



# UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INFUSIÓN DE HOJAS DE MORINGA OLEÍFERA (MORINGA) E  
HIBISCUS SABDARIFFA (FLOR DE JAMAICA)

BURGOS DIAS KARINA ALEXANDRA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

REYES JARA MARJORIE GABRIELA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2018



# UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA  
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INFUSIÓN DE HOJAS DE Moringa oleífera (MORINGA) E Hibiscus  
sabdariffa (FLOR DE JAMAICA)

BURGOS DIAS KARINA ALEXANDRA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

REYES JARA MARJORIE GABRIELA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2018



# UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA  
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

INFUSIÓN DE HOJAS DE Moringa oleífera (MORINGA) E Hibiscus sabdariffa (FLOR  
DE JAMAICA)

BURGOS DIAS KARINA ALEXANDRA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

REYES JARA MARJORIE GABRIELA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

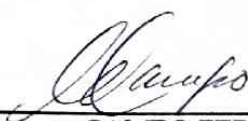
CAMPO FERNANDEZ MERCEDES

MACHALA, 24 DE SEPTIEMBRE DE 2018

MACHALA  
2018

**Nota de aceptación:**

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado INFUSIÓN DE HOJAS DE Moringa oleífera (MORINGA) E Hibiscus sabdariffa (FLOR DE JAMAICA), 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



---

JARAMILLO JARAMILLO GLADYS CARMITA

0701575920

ESPECIALISTA 2



---

GARCIA MIR VIVIANA

0959164617

ESPECIALISTA 3

Machala, 24 de septiembre de 2018

## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** Tesis URKUN.docx (D41014810)  
**Submitted:** 8/28/2018 2:34:00 PM  
**Submitted By:** mcampo@utmachala.edu.ec  
**Significance:** 8 %

### Sources included in the report:

Trabajo de Titulacion\_Lenin Alvarez\_Alex Tene.docx (D40910226)  
para urkund.docx (D41014585)  
finallllllllllllllllllll.docx (D16040636)  
TESIS-MORINGA-27-08-2018 FINAL.docx (D41005710)  
TESIS BASTIDAS-FERNANDEZ.docx (D16111040)  
Tesis URKUN.docx (D41014722)  
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1427/7/CD00285-TESIS.pdf>  
<https://slideplayer.es/slide/1124560/>  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222017000200003](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222017000200003)

### Instances where selected sources appear:

43

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

Las que suscriben, BURGOS DIAS KARINA ALEXANDRA y REYES JARA MARJORIE GABRIELA, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado INFUSIÓN DE HOJAS DE Moringa oleífera (MORINGA) E Hibiscus sabdariffa (FLOR DE JAMAICA), 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, 24 de septiembre de 2018

  
BURGOS DIAS KARINA ALEXANDRA  
0704883164

  
REYES JARA MARJORIE GABRIELA  
0705453629

## DEDICATORIA

A Dios, quien me supo guiar y llenar de fortaleza a lo largo de mi carrera, en los momentos difíciles que se me presentaron y no desistir para alcanzar mi meta tan anhelada como es mi título universitario.

A mi querida tutora Dra. Mercedes Campo por su, orientación, paciencia y conocimientos, por su, amistad y ayuda para poder culminar este sueño tan anhelado.

A mis amados padres, Maria Dias y Darlimt Burgos, por su amor, paciencia y sacrificio, han sido un pilar fundamental, por siempre apoyarme incondicionalmente. A mis abuelos, Magdalena Solórzano y Rodolfo Burgos, por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida.

A mi hija Valeshka Riofrío mi luz que hace que mis días sean maravillosos, tu mirada, tus abrazos ese amor tan grande que se ha convertido en mi fortaleza, para poder brindarte un mejor futuro.

A mis hermanas, Kerly Burgos y Katiana Burgos, por estar conmigo y apoyarme siempre las quiero mucho. A mi prima hermana, Verónica Burgos, mi confidente quien está presente siempre desde que nacimos, quien me escucha y comprende, la que siempre se asoma en las caídas a pesar de la distancia.

A mis amigos, Ninoska, Geomary, Brizna, Erwin, Gabriela, por estar a mi lado en estos años de vida universitaria, por apoyarme cuando más los necesite, por extender su mano en los momentos más difíciles, convirtiéndose en parte de mi familia.

*Karina Burgos Dias*

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la vida y salud, por ser mi fortaleza en este largo y arduo camino.

A mis padres Mirian y Juan, por su infinito amor y cariño, por la confianza que depositaron en mí, por sus sabios consejos que me permitieron no desmayar ni renunciar.

A mis hermanos Jhon, Abel, Jimmy y Camila por su cariño, paciencia y apoyo incondicional.

A mi sobrino Johan Mathías, mi niño lindo, que con su sonrisa y abrazos me inyectaba energías para seguir, convirtiéndose en mi fuente de inspiración para poder concluir esta etapa de mi vida.

A Geomary, Brizna, Erwin, Karina, Jennifer, Anaela y Oliver por su amistad incondicional, por estar en los buenos y peores momentos de mi vida, por sus palabras de aliento que me ayudaron a seguir adelante.

A BM por sus buenos consejos, paciencia y cariño, por compartir sus conocimientos conmigo.

A mi tutora y amiga Dra. Mercedes Campo por su entrega, paciencia y dedicación en la culminación de este trabajo.

*Gabriela Reyes Jara*



## AGRADECIMIENTO

Agradecemos primeramente a Dios por habernos acompañado y guiado en este largo camino universitario, por ser nuestra fortaleza en momentos de debilidad, por sus infinitas bendiciones.

A nuestros padres por brindarnos su apoyo incondicional en todo momento, por la oportunidad que nos brindaron y por sus sabios consejos.

A la Universidad Técnica de Machala y a nuestros docentes por brindarnos sus conocimientos y experiencias a lo largo de nuestra vida universitaria.

A nuestras queridas tutora Lcda. Mercedes Campo Fernández PhD y cotutora Ing. Nubia Matute Castro, por el tiempo dedicado a este trabajo de investigación, quienes con sus ideas, experiencias, paciencia y motivación han contribuido en la culminación de esta tesis.

A nuestros compañeros y amigos, Ninoska, Andrea, Erwin, Fernando, Jefferson, con quienes compartimos grandes momentos fuera y dentro de nuestra vida estudiantil, porque la vida es mejor con amigos.

¡Gracias infinitas!

*Karina Burgos y Gabriela Reyes*

## RESUMEN

*Moringa oleífera* Lam (moringa) es una planta tropical usada con propósitos medicinales y alimenticios. El interés de esta planta como alimento funcional y como fuente de nutraceuticos, está ampliamente difundido a escala mundial, siendo las hojas y semillas las de mayor utilización por el contenido de compuestos bioactivos. Tomando en consideración los beneficios que la misma reporta, el objetivo de la investigación fue diseñar una infusión combinando las hojas de *M. oleífera* (moringa) con los cálices de *H. sabdariffa* (Jamaica), aprovechando el contenido de nutrientes y bioactivos de estas materias primas vegetales. Para ello se realizó un análisis físico-químico de las drogas crudas, obteniéndose el 5,11% de humedad residual en *M. oleífera* y 6,92 % para *H. sabdariffa*. Se determinaron las cenizas totales en ambas materias primas, encontrándose 9,46% y 4,92% de materia inorgánica, respectivamente. Al ser tratadas las cenizas totales con HCl al 10%, dichos valores se redujeron a 3,39% y 1,12% para la moringa y Jamaica, respectivamente. El contenido de proteínas solo fue determinado para la moringa, a través del método de Bradford, siendo de 27,67 mg/100g de droga seca. El análisis del contenido de minerales determinó la presencia de los macrominerales N, P, K y Ca, resultando ser superiores los porcentajes obtenidos para la moringa, en todos los casos. Respecto a los microminerales cuantificados (Mg, Zn, Cu, Fe, Mn, Na y B), destaca la presencia de Fe (114,9 ppm) en la moringa, resultado referido por otros autores para dicha biomasa. La determinación de As y Pb en ambas drogas, arrojó valores inferiores a 0,005 y 0,09, respectivamente, de igual manera se realizó el análisis microbiológico; ambos parámetros cumplen con los límites establecidos para avalar el consumo de ambas drogas.

