (Leone <i>et al.</i> , 2015) (Márquez <i>et al.</i> , 2017) |

| | |
|---|--------------------------------|
| Glucosinolatos | (Leone <i>et al.</i> , 2015) |
| 4-O-(∞ -L-ramnopiranosiloxi)-bencilglucosinolato | (Márquez <i>et al.</i> , 2017) |
| 4-O-(∞ -acetil-ramnopiranosiloxi)- bencilglucosinolato isómeros 1,2 y 3 | (Anwar <i>et al.</i> , 2007) |
| 4-hidrobencil glucosinolato | |

| | |
|--|------------------------------|
| Isotiocianatos | (Leone <i>et al.</i> , 2015) |
| 4-(∞ -L-ramnosiloxi) bencilisotiocionato (R1, R2, R3=H) | (Anwar <i>et al.</i> , 2007) |
| 4-(4'-O-acetil- ∞ -L-ramnosiloxi) bencil isotiocianato (R1,R2=H; R3=Ac) | |
| 4-(3'-O-acetil- ∞ -L-ramnosiloxi) bencil isotiocianato (R1,R3=H; R2=Ac) | |
| 4-(2'-O-acetil- ∞ -L-ramnosiloxi) bencil isotiocianato (R2,R3=H; R1=Ac) | |

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Carotenoides | (Leone <i>et al.</i> , 2015) |
| β - Caroteno, lutein | |

| | |
|---|--------------------------------|
| Aminoácidos esenciales | (Sánchez <i>et al.</i> , 2013) |
| arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina | |

Anexo 2 Actividad biológica de la *M. oleifera*

| Extracto | Actividad biológica | Referencia |
|--|----------------------------|--|
| 50% Etanólico | Antiulceroso | (Verma <i>et al.</i> , 2012) (Abdull <i>et al.</i> , 2014) |
| Acuoso Éter de petróleo Cloroformo | Antimicrobiano | (Arora <i>et al.</i> , 2013) (Onsore <i>et al.</i> , 2013) (Abdull <i>et al.</i> , 2014) |
| 50% Etanólico | Antibacteriano | (Singh <i>et al.</i> , 2012) (Peixoto <i>et al.</i> , 2011) |
| 50% Etanólico | Antioxidante | (Verma <i>et al.</i> , 2012) (Abdull <i>et al.</i> , 2014) |
| Etanólico | Hepatoprotector | (Das <i>et al.</i> , 2012) (Asensi <i>et al.</i> , 2017) |
| Metanólico | Inflamación vascular | (Waterman <i>et al.</i> , 2014) |

Anexo 3 Composición química del *C. citratus*

| Composición | Referencias |
|--|---|
| Aceites Esenciales citral, citronelal, citronelol, dipentene, mircenol, heptenona, geraniol, linalol, limoneno | Onawunmi <i>et al.</i> , 1984 Bassolé <i>et al.</i> , 2011 Almeida <i>et al.</i> , 2008 Dudai <i>et al.</i> , 2001 |
| Aldehídos oxobisaboleno, isocitral, decinal, valérico | Negrelle & Gómez, 2007 Cimango <i>et al.</i> , 2002 |
| Flavonoides luteolina, 6-C y 7-O- glucósidos, homorintina, 2-O- rhamnosil- limborientino, quercetina, kaempferol, apigenina, elemicina, catecol, hidroquinona | Negrelle & Gómez, 2007 |
| Ácidos Fenólicos ácidos clorogénico, ácido cafeico, p- cumarico | Negrelle & Gomes, 2007 |
| Alcoholes linalol, citronelol, metahanol, cineol, mentol, neomentol, terpinol, nerol, farnesol, dotriacontanol, triacontanol, hexacosanol | Negrelle & Gomes, 2007 |
| Ésteres geraniol formiato, acetato de citronelil, acetato de terpinilo y formiato de linalilo, laurato de éster, caproato de geraniol | Negrelle & Gomes, 2007 |