El tamizaje fitoquímico realizado en el extracto acuoso de las drogas vegetales, sugirió la presencia en ambos casos de: azúcares reductores, compuestos fenólicos, aminoácidos y flavonoides. Para el extracto de moringa se pudo además identificar saponinas y alcaloides. Para complementar el estudio anterior, en ambos extractos acuosos de las muestras en estudio, se realizó la cromatografía en capa delgada (CCD), sugiriendo la presencia de compuestos con grupos cromóforos conjugados (estructuras fenólicas simples, flavonoides) y saponinas para ambos extractos, sin embargo, los aminoácidos no fueron identificados en el extracto de jamaica.

Para la cuantificación de fenoles se empleó el método de Folin-Ciocalteu, demostrándose que los cálices de *H. sabdariffa* poseen mayor contenido de tales metabolitos (5138,83 mg

EAG/100g de droga cruda) en comparación con la moringa cuyo contenido fue de 2748,26 mg EAG/100g de droga cruda. El ensayo de la capacidad secuestradora de radicales libres por el método de DPPH evidenció que el extracto acuoso de los cálices de *H. sabdariffa* presenta una mayor capacidad antioxidante con un  $CI_{50} = 0,0503$  mg/mL, siendo de 0,0866 mg/mL para el extracto de moringa, lo cual guarda relación directa con el contenido de polifenoles.

Paralelamente, se realizó un análisis mediante CLAE-EM en ambos extractos acuosos, utilizando como fase estacionaria una columna Accucore RP-MS C18, como fase móvil acetonitrilo y agua ácida (ácido fórmico al 0,1 % en agua). La elución fue en gradiente y como detector se utilizó un espectrómetro de masas, realizando el análisis en modo positivo y negativo y optimizando las condiciones, en base a una infusión de una solución de quercetina (15 ppm). Para la *M. oleífera* se identificaron metabolitos de naturaleza fenólica, tales como flavonoides glicosilados, fundamentalmente, derivados de quercetina, apigenina y kaempferol; ácidos fenólicos (3,4-di-O-caffeoilquínico, ácido 3-O-caffeoilquínico, ácido 4-O-caffeoilquínico) y un lignano (isolariciresinol glicósido/lariceresinol glicósido). Además de ácidos orgánicos (ácido glucónico y ácido cítrico) y el aminoácido fenilalanina. En la muestra de *H. sabdariffa* se identificaron antocianinas (delfinidina-3-sambubiósido, cianidina 3-sambubiósido, delfinidina-3-galactósido), flavonoides glicosilados (quercetina 3-rutinósido, quercetina 3-glucósido, kaempferol 3-(*p*-coumarilglucósido) y ácidos orgánicos (ácido hidroxicítrico, ácido hibiscus).

La formulación se determinó a través de un diseño experimental completamente al azar, realizando mezclas de *M. oleífera* y *H. sabdariffa* en proporciones de 50:50, 70:30 y 80:20, respectivamente. Se evaluó la respuesta sensorial de preferencia de 46 jueces consumidores, siendo la mezcla 50:50 la mejor puntuada por ellos. La formulación de mayor aceptación se envasó en bolsas de papel filtro sellable, en una envasadora automática para bolsas de té sin sobre. En el control de calidad de la infusión se determinaron: índice de refracción (1,33), grados Brix (0,84%), fructosa (0,86%), glucosa (0,85%), azúcar invertida (0,86%), pH (3,16) y densidad relativa (1,001 g/cm<sup>3</sup>). Además, se cuantificó el por ciento de fenoles totales (42,89 mg) por cada 200 mL de la infusión, lográndose en dicha preparación, una capacidad inhibitoria del DPPH con un  $IC_{50}$  de 0,06 mg/mL. Se concluye que la infusión diseñada posee las características necesarias para ser

considerada como una bebida funcional, útil en la prevención de trastornos inherentes a la salud humana.

**Palabras claves:** *Moringa oleifera*, *Hibiscus sabdariffa*, Té de hierbas, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, CLAR-EM.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* Lam (moringa) is a tropical plant used with medicinal and food purposes. The interest of this plant as a functional food and as a source of nutraceuticals is widely disseminated worldwide, with leaves and seeds being the most widely used due to the content of bioactive compounds. Taking into consideration the benefits that it reports, the objective of the research was to design an infusion combining the leaves of *M. oleifera* (moringa) with the chalice of *H. sabdariffa* (Jamaica), taking advantage of the nutrient and bioactive content of these materials vegetable bonuses. To do this, a physical-chemical analysis of crude drugs was performed, obtaining 5.11% residual moisture in *M. oleifera* and 6.92% for *H. sabdariffa*. The total ashes were determined in both raw materials, finding 9.46% and 4.92% of inorganic matter. When total ash was treated with 10% HCl, these values were reduced to 3.39% and 1.12% for moringa and Jamaica, respectively. The protein content was only determined for moringa, through the Bradford method, being 27.67 mg/100g of dry drug. The analysis of the mineral content determined the presence of the macronutrients N, P, K and Ca, resulting in higher percentages obtained for moringa, in all cases. With regard to quantified micronutrients (Mg, Zn, Cu, Fe, Mn, Na and B), the presence of Fe (114.9 ppm) in moringa stands out, a result referred by other authors for said biomass. The determination of As and Pb in both drugs yielded values lower than 0.005 and 0.09, respectively, in the same way the microbiological analysis was performed; both parameters comply with the limits established to guarantee the consumption of both drugs.

The phytochemical screening performed on the aqueous extract of plant drugs, suggested the presence in both cases of: reducing sugars, phenolic compounds, amino acids and flavonoids. For moringa extract it was also possible to identify saponins and alkaloids. To complement the previous study, in both aqueous extracts of the samples under study, thin layer chromatography (TLC) was performed, suggesting the presence of compounds with conjugated chromophore groups (simple phenolic structures, flavonoids) and saponins for both extracts, without. However, the amino acids were not identified in the Jamaica extract.

For the quantification of phenols, the Folin-Ciocalteu method was used, demonstrating that the chalice of *H. sabdariffa* have a higher content of such metabolites (5138.83 mg EAG/100g of crude drug) compared to moringa whose content was 2748.26 mg EAG/100g

of raw drug. The assay of the free radical scavenger capacity by the DPPH method showed that the aqueous extract of the chalice of *H. sabdariffa* has a higher antioxidant capacity with an  $IC_{50} = 0.0503$  mg/mL, being 0.0866 mg/mL for moringa extract, which is directly related to the polyphenol content.

In parallel, a CLAE-EM analysis was carried out in both aqueous extracts, using as a stationary phase an Accucore RP-MS C18 column, as a mobile phase acetonitrile and acid water (0.1% formic acid in water). The elution was in gradient and as detector a mass spectrometer was used, performing the analysis in positive and negative mode and optimizing the conditions, based on an infusion of a solution of quercetin (15 ppm). For *M. oleifera* metabolites of phenolic nature were identified, such as glycosylated flavonoids, mainly derived from quercetin, apigenin and kaempferol; phenolic acids (3,4-di-O-caffeoylquinic, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid) and a lignan (isolariciresinol glycoside / lariceresinol glycoside). In addition to organic acids (gluconic acid and citric acid) and the amino acid phenylalanine. In the *H. sabdariffa* sample, anthocyanins (delphinidin-3-sambubioside, cyanidin 3-sambubioside, delphinidin-3-galactoside), glycosylated flavonoids (quercetin 3-rutinoside, quercetin 3-glucoside, kaempferol 3-(p-coumaroylglucoside) were identified and organic acids (hydroxycitric acid, hibiscus acid).

The formulation was determined through a completely randomized experimental design, performing mixtures of *M. oleifera* and *H. sabdariffa* in proportions of 50:50, 70:30 and 80:20, respectively. The sensory response of 46 consumer judges was evaluated, with the 50:50 mixture being the best one rated by them. The most accepted formulation was packed in sealable filter paper bags, in an automatic bag packer without sachet. In the quality control of the infusion were determined: refractive index (1.33), Brix degrees (0.84%), fructose (0.86%), glucose (0.85%), invert sugar (0, 86%), pH (3.16) and relative density (1.001 g/cm<sup>3</sup>). In addition, the percentage of total phenols (42.89 mg) was quantified for each 200 ml of the infusion, attaining in this preparation, an inhibitory capacity of DPPH with an  $IC_{50}$  of 0.06 mg/mL. It is concluded that the designed infusion has the necessary characteristics to be considered as a functional drink, useful in the prevention of disorders inherent in human health.

**Key words:** *Moringa oleifera*, *Hibiscus sabdariffa*, Herbal tea, phenolic compounds, antioxidant activity, CLAR-EM.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	
Objetivo general	
Objetivos específicos	
CAPÍTULO I	3
MARCO TEÓRICO	3
I.1 Productos naturales y su aceptación en la actualidad	3
I.2 <i>Moringa oleifera</i> Lam (moringa)	3
I.2.1 Generalidades de la especie	3
I.2.2 Descripción botánica	4
I.2.3 Composición química	7
I.2.4 Actividad biológica	9
I.2.4.1 Usos tradicionales	9
I.2.4.2 Estudios biológicos	9
I.3 <i>Hibiscus sabdariffa</i> Lam	12
I.3.1 Generalidades de la especie	12
I.3.2 Descripción botánica	12
I.3.3 Composición química	14
I.3.4 Actividad biológica	14
I.3.4.1 Uso tradicional	14
I.3.4.2 Estudios biológicos	15
I.3.5 Infusiones	16
I.3.6 Requisitos de hierbas aromáticas	17
CAPÍTULO II	19

MATERIALES Y MÉTODOS	19
II.1 Material vegetal	19
II.2 Tratamiento poscosecha	19
II.2.1 Lavado, desinfección y secado	19
II.2.2 Molienda	20
II.3 Análisis físico-químicos a las drogas vegetales crudas	20
II.3.1 Determinación de la humedad residual	20
II.3.2 Determinación de cenizas totales	20
II.3.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	21
II.3.5 Determinación de minerales	22
II.3.7 Control microbiológico	22
II.4 Tamizaje fitoquímico	23
II.5 Cromatografía en capa delgada	23
II.6 Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	24
II.7 Elaboración del extracto acuoso seco	25
II.8 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	25
II.8.1 Análisis cualitativo mediante CCD	25
II.8.2 Análisis cuantitativo por espectrofotometría	25
II.8.3 Determinación de la cinética de reacción con el DPPH	26
II.9 Estudio químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) de los extractos acuosos de <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i>	27
II.10 Diseño de la formulación	28
II.11 Control de calidad de la infusión	29
II.11.1 Determinación del peso promedio	29
II.11.2 Determinación de grados Brix, índice de refracción, fructosa, glucosa y azúcar invertida	29



II.11.3 Determinación de pH	29
II.11.4 Determinación de la densidad relativa	29
II.11.5 Determinación de fenoles por Folin-Ciocalteu	30
II.11.6 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	30
II.12 Análisis Estadístico	30
CAPÍTULO III	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
III.1 Análisis físico-químico a las drogas vegetales crudas	31
III.1.1 Determinación de minerales	33
III.1.2 Control microbiológico	37
III.2 Tamizaje fitoquímico	37
III.3 Cromatografía en capa delgada (CCD)	39
III.4 Determinación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu	42
III.5 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	44
III.6 Estudio químico mediante CLAE-EM de los extractos acuosos de <i>M. oleífera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .	48
III.7 Diseño de la formulación y control de calidad de la infusión.	54
CAPÍTULO IV	57
CONCLUSIONES	57
CAPÍTULO V	59
RECOMENDACIONES	59
ANEXOS	60
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	63

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>M. oleifera</i> .....	6
Tabla 2. Compuestos químicos presentes en las hojas de <i>M. oleifera</i> .....	8
Tabla 3. Estudios biológicos realizados en hojas de <i>M. oleifera</i> .....	10
Tabla 4. Clasificación taxonómica de la especie <i>H. sabdariffa</i> .....	12
Tabla 5. Composición química identificada en cálices de <i>H. sabdariffa</i> .....	14
Tabla 6. Estudios biológicos realizados con los cálices de <i>H. sabdariffa</i> .....	15
Tabla 7. Requisitos establecidos en la Norma INEN 2392:2013 .....	17
Tabla 8. Diseño experimental completamente al azar .....	28
Tabla 9. Análisis farmacognóstico de las drogas crudas de hojas de <i>M. oleifera</i> y cálices de <i>H. sabdariffa</i> .....	32
Tabla 10. Minerales presentes en hojas de <i>M. oleifera</i> y cálices de <i>H. sabdariffa</i> .....	33
Tabla 11. Minerales presentes en hojas de <i>M. oleifera</i> referidos por otros autores.....	34
Tabla 12. Minerales analizados en la <i>H. sabdariffa</i> según las literaturas reportadas.....	35
Tabla 13. Resultado del análisis de metales pesados en <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .....	37
Tabla 14. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos de <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .....	39
Tabla 15. Fenoles totales presentes en <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .....	43
Tabla 16. Capacidad secuestradora de radicales libres frente al DPPH de la <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .....	46
Tabla 17. Compuestos químicos identificados en la <i>M. oleifera</i> , mediante CLAE-EM (modo negativo).....	49
Tabla 18. Compuestos químicos identificados en el extracto acuoso de <i>H. sabdariffa</i> mediante CLAE-EM (modo positivo). .....	51
Tabla 19. Compuestos químicos identificados en el extracto acuoso de <i>H. sabdariffa</i> mediante CLAE-EM (modo negativo) .....	52
Tabla 20. Resultados del control de calidad en la infusión de <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A, semillas; B, vainas; C, hojas; D, flores de <i>M. oleifera</i> Lam.....	5
Figura 2. A, semillas; B, cáliz; C, flor; D, hojas de la <i>H. sabdariffa</i> .....	13
Figura 3. Ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico .....	23
Figura 4. Análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos acuosos de <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> . FM: butanol:ácido acético:agua (65:25:10); FE: placas de vidrio de sílica gel GF254 .....	41
Figura 5. Resultados de la actividad antioxidante por CCD de los extractos acuosos de <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> .....	45
Figura 6. Relación entre los mg EAG por cada 100 g de droga y la capacidad secuestradora de radicales libres (CI <sub>50</sub> ) de las dos especies estudiadas .....	46
Figura 7. Cinética de la reacción con DPPH para los extractos acuosos de <i>M. oleifera</i> e <i>H. sabdariffa</i> a diferentes concentraciones .....	48
Figura 8. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto acuoso de <i>M. oleifera</i> .....	48
Figura 9. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto acuoso seco de <i>H. sabdariffa</i> (modo positivo) .....	51
Figura 10. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto acuoso seco de <i>H. sabdariffa</i> (modo negativo) .....	52
Figura 11. Diagrama de caja y bigotes para la evaluación sensorial de ordenamiento .....	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Valor nutritivo de hojas frescas y polvo de hojas secas por cada 100 g de droga vegetal.....	60
Anexo 2. Ficha de evaluación sensorial de ordenamiento.....	61
Anexo 3. Tabla de análisis de varianza .....	61
Anexo 4. Prueba de rangos múltiples .....	62

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos se han investigado las plantas medicinales, los compuestos químicos que presentan y las propiedades medicinales asociadas a ellos. En la actualidad, las investigaciones en plantas medicinales vuelven a ser el centro de atención, debido a las evidencias que existen de los compuestos bioactivos presentes en muchas de ellas, incrementándose el interés en la búsqueda de nuevos productos naturales. Se han realizado bioensayos en los que se evidencia la capacidad de prevenir el desarrollo de enfermedades, la toxicidad y los efectos adversos, factor importante para la demanda en el aumento de fabricantes de medicamentos a base de hierbas, provocando una reducción en el uso de drogas químicas (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018; Raclariu *et al.*, 2018).