Anexo 4 Actividad biológica del *C. citratus*

| Extracto | Actividad Biológica | Referencias |
|-----------------|--|--|
| Hidroalcohólico | Hipolipemiente Antioxidante | (Betancourt <i>et al.</i> , 2015) (Echavarría <i>et al.</i> , 2016) |
| Metanólico | Antibacteriano Antimicrobiano antifúngico | (Vélez <i>et al.</i> , 2018) (Lambrecht <i>et al.</i> , 2013) |
| Acuoso | Antigenotóxicas | (Cápiro <i>et al.</i> , 2005) (González <i>et al.</i> , 2016) |
| Acuoso | Antiinflamatorio | (Vera <i>et al.</i> , 2013) |
| Acuoso | Trastornos digestivos Reumatismo Trastornos Menstruales Dolores de las articulaciones | (Simón <i>et al.</i> , 1984) (Carlin <i>et al.</i> , 1986) (Nambiar & Matela, 2012) (Zambrano <i>et al.</i> , 2015) |
| Acuoso | Sedante Insomnio Resfrío | (Zambrano <i>et al.</i> , 2015) |
| Acuoso | Anticatarral Antiespasmódico Hipotensor Estimulante Antipirético | (Beyra <i>et al.</i> , 2004) |

Anexo 5 Composición química de *L. alba*

| <i>Composición</i> | <i>Referencia</i> |
|---|-----------------------------------|
| Flavonoides | |
| flavonas, metoxiflavona, 6-hidroxi-flavona, | (Pascual <i>et al.</i> , 2001) |
| luteolina, naringenina, apigenina, 6-metoxi | (Trevisan <i>et al.</i> , 2016) |
| apigenina, 5,7,4-trihidroxi-3,6 | |
| dimetoxiflavona, apigenina-7-diglurónido | |
| Iridoides | (Hennebelle <i>et al.</i> , 2008) |
| ácido geniposídico, éster metílico de | |
| shanzhiside, carioptosido, gernipósido, 8- | |
| epiloganina | |
| Compuestos fenólicos | (Hennebelle <i>et al.</i> , 2008) |
| feniletanoides: verbascosido, | |
| isoverbascosido, calceolariosido E, | |
| forsytoside | |
| Minerales | (Schroeder <i>et al.</i> , 2013) |
| potasio, calcio, hierro, manganeso, zinc, | |
| cobre, fósforo y nitrógeno | |

Aceites esenciales

citral, linalol, carvona, limoneno, citral-
mirceno, citral- β -cariofileno, (Joshi *et al.*, 2018)
citralgermacreno-D, 1,8-cineol-limoneno y
limoneno piperitona, nerol

β -cariofileno, tagetenona, mirceno,
estragol, g-terpineno, alcanfor-1,8-cineol (López *et al.*, 2011)

bicyclosesquifelandreno, piperitenona, 1,8-
cineol, alcanfor, geranial, neral, geraniol y (Aular *et al.*, 2016)
germacreno

Anexo 6 Actividad biológica de *L. alba*

| Extracto | Actividad Biológica | Tipo de estudio | Referencia |
|---------------------|--|------------------------|--|
| Extracto metanólico | Antioxidante | <i>In vitro</i> | (Ara <i>et al.</i> , 2009) ³⁸ |
| Extracto metanólico | Antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. | <i>In vitro</i> | (MJ <i>et al.</i> , 2018) ³⁶ |
| Extracto acuoso | Bactericida contra <i>Helicobacter pylori</i> | <i>In vitro</i> | (Henaó <i>et al.</i> , 2011) ⁹² |

| | | | |
|--------------------------|---|---|--|
| Extracto con cloroformo | Antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> y <i>Candida albicans</i> . | <i>In vitro</i> | (Ara <i>et al.</i> , 2009) ⁹³ |
| Extracto acuoso | Antiulcerosa | <i>In vivo</i> | (Pascual <i>et al.</i> , 2001) ⁹⁴ |
| Extracto etanólico | Antiviral por su efecto antiherpético sobre la línea celular HeLa infectada. | <i>In vitro</i> | (Agudelo <i>et al.</i> , 2010) ⁹⁵ |
| Aceite esencial | Antigenotoxicidad Neurosedante Acaricida contra <i>Rhipicephalus microplus</i> Antiparasitario | <i>In vivo</i> <i>In vivo</i> <i>In vivo</i> / <i>In vitro</i> | (Linde <i>et al.</i> , 2016) ⁹⁶ (Vale <i>et al.</i> , 2002) ⁹⁷ (Peixoto <i>et al.</i> , 2015) ⁹⁸ (Viana <i>et al.</i> , 2016) ¹⁰⁰ |
| Hojas Extracto acuoso | Analgésico Antiinflamatorio | <i>In vivo</i> | (Haldar <i>et al.</i> , 2012) ⁹⁹ |