El impacto de las plantas medicinales con gran potencial terapéutico, incrementó el uso de los productos naturales a nivel mundial en un 64%. Se ha creado conciencia en evaluar su seguridad en los efectos farmacológicos y eficacia, lo cual requiere de un enfoque científico completo. El tratamiento fitoterapéutico se puede utilizar en todos los campos de la medicina, pero es necesario una disciplina científica. La organización mundial de la salud reconoce a las plantas medicinales como sustancias con propiedades para la prevención y cura de enfermedades. Las industrias farmacéuticas tienen la responsabilidad de conservar las especies de las plantas medicinales ya que son quienes las explotan como negocio (Verma y Singh, 2008).

La moringa (*Moringa oleifera* L.) es un árbol nativo de la India, pertenece a la familia de las moringaceae, se ha naturalizado en todas las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo. Se la conoce por diferentes nombres, entre ellos, “árbol de la vida”, “árbol de los milagros” debido a su gran contenido de nutrientes (Martín *et al.*, 2013). Todas las partes del árbol se utilizan con diferentes propósitos, como alimento, medicamento, producción de biodisel (Guaycha *et al.*, 2017; Leone *et al.*, 2015).

Las hojas frescas de moringa poseen minerales, hierro, aminoácidos esenciales, vitaminas, calcio, entre otros, los cuales le garantizan sus cualidades nutricionales. Adicionalmente, se refieren metabolitos bioactivos tales como compuestos fenólicos, flavonoides, glucosinolatos, isotiocianatos, saponinas y alcaloides, los que le otorgan las propiedades terapéuticas (Leone *et al.*, 2015). Como fitoterapéutico las hojas se emplean como

antiinflamatorio, antihipertensivo, antioxidante, hepatoprotector, neuroprotector, hipoglucemiante y antimicrobiano (Abdallah, 2016).

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de la India y Malasia, pertenece a la familia Malvaceae, es muy popular en países del medio oriente. La parte que más se utiliza de la Jamaica es el cáliz o flor debido a su potencial farmacéutico y alimenticio (Cid y Guerrero, 2012). Los extractos de los cálices se emplean como colorante natural para alimentos, en emulsiones para bebidas, mermeladas, licores, harinas, etc. (Sáyago y Goñi, 2010).

Los cálices son ricos en vitaminas, minerales, antocianinas, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos y flavonoides (Salinas *et al.*, 2012). Los efectos biológicos que se le refieren son antiescorbútico, diurético, colerético, antihipertensivo, antianémico, para tratar problemas cardíacos y nerviosos, laxante suave, etc. (Onyenekwe *et al.*, 1999; Salinas *et al.*, 2012).

En la actualidad, se buscan alimentos naturales que proporcionan propiedades nutricionales y funcionales de fácil introducción a la dieta de las personas. Las bebidas funcionales son aquellas que brindan beneficios para la salud humana. Dentro de estas bebidas se incluyen las infusiones o té, donde su consumo ha aumentado, ya que además de aportar agua, también aportan fitoquímicos y nutrientes. Las infusiones son bebidas que se obtienen ya sea de las raíces, cortezas, hojas, flores y frutos, con agua caliente (a punto de hervir), que aportan beneficios a la salud gracias a efectos tales como su actividad antioxidante (Gamboa, 2014).

En los últimos años ha existido avance de la biología molecular, en un afán de conocer cada vez mejor la causa de las enfermedades. Entre los estudios realizados se destacan los referidos al oxígeno, una molécula imprescindible para la vida, pero también es un elemento nocivo. Para contrarrestar tales efectos la naturaleza posee sistemas de control, los sistemas antioxidantes, que neutralizan los cambios producidos por el oxígeno y otras sustancias a escala celular (Viada *et al.*, 2017).

El grupo de trabajo se ha propuesto como objetivo del proyecto que desarrolla, diseñar varias opciones de infusiones, donde se utilicen las hojas secas y molidas de la *M. oleifera*, como ingrediente común. Dadas las deficientes características organolépticas que presenta dicha materia prima, se busca combinarlas con otras plantas que, además de enmascarar, fundamentalmente, sabor y olor, contribuyan en el aporte de metabolitos bioactivos favorables para el adecuado mantenimiento de la salud humana.

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue diseñar un té de hojas secas de moringa (*M. oleifera*) y cálices de flor de Jamaica deshidratados (*H. sabdariffa*), que aporte componentes nutricionales y bioactivos, que ayuden a mejorar la calidad de vida y la salud humana.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La necesidad de diseñar una mezcla de hojas de *M. oleifera* (moringa), con los cálices de *H. sabdariffa* (flor de Jamaica), para preparar en forma de infusión, obteniéndose una bebida agradable que ayude a prevenir enfermedades.

## **HIPÓTESIS**

Es posible el diseño de una formulación para elaborar como infusión (té de hierbas) empleando las hojas de moringa y flor de Jamaica, aprovechando el contenido en macro y micronutrientes, así como sus metabolitos secundarios hidrosolubles, con posibles beneficios para la salud humana.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Diseñar una formulación para preparar en forma de infusión, mediante la combinación de hojas de *M. oleifera* (moringa), con los cálices de *H. sabdariffa* (flor de Jamaica), aprovechando los componentes nutricionales y bioactivos de las materias primas vegetales, para lograr un alimento funcional de calidad y con beneficios para la salud humana.

### **Objetivos específicos**

- Determinar los requisitos de calidad y eficacia de las materias primas vegetales.
- Diseñar la formulación a base de hojas de moringa y flor de Jamaica para consumir en forma de infusión.
- Evaluar la calidad física, química y biológica de la formulación.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### **I.1 Productos naturales y su aceptación en la actualidad**

Desde tiempos históricos los productos naturales han sido aceptados por los seres humanos como remedios medicinales para aliviar y tratar enfermedades. Antiguamente, como no existían medicamentos, nuestros ancestros fueron descubriendo los tipos de plantas vegetales que eran beneficiosas, así como aquellas que por los efectos adversos que poseían, resultaban venenosas. Con el avance de la tecnología y las investigaciones, las plantas han ido pasando a ser procesadas a nivel industrial, con evidentes estudio desde el punto de vista químico y farmacológico. En la actualidad hasta un 25% de los fármacos prescritos, contienen al menos un principio activo derivado de una planta, siendo el resultado de un proceso de investigación, a través del cual se ha demostrado su eficacia (Baquero, 2007).

En diferentes países del mundo como Europa, Sudamérica, entre otros, el consumo de productos naturales se ha incrementado en la actualidad siendo consumido, aproximadamente, por el 50% de sus habitantes. Son considerados como medicamentos, dietéticos, suplementos alimenticios, entre otros. El nivel de aceptación se ha elevado debido a que las investigaciones que avalan su calidad, efectividad y seguridad, así como las exigencias de los organismos regulatorios a nivel internacional, también se han incrementado (Cañigual y Dellacassa, 2003).

### **I.2 *Moringa oleifera* Lam (moringa)**

#### **I.2.1 Generalidades de la especie**

La moringa (*M. oleifera*) es originario de la región del Himalaya y el noreste de la India y se ha naturalizado en todos los países tropicales y subtropicales, fue introducido en América Latina como árbol ornamental y cercas vivas en 1920 (Padilla *et al.*, 2014). Es un árbol de crecimiento rápido, con pocas exigencias del suelo ya que puede soportar largos períodos de sequía, le aporta nutrientes al suelo y lo protege de factores como la erosión, desecación y altas temperaturas. En la actualidad se cultiva en las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas en todo el mundo. Se le atribuyen muchos usos beneficiosos para el bienestar y la salud, entre ellos sus hojas para la alimentación humana y animal por



su alto contenido de vitaminas A y C, calcio, hierro, aminoácidos y proteínas, como medicina y en relación a las semillas se emplean en tratamiento de aguas. Además, se utilizan como insumos en la agricultura e industria para la elaboración de biocombustibles ya sea como bioetanol, biodiesel o biogás (Godino *et al.*, 2012; Doménech *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2017).

Es considerada como alimento funcional en países de la India y África, ha sido utilizada por muchas culturas a nivel mundial como medicina tradicional durante siglos. Existen pruebas que demuestran que las hojas y frutos de la moringa complementaban la dieta de los reyes y reinas, para mantener una mente alerta y una piel sana. Las propiedades que le otorgaban de combatir el asma, bronquitis, infecciones de la piel, prevención de anemia y diabetes (Mahmood *et al.*, 2010).

Esta planta ofrece una gran versatilidad para la elaboración de productos alimenticios, debido a que todas las partes anatómicas son comestibles. En Asia y África su principal uso es como complemento alimenticio, es considerada un recurso de primer orden debido a su bajo costo en la producción para la prevención de la desnutrición y patologías asociadas a la carencia de vitaminas y aminoácidos esenciales (Magaña, 2012). En Nigeria consumen las hojas en sopas, infusiones, ensaladas y como especia. Se dice que las hojas de moringa poseen más vitamina A que las zanahorias, mucho más calcio que la leche, más vitamina C que las naranjas, más cantidad de hierro que la espinaca y más potasio que un banano (Doménech *et al.*, 2017).

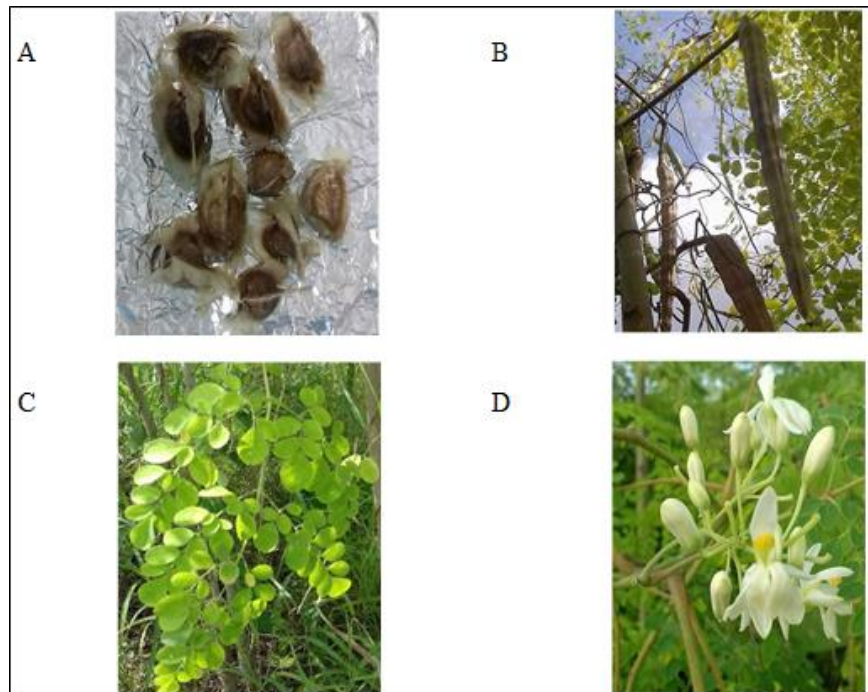
### **1.2.2 Descripción botánica**

La moringa es conocida también como marango, resedá, árbol de rábano, árbol de las perlas, rábano picante, palito de tambor, árbol de baqueta, árbol de los espárragos, ángela, entre otros (Villareal y Ortega, 2014).

Es una planta perenne, de crecimiento rápido, en un año puede llegar a crecer de 6 a 7 metros, su altura máxima de crecimiento es de 10 a 12 metros, su tronco posee un diámetro de 20 a 40 cm, tiene una vida promedio de 20 años, tiene una copa ancha poco densa tipo paraguas, ramas extendidas de unos 20 cm de largo y hojas compuestas dispuestas en grupos con folíolos oblongos delgados de 1 a 2 cm de largo y de color verde claro. Las flores son bisexuales con pétalos de color blanco y estambres amarillentos, perfumados y numerosos, miden de 1 a 1,5 cm de largo. Los frutos encapsulados trilobulados de hasta 45 cm de largo y 2 cm de ancho, contienen entre 12 a 25 semillas por fruto. Las semillas son

de color castaño oscuro, de forma redonda con tres alas blanquecinas (ver figura 1). Un árbol puede llegar a producir de 15.000 a 25.000 semillas cada año (Pérez *et al.*, 2010). Desarrollan una raíz pivotante tuberosa de aspecto hinchado, color blanco y olor picante característico, su reproducción se puede dar ya sea por estacas o semillas (Liñán, 2010; Vinoth *et al.*, 2012).

**Figura 1. A, semillas; B, vainas; C, hojas; D, flores de *M. oleifera* Lam.**



El clima influye en el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. La moringa crece en climas semiáridos, húmedos y semihúmedos, crecen en alturas desde el nivel del mar hasta 1200 m de altitud, en temperaturas entre 24 y 32 °C. Necesita al menos 700 mm anuales de humedad para su crecimiento y desarrollo. Crecen en casi todo tipo de suelos, desde ácidos hasta alcalinos (pH 4.5-8), pero el mejor desarrollo y productividad se da en suelos neutros o ligeramente alcalinos, tolera suelos ligeramente arcillosos (Reyes y Mendieta, 2017).

Taxonómicamente se clasifica como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *M. oleifera***

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Superdivisión</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Superorden</b>	<i>Rosanae</i>
<b>Orden</b>	<i>Brassicales</i>
<b>Familia</b>	<i>Moringaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Moringa</i>
<b>Especie</b>	<i>Moringa oleífera</i> Lam.

**Fuente:** (ITIS, 2018)

La moringa pertenece al género *Moringa*, existen 13 especies, las cuales se relacionan a continuación, siendo la *oleífera* la más conocida y utilizada por sus grandes bondades (Liñán, 2010; Sarwar, 2017).

- *M. arbórea*
- *M. concanensis*
- *M. drouhardii*
- *M. hildebrandtii*
- *M. pygmaea*
- *M. peregrina*
- *M. ovalifolia*
- *M. ruspoliana*

- *M. stenopetala*
- *M. rivae*
- *M. oleifera*
- *M. longituba*
- *M. borziana*

### **I.2.3 Composición química**

La moringa ha sido considerada por muchos como el “árbol milagroso”, ya que de ella se aprovecha casi todo: raíz, corteza, tallo, hojas, flores, vainas, semillas y goma. Es un recurso natural con un gran valor nutritivo ya que es rico en vitaminas, antioxidantes, aceites, proteínas y microelementos (Matos *et al.*, 2016). En el anexo 1 se muestra el valor nutritivo de las hojas frescas y secas de moringa por cada 100 g de droga vegetal.

La moringa posee altos niveles de vitamina A (beta-caroteno), como también vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C, E y K. Entre los minerales más importantes está el calcio, potasio, hierro, cobre, zinc, magnesio, además de aminoácidos esenciales y antioxidantes como el ácido ascórbico, fenoles, flavonoides (quercetina, kampferol, miricetina, isoramnetina), carotenoides, etc. (Márquez *et al.*, 2017). También se han identificado otros metabolitos secundarios como taninos, isocianatos, esteroides y glucoesteroides, glicósidos fenólicos y cardiacos, ácidos grasos, malonilglicósidos, ramnosa (azúcar simple), glucosinolatos e isotiocianatos (Bonal *et al.*, 2012; Velásquez *et al.*, 2016). Canett *et al.* (2014) refirieron la presencia de alcaloides (moringina, moringinina, spirochin y bencil isotiocianato) en la raíz, semilla y corteza de la planta.

Las hojas poseen  $\beta$ -caroteno, proteínas, calcio, potasio y compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, flavonoides, compuestos fenólicos (Anwar *et al.*, 2007).