Anexo 7 Requisitos establecidos en la Norma INEN 2392:2013

| Requisitos Físicos químicos | Máximo |
|----------------------------------|---|
| Humedad % | 12 |
| Cenizas insolubles en HCl al 10% | 2 |
| Requisitos Microbiológicos | Máximo permisible para identificar nivel de buena calidad |
| Salmonella | Ausencia |
| Shigella | Ausencia |
| Escherichia coli | < 10 ufc / g |

| | |
|--------------------|-----------------------------|
| Enterobacteriaceae | 1 x 10 ² ufc / g |
| Mohos y levaduras | 1 x 10 ³ ufc / g |

Anexo 8 Contenido de contaminantes establecidos en la Norma INEN 2392:2013

| Contaminantes | Contenido máximo mg/ Kg |
|---------------|-------------------------|
| Arsénico | 1.0 |
| Plomo | 0.5 |

Anexo 9 Hojas de *M. oleifera* en diferentes procesos



| | | |
|---------------|------------|--------------|
| Hojas frescas | Droga seca | Droga molida |
|---------------|------------|--------------|

Anexo 10 Análisis de varianza de la infusión Moringa/Mastranto

| Fuentes | Suma de cuadrados | GI | Cuadrado medio | Razón- F | Valor- P |
|--------------|-------------------|----|----------------|----------|----------|
| Entre grupos | 6.02222 | 2 | 3.0111 | 4.95 | 0.0092 |
| Intra grupos | 52.9667 | 87 | 0.608812 | | |
| Total (Corr) | 58.9889 | 89 | | | |

Anexo 11 Prueba de rango múltiple de la infusión Moringa/Mastranto

| Tratamiento | Casos | Media | Grupos homogéneos |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| C | 30 | 1.7 | X |
| B | 30 | 2.0 | XX |
| A | 30 | 2.3333 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| A-B | | 0.33333 | 0.400431 |
| A-C | * | 0.63333 | 0.400431 |
| B-C | | 0.3 | 0.400431 |

Anexo 12 Análisis de varianza de la infusión Moringa/Hierba luisa

| Fuente | Suma de cuadrados | GI | Cuadrado medio | Razón- F | Valor- P |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Entre grupos | 20.3556 | 2 | 10.1778 | 22.36 | 0.0000 |
| Intra grupos | 39.6 | 87 | 0.455172 | | |
| Total (Corr) | 59.9556 | 89 | | | |

Anexo 13 Prueba de rango múltiple de la infusión Moringa/Hierba luisa

| Tratamiento | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| B | 30 | 1.5333 | X |
| A | 30 | 1.86667 | X |
| C | 30 | 2.66667 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencias | +/- Límites |
|------------------|-------------|--------------------|--------------------|
| A-B | | 0.33333 | 0.346237 |
| A-C | * | -0.8 | 0.346237 |
| B-C | * | -1.1333 | 0.346237 |

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Fernández, B.; Castro, R. Producción Científica Cubana Sobre Plantas Medicinales y Productos Naturales a Partir de La Base de Datos PlantMedCUBA, 1967-2010. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2013**, *18* (3), 348–360.
- (2) Bastidas, E.; Sojos, C. Elaboración de una formulación tipo té a partir de hojas de moringa como ingrediente activo esencial y cascarilla de cacao. **2017**.
- (3) Burgos, K.; Reyes, M. Infusión de Hojas de Moringa oleifera (Moringa) e Hibiscus sabdariffa (Flor de Jamaica). **2017**.
- (4) Bonal, R.; Rivera, R.; Bolívar, M. Moringa Oleifera: Una Opción Saludable Para El Bienestar. *Medisan* **2012**, *16* (10), 1586–1599.
- (5) Anwar, F.; Latif, S.; Ashraf, M.; Gilani, A. Moringa Oleifera : A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phyther. Res.* **2006**, *25*, 17–25. <https://doi.org/10.1002/ptr>.
- (6) Guzmán, S.; Cardozo, R.; García, V. Desarrollo Agrotecnológico de Lippia Alba (Miller). *Rev. científica Guillermo Ockham* **2004**, *7* (1), 201–215.
- (7) Rojas, J.; Ronceros, S.; Palacios, O.; Sevilla, C. Efecto Anti-Trypanosoma Cruzi Del Aceite Esencial de Cymbopogon Citratus (DC) Stapf (Hierba Luisa) En Ratones Balb/C. *An Fac Med.* **2012**, *73*, 7–12.
- (8) Velázquez, M.; Peón, I.; Zepeda, R.; Jiménez, M. Moringa (Moringa Oleifera Lam.): Potential Uses in Agriculture, Industry and Medicine. *Rev. Chapingo Ser. Horti.* **2016**, *22* (2), 95–116. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018>.
- (9) Gallegos, M. Las Plantas Medicinales : Principal Alternativa Para El Cuidado de La Salud , En La Población Rural de Babahoyo ,. *An Fac Med.* **2016**, *77* (4), 327–332.
- (10) García, J.; Ramírez, B.; Arellano, G.; Zañudo, J.; Salcedo, A.; García, J. Conocimiento y Uso de Las Plantas Medicinales En La Zona Metropolitana de Guadalajara *. *Saberes y Razon.* **2012**, *39*, 29–44.
- (11) Prieto, S.; Garrido, G.; González, J.; Molina, J. Actualidad de La Medicina Tradicional Herbolaria. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas* **2004**, *35*, 19–36.
- (12) González, F. Un Estudio Transversal de Moringa Oleifera Lam . (Moringaceae) Revisión A Transversal Study of Moringa Oleifera Lam . (Moringaceae) Review. *Dominguezia* **2018**, *34* (1), 5–25.
- (13) Pérez, A.; Sánchez, T.; Armengol, N.; Reyes, F. Características y Potencialidades de Moringa Oleifera , Lamark . Una Alternativa Para La Alimentación Animal Characteristics and Potential of Moringa Oleifera , Lamark . An Alternative for Animal Feeding. *Pastos y Forrajes* **2010**, *33* (4), 1–16.
- (14) Olson, M.; Fahey, J. Moringa Oleifera : Un Árbol Multiusos Para Las Zonas Tropicales Secas. *Rev. Mex. Biodivers.* **2011**, *82*, 1071–1082.

- (15) Foidl, N.; Mayorga, L.; Vásquez, W. Utilización Del Marango (Moringa Oleifera) Como Forraje Fresco Para Ganado. *Conf. electrónica la FAO sobre “Agroforestería para la Prod. Anim. en Latinoamérica”* **2018**, 1–4.
- (16) ITIS. Sistema Integrado de Información Taxonómica. <https://www.itis.gov/> (accessed Dec 26, 2018).
- (17) Canett, R.; Arvayo, K.; Ruvalcaba, N. Aspectos tóxicos más relevantes de Moringa oleifera y sus posibles daños. *Rev. Ciencias Biológicas y la Salud* **2014**, *16*, 36–43.
- (18) Leone, A.; Spada, A.; Battezzati, A.; Schiraldi, A.; Aristil, J.; Bertoli, S. Cultivation , Genetic , Ethnopharmacology , Phytochemistry and Pharmacology of Moringa Oleifera Leaves : An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 12791–12835. <https://doi.org/10.3390/ijms160612791>.
- (19) Villarreal, A.; Ortega, K. Revisión de las características y usos de la planta Moringa oleífera. *Investig. Desarro.* **2014**, *22*, 309–330.
- (20) Asensi, G.; Durando, A.; BerruezO, G. Moringa Oleifera : Revisión Sobre Aplicaciones y Usos En Alimentos. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2017**, *67* (2), 86–97.
- (21) Sánchez, Y.; Martínez, G.; Sinagawa, S.; Vázquez, J. Moringa Oleifera ; Importancia , Funcionalidad y Estudios Involucrados. *Rev. Científica la Univ. Autónoma Coahuila Moringa* **2013**, *5*, 25–30.
- (22) Quintanilla, R.; Nova, R.; Moyano, A.; Salazar, C. Estudio Comparativo de La Composición de Los Aceites Esenciales de Cuatro Especies Del Género Cymbopogon (Poaceae) Cultivadas En Colombia. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* **2012**, *11* (1), 77–85.
- (23) Nambiar, V. S.; Matela, H. Potential Functions of Lemon Grass (Cymbopogon Citratus) in Health and Disease. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* **2012**, *3* (5), 1035–1043.
- (24) Álvarez, L.; Salazar, M. Caracterización morfológica de las royas (PUCCINIALES) que afectan el limoncillo (Cymbopogon Citratus (DC.) Stapf) en Colombia. *Bioagro* **2014**, *26* (3), 171–176.
- (25) Bassolé, I.; Lamien, A.; Bayala, B.; Obame, L.; Ilboudo, A.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.; Dicko, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Cymbopogon Citratus and Cymbopogon Giganteus Essential Oils Alone and in Combination. *Phytomedicine* **2011**, *18* (12), 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>.
- (26) Flores, L.; Solano, Y.; Sanabria, M.; Hernández, D. Efectividad de Los Extractos Vegetales de Orégano Silvestre (Lippia Origanoides K.) y Citronela (Cymbopogon Citratus D.C.) Sobre Rhyzopertha Dominica (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Idesia* **2017**, *35*, 67–74. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000017>.
- (27) Vázquez, M.; Guerrero, J. Efecto Del Aceite Esencial de Cymbopogon Citratus Sobre Propiedades Físicoquímicas En Películas de Quitosano. *Sci. Agropecu.* **2017**,

8 (4), 401–409. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.04.11>.