**Tabla 2. Compuestos químicos presentes en las hojas de *M. oleifera***

Compuesto químico	Referencias
<b>Vitaminas</b>	(Mahmood <i>et al.</i> , 2010)
Retinol, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, tocoferol	(Promkum <i>et al.</i> , 2010) (Leone <i>et al.</i> , 2015)
<b>Ácidos Fenólicos</b>	
Ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumarico, ácido elágico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido gentílico, ácido siríngico, ácido sinápico.	(Vongsak <i>et al.</i> , 2013) (Leone <i>et al.</i> , 2015)
<b>Flavonoides</b>	
Miricetina, quercetina, quercetina hidroximetilglutaroil hexosa, quercetina acetil hexosa, quercetina malonil hexosa, rutina, isoramnetina, isoramnetina hexosa, epicatequina, genisteína, luteolin, daidzeína, apigenina 6,8 C-dihexosa, kaempferol, kaempferol acetil dihexosa, kaempferol malonil hexosa.	(Amaglo <i>et al.</i> , 2010) (Leone <i>et al.</i> , 2015) (Makita <i>et al.</i> , 2016)
<b>Alcaloides</b>	
N, $\alpha$ -L-ramnopiranosil vincosamida	
4-( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi) fenilacetónitrilo	
pirrolemarumina 4''-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido metilo 4-( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)- benzicarbamato	(Leone <i>et al.</i> , 2015)
4'-hidroxifeniletanamida- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (marumósido A)	
3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-derivado (marumósido B)	
<b>Glucosinolatos</b>	
Bencilglucosinolato	(Bennett <i>et al.</i> , 2003)
4-hidroxibencil glucosinolato	(Amaglo <i>et al.</i> , 2010)
4-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-bencilglucosinolato	(Leone <i>et al.</i> , 2015)
4-O-( $\alpha$ -L-acetil-ramnopiranosiloxi)- bencilglucosinolato isómeros 1, 2 y 3	(Padilla <i>et al.</i> , 2016)
<b>Aminoácidos esenciales</b>	
Histidina, Treonina, Arginina, Valina, Metionina, Isoleucina, Fenilalanina, Triptófano, Lisina.	(Padilla <i>et al.</i> , 2016)

**Tabla 2. (Continuación)**

Compuesto químico	Referencias
<b>Isotiocianatos</b>	
4-( $\alpha$ -L-ramnosiloxi) bencilisotiocianato (R1, R2, R3 = H)	
4-(4'-O-acetil- $\alpha$ - ramnosiloxi) bencil isotiocianato (R1, R2 =H, R3= Ac.)	(Promkum <i>et al.</i> , 2010)
4-(4'-O-acetil- $\alpha$ - ramnosiloxi) bencil isotiocianato (R1, R3 =H, R2= Ac.)	(Martín <i>et al.</i> , 2013)
4-(4'-O-acetil- $\alpha$ - ramnosiloxi) bencil isotiocianato (R3, R2 =H, R1= Ac.)	(Waterman <i>et al.</i> , 2014)

## I.2.4 Actividad biológica

### I.2.4.1 Usos tradicionales

Como se ha mencionado anteriormente, todas las partes de la planta se utilizan tradicionalmente para muchos propósitos, para la alimentación humana, animal y como medicina tradicional, gracias a sus cualidades nutritivas y a sus compuestos bioactivos (Martín *et al.*, 2013).

En la medicina tradicional, las hojas se utilizan como purgante, contra el dolor de cabeza (frotando en la cien), para tratar hemorroides, tifoidea, fiebre, escorbuto, catarro, dolor de garganta, infección del oído, cortes, estimulación del sistema inmune (relacionado con el VIH), problemas genito-urinario, anemia, entre otras afecciones. También le han dado otros usos medicinales como antiespasmódico, hipoglucemiante, antihipertensiva, para tratar hiperlipidemias, osteoartritis, además es gastroprotectora, hepatoprotectora, antiinflamatoria y antioxidante (Villarreal *et al.*, 2014; Marrero *et al.*, 2014; Leone *et al.*, 2015).

### I.2.4.2 Estudios biológicos

La *M. oleifera* ha demostrado una variedad de efectos farmacológicos como lo muestra la tabla 3.

**Tabla 3. Estudios biológicos realizados en hojas de *M. oleifera***

<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	<b>TIPO DE ESTUDIO</b>
Hepatoprotector	<i>In vivo</i> (rata Wistar) (Pari y Ashok, 2004)
	<i>In vivo</i> (rata Sprague - Dawley) (Fakurazi <i>et al.</i> , 2012)
	<i>In vivo</i> (rata Wistar albino) (Singh <i>et al.</i> , 2014)
Anticancerígeno	<i>In vitro</i> (línea de células tumorales KB) (Sreelatha <i>et al.</i> , 2011)
	<i>In vitro</i> (carcinoma hepatocelular humano, adenocarcinoma colorrectal y mama) (Charoensin, 2014)
	<i>In vitro</i> (células cancerosas, línea celular de riñón de mono verde africano) (Jung, 2014)
	<i>In vitro</i> (células cancerosas) (Madi <i>et al.</i> , 2016)
Hipolipidémico	<i>In vivo</i> (rata albino) (Ara <i>et al.</i> , 2008)
	<i>In vivo e in vitro</i> (conejos) (Chumark <i>et al.</i> , 2008)
	<i>In vivo</i> (rata Wistar) (Atsukwei <i>et al.</i> , 2014)
Antihiper glucémico	<i>In vivo</i> (rata Wistar) (Ghashi <i>et al.</i> , 2000)
	<i>In vivo</i> (rata albino) (Ara <i>et al.</i> , 2008)
	<i>In vivo</i> (rata Wistar albino) (Jaiswal <i>et al.</i> , 2009)
	<i>In vivo</i> (rata Wistar) (Omodanisi <i>et al.</i> , 2017)
	<i>In vivo</i> (ratón) (Paula <i>et al.</i> , 2017)
Antiparasitario	<i>In vitro</i> (huevos de strongílidos) (Puerto <i>et al.</i> , 2014)
Antihipertensivo	<i>In vitro</i> (conejillo de indias) (Dangi <i>et al.</i> , 2002)
Protector de toxicidad por cadmio	<i>In vivo</i> (rata Wistar albino) (Mallya <i>et al.</i> , 2017)
Protector de toxicidad por arsénico	<i>In vivo</i> (ratón suizo albino) (Sheikh <i>et al.</i> , 2014)

---

**Tabla 3.** (continuación)

---

<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	<b>TIPO DE ESTUDIO</b>
Antiepiléptico	<i>In vivo</i> (ratón suizo albino) (Bakre <i>et al.</i> , 2013)
	<i>In vitro</i> (Sreelatha y Padma, 2009)
Antioxidante y anti-fatiga	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (ratones) (Luqman <i>et al.</i> , 2011) <i>In vivo</i> (rata Wistar albino) (Lamou <i>et al.</i> , 2015)
Propiedad antibacteriana	<i>In vitro</i> (E. coli y Enterobacter aerogene) (Thilza <i>et al.</i> , 2010) <i>In vitro</i> (bacterias gram + y gram -) (Vinoth <i>et al.</i> , 2012; Abdallah, 2015)
Potencial cardioprotector	<i>In vivo</i> (ratas wistar) e <i>in vitro</i> (miocardio) (Panda <i>et al.</i> , 2013)
Anti-inflamatorio	<i>In vivo</i> (ratones Balb/C y ratas Sprague-Dawley) (Sulaiman <i>et al.</i> , 2008) <i>In vivo</i> (rata Wistar) (Omodanisi <i>et al.</i> , 2017)
Anti-aterosclerótica	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i> (conejos) (Chumark <i>et al.</i> , 2008)
Actividad analgésica	<i>In vivo</i> (rata Wistar) (Manaheji <i>et al.</i> , 2011) <i>In vivo</i> (rata Wistar albina) (Bhattacharya <i>et al.</i> , 2014)
Cicatrizante	<i>In vivo</i> (rata Wistar) (Hukkeri <i>et al.</i> , 2006)
Anti-fúngico	<i>In vitro</i> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> ) (Patel <i>et al.</i> , 2014)
Actividad inmunomoduladora	<i>In vivo</i> (rata Wistar y rata albino suizo) (Sudha <i>et al.</i> , 2010)
Protector contra úlceras	<i>In vivo</i> (ratas albinas blancas) (Dahiru <i>et al.</i> , 2006) <i>In vivo</i> (rata albina, cepa Holtzman) (Debnath y Guha, 2007)

---



### **I.3 *Hibiscus sabdariffa* Lam**

#### **I.3.1 Generalidades de la especie**

*H. sabdariffa*, conocida como flor de Jamaica, es originaria de la India y Malasia, en la actualidad es cultivada en las regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes, desde donde se amplió su distribución por todo el mundo como un ingrediente importante. E es de gran aplicación como alimento y en la medicina, debido a las propiedades antioxidantes y minerales que se encuentran en sus cálices. La Jamaica es una planta que puede crecer en suelos muy pobres (Da-Costa *et al.*, 2014).