- (28) López, M.; Stashenko, E.; Fuentes, J. Chemical Composition and Antigenotoxic Properties of Lippia Alba Essential Oils. *Genet. Mol. Biol.* **2011**, *34* (3), 479–488. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011005000030>.
- (29) Oliveira, D.; Leitão, G.; Santos, S.; Bizzo, H.; Lopes, D.; Alviano, C.; Alviano, D.; Leitão, S. Ethnopharmacological Study of Two Lippia Species from Oriximiná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108* (1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.018>.
- (30) Aular, Y.; Villamizar, M.; Pérez, Y.; Pérez, V. Composición Química y Toxicidad Aguda Oral Del Aceite Esencial de Lippia Alba En Ratones. *Salus* **2016**, *20* (1), 43–51. <https://doi.org/10.1155/2015/321924>.
- (31) Parra, M.; Caroprese, J.; Arrieta, D.; Stashenko, E. Morfología, Anatomía, Ontogenia y Composición Química de Metabolitos Secundarios En Inflorescencias de Lippia Alba (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop* **2010**, *58* (4), 1533–1548.
- (32) Álvarez, I.; Uribe, C.; Acevedo, J.; Lemes, R. Análisis de La Producción de Aceite Esencial de Lippia Alba Por Destilación Mediante Arrastre de Vapor En Planta Móvil. *Rev. Integr. SENA* **2015**, *2*, 7–34.
- (33) Vit, P.; Silva, B.; Meléndez, P. Lippia Alba NEBr Ficha Botánica de Interés Apícola En Venezuela N°2 Cidrón. *Rev. la Fac. Farm.* **2002**, *43* (2), 13–14.
- (34) Joshi, A.; Prakash, O.; Pant, A. K.; Kumar, R.; Negi, M. S. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils of Two Morphotypes of Lippia Alba (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2018**, *21* (3), 687–700. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1486232>.
- (35) Orole, O.; Adejumo, T.; Aisoni, J. Evaluation of the Activity of Lippia Alba Leave Extract in Reducing Ochratoxin A in Albino Rats. *J. Adv. Med. Pharm. Sci.* **2017**, *15* (1), 1–8. <https://doi.org/10.9734/JAMPS/2017/35875>.
- (36) Islam, M.; Amin, M.; Ahmed, M.; Khatun, S.; Rahman, M.; Siddiqui, S.; Rahman, M.; Kudrat, E.; Mannan, M. In-Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils and Different Organic Extracts of Lippia Alba. *J. Phytochem. Biochem.* **2018**, *2* (1), 1–5.
- (37) Trevisan, M.; Marques, R.; Silva, M.; Scherer, D.; Haubner, R.; Ulrich, C.; Owen, R. Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the Leaves of Lippia Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity. *Rec. Nat. Prod.* **2016**, *10* (4), 485–496.
- (38) Ara, N.; Nur, H. In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of Lippia Alba. <https://doi.org/10.1093/med/9780199569656.005.0001>.
- (39) Boxler, A. Infusiones de plantas aromáticas y medicinales | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria <https://inta.gov.ar/documentos/infusiones-de-plantas-aromaticas-y-medicinales> (accessed Dec 26, 2018).

- (40) INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. Hierbas Aromáticas - requisitos <https://docplayer.es/55643171-Hierbas-aromaticas-requisitos.html> (accessed Dec 26, 2018).
- (41) Miranda, M.; Cuellar, A. Manual de Prácticas de Laboratorio. In *Farmacognosia y Productos Naturales*; 200AD; pp 44–48.
- (42) Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (43) 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**, *10* (22), 60–68.
- (44) Londoño, L.; Londoño, P.; Muñoz, F. Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Bioteología en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* **2016**, *14* (2), 145–153. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153).
- (45) ASOCIACIÓN EUROPEA PARA LAS ESPECIES. *Programa Conjunto de La FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias*; 2013.
- (46) Torri, S. Análisis Foliar. **2016**, 40–47.
- (47) Laboratorios A-L. *Análisis Foliar*; México, 2011.
- (48) Uraku, A.; Onuoha, S.; Ezeani, N.; Ogbanshi, M.; Ezeali, C.; Nwali, B.; Ominyi, M. Nutritional and Anti-Nutritional Quantification Assessment of Cymbopogon Citratus Leaf. *Pharmacol. Pharm.* **2015**, *6*, 401–401. <https://doi.org/10.4236/pp.2015.68041>.
- (49) Schroeder, M.; Burgos, Á. Bioconcentraciones Foliar de Elementos Minerales En Lippia Alba (Salvia Morada). *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2013**, *18* (4), 555–556.
- (50) Sermini, C.; Acevedo, M.; Arredondo, M. Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2017**, *34* (4), 690–698. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.3182>.
- (51) Prieto, J.; González, C.; Román, A.; Prieto, F. Contaminación y Fitotoxicidad En Plantas Por Metales Pesados Provenientes de Suelos y Agua. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2009**, *10*, 29–44.
- (52) Farnsworth, N. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* **1966**, *55* (3), 225–276. <https://doi.org/10.1002/jps.2600550302>.
- (53) Torres, J.; Sinagawa, S.; Martínez, G.; López, A.; Sánchez, E.; Aguirre, V.; Torres, R.; Olivares, E.; Osorio, E.; Gutiérrez, A. Moringa Oleifera: Phytochemical Detection, Antioxidants, Enzymes and Antifungal Properties. *Rev. Int. botánica Exp.* **2013**, *82*, 193–202.
- (54) Echavarría, A.; D'Armas, H.; Matute, N.; Jaramillo, C.; Rojas, L.; Benitez, R.

- Evaluación de La Capacidad Antioxidante y Metabolitos Secundarios de Extractos de Dieciséis Plantas Medicinales. *Rev. Cienc. UNEMI* **2016**, 9 (20), 29–35.
- (55) Geetha, T. S.; Geetha, N. Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Primary and Secondary Metabolites of *Cymbopogon Citratus* (DC) Stapf. Leaves from Kodaikanal Hills, Tamilnadu. *Int. J. PharmTech Res.* **2014**, 6 (2), 521–529.
- (56) Murillo, E.; Ortíz, H.; Sánchez, W.; Suescún, F.; Yara, E.; Méndez, J. Screening de Extractos Vegetales Para Actividad Antioxidante: Un Estudio Comparativo Dealgunas Especies Medicinales de Uso Popular En El Tolima. *Asoc. Colomb. ciencias Biol.* **2008**, 20, 20–33.
- (57) Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J.; Kowalska, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; CRC Press, 2008.
- (58) Sharma, V.; Paliwal, R. Chemo Protective Role of *Moringa Oleifera* and Its Isolated Saponin against DMBA Induced Tissue Damage in Male Mice: A Histopathological Analysis. *Int. J. Drug Dev. Res.* **2012**, 4 (4), 215–228.
- (59) Thierry, H.; Sahpaz, S.; Gressier, B.; Joseph, H.; Bailleul, F. Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from *Lippia Alba*. *Phyther. Res.* **2008**, 22 (1), 256–258. <https://doi.org/10.1002/ptr>.
- (60) Roriz, C.; Barros, L.; Carvalho, A.; Santos, C.; Ferreira, I. *Pterospartum Tridentatum*, *Gomphrena Globosa* and *Cymbopogon Citratus*: A Phytochemical Study Focused on Antioxidant Compounds. *Food Res. Int.* **2014**, 62, 684–693. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.036>.
- (61) Brand, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- (62) Tesfay, S.; Bertling, I. Levels of Anti-Oxidants in Different Parts of *Moringa* (*Moringa Oleifera*) Seedling. *African J. Agric. Res.* **2011**, 6 (22), 5123–5132. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1101>.
- (63) Berteau, C.; Buffa, G.; Tesio, M.; Camusso, W.; Bossi, S.; Scannerini, S.; Maffei, M.; Tesio, M.; D'Agostino, G.; Mucciarelli, M. The C4biochemical Pathway, and the Anatomy of Lemongrass (*Cymbopogon Citratus* (DC) Stapf.) Cultivated in Temperate Climates. *Plant Biosyst.* **2003**, 137 (2), 175–184. <https://doi.org/10.1080/11263500312331351441>.
- (64) Brahma, J.; Brahma, B. Nutritional and Phytochemical Evaluation of Some Wild Aromatic Plants Used As Sources of Food and Medicines By the Bodo Tribes of Kokrajhar District ,Assam,India. *Int. J. Conserv. Sci.* **2016**, 7 (1), 137–146.
- (65) Gutierrez, D.; Ortiz, C.; Mendoza, A. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante En Malezas Usadas Para Alimentación Animal. *Simp. Metrol.* **2008**, 1–5.