Es considerada como alimento funcional, el consumo de té como bebida de *H. sabdariffa* L. puede tener algunos efectos positivos en la prevención de enfermedades crónicas; estudios han demostrado efectos positivos en algunos parámetros bioquímicos, como un aumento en la hemoglobina y disminución de los niveles de colesterol total (Tazoho *et al.*, 2016).

#### **I.3.2 Descripción botánica**

La flor de Jamaica (*H. sabdariffa* L.) pertenece a la familia de las malváceas; es conocida como: flor de Jamaica, viña, viñuela (Bobadilla *et al.*, 2016). La descripción taxonómica de la planta se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4. Clasificación taxonómica de la especie *H. sabdariffa***

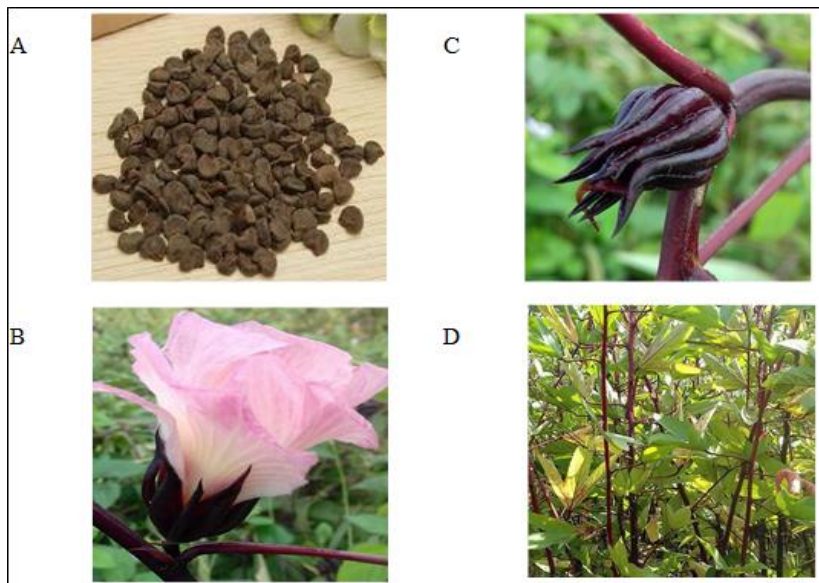
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Superdivision</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheopyta</i>
<b>Subdivision</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Superorden</b>	<i>Rosanae</i>
<b>Orden</b>	<i>Malvales</i>

<b>Familia</b>	<i>Malvacea</i>
<b>Género</b>	<i>Hibiscus</i> L
<b>Especie</b>	<i>Hibiscus sabdariffa</i> Lam

**Fuente:** (ITIS, 2018)

Es un arbusto de base leñosa, crece de 2 a 2,5 metros de alto, se sostiene de una raíz principal penetrante y profunda, el tallo es rojo o verde oscuro, las hojas son alternas de 12,5 cm de largo, las flores son axilares nacidas por separado de color blanco con un centro rojizo en su parte interna, después de un corto tiempo la corola se marchita quedando solo los cálices los cuales se alargan, se forman carnosos de color rojo oscuro y con sabor ácido. Consisten en 5 sépalos grandes con un collar (epicalyx) de 8-12 brácteas delgadas y puntiagudas alrededor de la base, al final del día se agrandan de 3,2 a 5,7 cm de largo y completamente encierran la fruta. El fruto es una cápsula aterciopelada, de 1,25 a 2 cm de largo, cuando es inmaduro es verde, con 5 válvulas las cuales contienen entre 3-4 semillas (ver figura 2). La cápsula se vuelve marrón, se abre cuando madura y se seca, la semilla tiene forma de riñón de color marrón claro, 3 a 5 cm de largo cubierto con pelos diminutos. La planta toma alrededor de 3 a 4 meses para llegar a su etapa de madurez, cuando las flores son cosechadas. Requiere de poco cuidado durante el crecimiento pudiendo tolerar suelos muy pobres (Hidalgo *et al.* 2008; Alarcón *et al.*; 2013; Da-Costa *et al.*, 2014).

**Figura 2. A, semillas; B, cáliz; C, flor; D, hojas de la *H. sabdariffa***



El clima es de gran importancia en el proceso de desarrollo crece en climas tropicales, tolera un clima más cálido y húmedo con temperatura nocturna de 21°C que es la más susceptible, con precipitaciones de 1500-2000 mm al año, desde el nivel del mar hasta cerca de 600 m de latitud (Da-Costa *et al.*, 2014).

### I.3.3 Composición química

Diversas partes de la planta han sido identificadas por su contenido de hierro, proteínas, compuestos fenólicos, fibra, minerales. En los cálices carnosos de la flor de jamaica, encontramos compuestos fenólicos como las antocianinas, vitaminas, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácidos tartáricos, ácido clorogénico, ácido protocatéquico y gálico, entre otros (Ali *et al.*; 2005).

En la tabla 5, se evidencian los principales compuestos biológicamente activos que se han identificado en los cálices de la especie.

**Tabla 5. Composición química identificada en cálices de *H. sabdariffa***

COMPUESTOS QUÍMICOS	REFERENCIAS
<b>Flavonoides</b>	
Hibiscitrin-3-glucósido, 7-glucósido, quercetina, luteolina, hidroxiflavona, sabdaretina, quercetina-3-glucosido, quercetina-3-rutinósido, kaempferol, delphinidina-3-sambubiósido, cianidina-3-sambubiósido, delphinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3,5diglucosido	(Da-Costa <i>et al.</i> , 2014) (Ali <i>et al.</i> , 2005) (Rodríguez <i>et al.</i> , 2009) (Formagio <i>et al.</i> , 2015)
<b>Ácidos fenólicos</b>	
Ácido clorogénico, ácido protocatéquico y gálico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido málico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido fumárico.	(Riaz y Chopra., 2018) (Reyes <i>et al.</i> , 2015)

### I.3.4 Actividad biológica

#### I.3.4.1 Uso tradicional

*H. sabdariffa* es una planta rica en compuestos bioactivos. En sus cálices rojos encontramos una serie de compuestos nutricionales, que son los responsables de la

prevención y tratamiento de ciertas patologías como la, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, hepatoprotectora, antihiperlipidémico, antimicrobiano, anemia, antiinflamatorio y cáncer. La coloración natural rojo intenso de sus cálices son utilizados como colorante en la industria alimenticia y farmacéutica (Jabeur *et al.*, 2017; Riaz y Chopra, 2018).

#### I.3.4.2 Estudios biológicos

Según estudios, clínicos y preclínicos realizados en cálices de jamaica, evidencian que contienen compuestos bioactivos capaces de prevenir y curar diversas enfermedades como lo demuestra la tabla 6.