- (66) Margraf, T.; Karnopp, A.; Rosso, N.; Granato, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Food Sci.* **2015**, *80* (11), 2397–2403. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077>.
- (67) Chen, L. Y.; Cheng, C. W.; Liang, J. Y. Effect of Esterification Condensation on the Folin-Ciocalteu Method for the Quantitative Measurement of Total Phenols. *Food Chem.* **2015**, *170*, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>.
- (68) Sánchez, R.; Ruiz, A. M.; Ruiz, C. G.; Ruiz, G. .; Sairitupac, D. R.; Aguirre, L. .; Salazar, A.; Loja, B. Actividad Antioxidante y Marcha Fitoquímica de Los Capítulos de Tagetes Filifolia Lag. “Pacha Anís.” *Horiz Med* **2017**, *17* (1), 18–24.
- (69) Muñoz, A.; Ramos, F. Componentes Fenólicos de La Dieta y Sus Propiedades Biomedicinales. *Rev. Horiz. Médico* **2007**, *7* (1), 23–31.
- (70) Linares, C.; Quiñones, J.; Pérez, A.; Carvajal, C.; Rivas, M.; Cid, G.; Pérez, L.; La Rosa, S.; Capdesuñer, Y. Obtención de Extractos Fenólicos Foliare de Moringa Oleifera Lam Mediante El Uso de Diferentes Métodos de Extracción. *Biotecnol. Veg.* **2018**, *18* (1), 47–56.
- (71) Alvis, A.; Martínez, W.; Arrazola, G. Obtención de Extractos Hidro-Alcohólicos de Limoncillo (*Cymbopogon Citratus*) Como Antioxidante Natural. *Inf. Tecnol.* **2012**, *23* (2), 3–10. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000200002>.
- (72) Yara, E.; Suescun, F.; Murillo, E.; Méndez, J. Tamizaje Fitoquímico y Actividad Antioxidante de Extractos Acuoso y Orgánicos de Justicia Pectoralis Jacq . (Amansa Toros) y de Volátiles y No Volátiles de Lippia Alba Mill (Pronto Alivio) Cultivadas En Diferentes Pisos Térmicos. *Sci. Tech.* **2007**, *13* (33), 349–350.
- (73) Guzmán, S.; Díaz, V. Diversidad En La Composición Fenólica y Capacidad Antioxidante de Colectas de Moringa Del Estado de Chiapas. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* **2017**, *8* (7), 1641–1645.
- (74) Teixeira, G.; Siqueira, J.; Lima, W.; Ferreira, L.; Duarte, J.; Alves, L. Phytochemical Characterisation and Bioprospection for Antibacterial and Antioxidant Activities of Lippia Alba Brown Ex Britton & Wilson (Verbenaceae). *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32* (6), 723–731. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1335727>.
- (75) Negrelle, R. R. B.; Gomes, E. C. *Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf: Chemical Composition and Biological Activities. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2007**, *9* (1), 80–92.
- (76) Granato, D.; Santos, J.; Galvao, L.; Sávio, D. Chemical Perspective and Criticism on Selected Analytical Methods Used to Estimate the Total Content of Phenolic Compounds in Food Matrices. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 266–279. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>.
- (77) Lester, G.; Lewers, K.; Medina, M.; Saftner, R. Comparative Analysis of Strawberry

- Total Phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay Interference by Ascorbic Acid. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, 27 (1), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.05.003>.
- (78) Mohammad, A. Chemistry and Antioxidant Activity of Plants Containing Some Phenolic Compounds. *Chem. Int.* **2015**, 1 (1), 35–52.
- (79) Tawaha, K.; Alali, F.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; Tamam, E.-E. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species. *Food Chem.* **2007**, 104, 1372–1378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.064>.
- (80) Chang, C.; Yang, M.; Wen, H.; Chern, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drugs Anal.* **2002**, 10 (3), 178–182. <https://doi.org/10.1097/00024382-199907000-00009>.
- (81) Shah, G.; Kaur, M.; Dhabilitya, F.; Shri, R. Pharmacognostic Standardization of *Cymbopogon Citratus* (Dc.) Stapf Leaves. *Pharmacogn. J.* **2012**, 4 (29), 19–25. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.29.3>.
- (82) Chies, C.; Branco, C.; Scola, G.; Agostini, F.; Gower, A.; Salvador, M. Antioxidant Effect of *Lippia Alba* (Miller) N. E. Brown. *Antioxidants* **2013**, 2, 194–205. <https://doi.org/10.3390/antiox2040194>.
- (83) Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, 5 (47), 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- (84) Stashenko, E.; Martínez, J.; Durán, D.; Córdoba, Y.; Caballero, D. Estudio Comparativo de La Composición Química y La Actividad Antioxidante de Los Aceites Esenciales de Algunas Plantas Del Género *Lippia* (Verbenaceae) Cultivadas En Colombia . *Rev. - Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* **2014**, 38, 89–105. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.156>.
- (85) Betancourt, E.; González, Y.; Escobar, R.; Bermúdez, D.; Blanco, F.; Martínez, C. Evaluación Del Potencial Hipolipemiante de *Cymbopogon Citratus* S. En Un Modelo de Hiperlipidemia Aguda. *Medicentro (Villa Clara)* **2015**, 19 (1), 2–12.
- (86) Charoensin, S. Antioxidant and Anticancer Activities of *Moringa Oleifera* Leaves. *J. Med. Plants Res.* **2014**, 8 (7), 318–325. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5353>.
- (87) Cui, K.; Luo, X.; Xu, K.; Ven, M. R. Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: Recent Developments in Assay Methods for Oxidative Stress and Nutraceutical Antioxidants. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2004**, 28, 771–799. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.05.023>.
- (88) Halliwell, B. Oxidative Stress, Nutrition and Health. Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans. *Free Radic. Res.* **1996**, 25 (1), 57–74. <https://doi.org/10.3109/10715769609145656>.
- (89) INEN. *NTE INEN 1334-1: Rotulado de Productos Alimenticios Para Consumo Humano. Parte I. Requisitos*; 2011.

- (90) INEN. *NTE INEN 1334-2 Rotulado de Productos Alimenticios Para Consumo Humano Parte 2. Rotulado, Nutricional, Requisitos.*; 2016.
- (91) INEN. *Rotulado de Productos Alimenticios Para Consumo Humano. Parte 3. Requisitos Para Declaraciones Nutricionales y Declaraciones Saludables*; 2011.
- (92) Henao, S.; Martínez, J.; Pachecho, N.; Marín, J. Actividad Bactericida de Extractos Acuáticos de *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown Contra *Helicobacter Pylori*. *Rev Col Gastroenterol* **2011**, 26 (2), 82–87u.
- (93) Ara, N.; Nur, M. .; Amran, M. .; Wahid, M. I. .; Ahmed, M. In Vitro Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Leaves and Flowers Extracts from *Lippia Alba*. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2009**, 12 (1), 87–90.
- (94) Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, M. E.; Villar, Á. Antiulcerogenic Activity of *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Farmaco* **2001**, 56 (5–7), 501–504. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01086-2](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01086-2).
- (95) Agudelo, L.; Gómez, G.; Durán, D.; Stashenko, E.; Betancur, L. Composición Química y Evaluación de La Actividad Antiherpética in Vitro de Aceites Esenciales de *Lippia Alba* (Mill) N.E. Brown y Sus Componentes Mayoritarios. *Rev. la Univ. Ind. Santander. Salud* **2010**, 42 (3), 230–239.
- (96) LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; ALBERTÓ, E.; GAZIM, Z. C. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones Del Aceite Esencial de *Lippia Alba*. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2016**, 18 (1), 191–200. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037.
- (97) Vale, T. G.; Furtado, E. C.; Santos, J. G.; Viana, G. S. . Central Effects of Citral , Myrcene and Limonene , Constituents of Essential Oil Chemotypes from *Lippia Alba* (Mill .) N . E . Brown. *Phytomedicine* **2002**, 9, 709–714.
- (98) Peixoto, M.; Costa-Júnior, L.; Blank, A.; Da Silva, A.; Alves, T.; Santos, D.; Barreto, P.; Cavalcanti, S.; Bacci, L.; Arrigoni-Blank, M. de F. Acaricidal Activity of Essential Oils from *Lippia Alba* Genotypes and its Major Components Carvone, Limonene, and Citral against *Rhipicephalus Microplus*. *Vet. Parasitol.* **2015**, 210 (1–2), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.010>.
- (99) Haldar, S.; Kar, B.; Dolai, N.; Kumar, R. B. S.; Behera, B.; Haldar, P. K. In Vivo Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of *Lippia Alba*. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2012**, 2 (SUPPL2). [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60241-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60241-2).
- (100) Viana, B.; Rigôr, L.; Brito, M.; Maia, F.; Reis, M.; Campos, E.; Tavares, M. Antiparasitic Activity of the Essential Oil of *Lippia Alba* on Ectoparasites of *Colossoma Macropomum* (Tambaqui) and Its Physiological and Histopathological Effects. *Aquaculture* **2016**, 452, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>.