**Tabla 6. Estudios biológicos realizados con los cálices de *H. sabdariffa***

EFECTO TERAPÉUTICO	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIAS
Antimicrobiano Anti-fúngico antiparasitario	<i>In vitro</i>	(Ali <i>et al.</i> , 2005)
Diurético	In vivo ( rata Wistar)	(Márquez <i>et al.</i> , 2007)
Adenocarcinoma de mama humano	<i>In vitro</i> ( animal)	(Khaghani <i>et al.</i> , 2011)
Hipertensión	<i>In vivo</i> (humano)	(McKay <i>et al.</i> , 2010) (Seck <i>et al.</i> , 2017)
Anemia	<i>In vivo</i> ( humano)	(Tazoho <i>et al.</i> , 2016)
Antimicrobiano	<i>In vitro</i>	(Jabeur <i>et al.</i> , 2017)

**Tabla 6. (continuación)**

EFFECTO TERAPÉUTICO	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIAS
Antihiperlipidémico	<i>In vitro</i>	
Antihipertensivo	<i>In vivo</i> (ratón)	
Antianémico	<i>In vivo</i> (humano)	
Antimicrobiano	<i>In vivo</i> (rata Wistar)	
Antiinflamatorio	<i>In vitro</i> Cepas <i>C. albicans</i>	(Riaz y Chopra, 2018)
Diurético	<i>In vivo</i> (ratas diabéticas)	
Anticancerígeno	<i>In vivo</i> (ratas)	
	<i>In vivo</i> (ratas F344)	

### I.3.5 Infusiones

Una infusión es una bebida en la cual se pueden extraer los compuestos hidrosolubles de las diversas partes de las plantas (raíces, cortezas, tallos, hojas, flores y frutos) utilizando agua caliente a la temperatura de ebullición. Las infusiones pueden ser empleadas no sólo como bebida de consumo ocasional, sino buscando un beneficio para la salud humana, como por ejemplo actividad antioxidante, desintoxicantes, analgésica, diuréticas, etc.

Muñoz *et al.*, (2012), compararon el contenido fenólico y la actividad antioxidante de infusiones herbales comerciales, demostrando su valor nutricional. El estudio sugirió la inclusión de dichas preparaciones en la dieta, aludiendo sus efectos medicinales y preventivos de posibles patologías.

Las hojas de moringa ricas en compuestos fenólicos y con actividad antioxidante, se utilizan como infusiones, a las que se les ha demostrado su actividad biológica como antiinflamatoria e hipoglucemiante (Coz-Bolaños *et al.*, 2018).

Los cálices de *H. sabdariffa* rojo intenso, con aroma y sabor ácido utilizados en infusiones como bebidas calientes tipo té, contiene propiedades antioxidantes, además, se ha demostrado su actividad como antihipertensivo. Se realizó el estudio clínico, donde se evidenció que en pacientes con hipertensión disminuye la presión arterial y un efecto hipocolesterolémico, según (McKay *et al.*, 2010).

Otro estudio clínico señaló que el consumo del té de jamaica por dos semanas demuestra efectos positivos en algunos parámetros bioquímicos, como aumento en la hemoglobina, y disminución del colesterol total (Tazoho *et al.*, 2016).

En el ensayo *in vivo* realizado en ratas que consumieron el té de jamaica durante 15 días, se evidenció un efecto diurético, podría usarse para el tratamiento de enfermedades como la hiperuricemia (Riaz y Chopra, 2018).

### I.3.6 Requisitos de hierbas aromáticas

Según los requisitos establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana para hierbas aromáticas o té de hierbas, estos deben cumplir con las siguientes especificaciones que se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Requisitos establecidos en la Norma INEN 2392:2013**

Físicos-químicos		Microbiológicos		Contaminantes	
Humedad	12%	Enterobacteriaceae	Máx. $1 \times 10^3$ ufc/g	Arsénico (As)	1,0 mg/kg
		Escherichia coli	Máx. $1 \times 10^4$ ufc/g		
		Clostridium	Ausencia ufc/g		
Cenizas insolubles en HCl al 10%	2% m/m	Salmonella	Ausencia en 1g	Plomo (Pb)	0,5 mg/kg
		Shigella	Ausencia en 1g		
		Mohos y levaduras	Máx. $1 \times 10^4$ upc/g		

Las especies vegetales deben ser procesadas bajo las condiciones establecidas en el Código de la Salud y sus Reglamentos, para reducir la contaminación. Estas pueden expendirse ya sea entera o molida, sola o mezclada, con frutas, miel o azúcar sin exceder el 20% en estos últimos aditivos. La adición de saborizantes naturales y artificiales deben ser los permitidos en la norma INEN 2074. En las hierbas aromáticas para infusiones no se permite colorantes.

Para el envasado, la bolsita filtrante tiene que ser resistente e inactiva al producto destinado, sin alterar sus características y cumplir con los requerimientos establecidos por la legislación nacional, FDA, Codex Alimentarius, entre otros organismos afines. El material de embalaje debe mantener las características del producto durante su almacenamiento, transporte y expendio.

En cuanto al rotulado debe cumplir con los requisitos que establece el código de la salud, en la ley orgánica de protección al consumidor, en este se debe incluir de manera obligatoria la indicación de modo de preparación del producto, el peso declarado debe ser el contenido neto de los envases, no se debe incluir leyendas de efectos ni indicaciones terapéuticas o descripción de características que no puedan ser comprobados en el producto (INEN, 2007).

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **II.1 Material vegetal**

**Moringa.-** La cosecha de las hojas se realizó en la unidad académica de Ciencias Agropecuarias (UACA) de la Universidad Técnica de Machala. Se hicieron dos cosechas en la fechas comprendidas entre el 4 y 10 de mayo (15 meses de crecimiento), la hora de recolección fue de 07:30 hasta las 09:00 am.

**Flor de Jamaica.-** Se cosechó las flores en la UACA, haciéndose 5 colectas seguidas desde el 17 de abril hasta el 2 de mayo del 2018, las horas de recolección fueron entre las 08:00 y las 10:30 am.

#### **II.2 Tratamiento poscosecha**

##### **II.2.1 Lavado, desinfección y secado**

Las hojas de moringa fueron lavadas y desinfectadas con agua potable y cloro (15 mL de hipoclorito de sodio en 20 L de agua) durante 2 minutos, procurando que no se desprendieran de los raquis. Se realizó un primer secado durante 3 días a temperatura ambiente en secadores artificiales, ubicando las ramas en pequeños ramilletes. Luego se desprendieron las hojas de los raquis manualmente, eliminando las que estuvieran amarillentas o dañadas. Posteriormente, se colocaron en bandejas de acero inoxidable y se llevaron a una estufa (MEMMERT UF 55, Alemania) a una temperatura de  $40 \pm 2$  °C con circulación de aire (100 %) y trampilla abierta (100%) durante 20 h.

El lavado y desinfección de los cálices de Jamaica tuvo un procedimiento similar al de las hojas de moringa. La droga vegetal, luego de lavada, se la dejó escurrir por unos minutos y a continuación se procedió a quitar la semilla. Por último se realizó el secado en una estufa (MEMMERT UF 55, Alemania) a una temperatura de  $45 \pm 2$  °C y bajo las mismas condiciones de circulación de aire.

Ambas drogas secas se embalaron enteras en fundas de nylon herméticas, y se almacenaron en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente.



## II.2.2 Molienda

La molienda de la droga cruda se realizó en un molino artesanal (MAGRICO, Ecuador), utilizando una criba de 1 mm de grosor. La molienda se realizó previo al momento en que se iniciaron los análisis correspondientes. El polvo se almacenó en fundas herméticas, en condiciones similares a las antes descritas para la droga cruda entera.

## II.3 Análisis físico-químicos a las drogas vegetales crudas

### II.3.1 Determinación de la humedad residual

Se trabajó en una balanza (Ohaus, modelo MB90, USA) con una fuente de calentamiento halógeno. Se pesaron aproximadamente 2 g de droga vegetal seca en el equipo y de manera automática se procede a la determinación, hasta alcanzar masa constante a una temperatura de 105 °C. El equipo trabajó en el modo de apagado automático, (donde se finaliza el proceso cuando la pérdida de masa sea de menos de 1 mg durante 60 segundos). Se realizaron tres réplicas, reportándose la media y la desviación estándar.

### II.3.2 Determinación de cenizas totales

Para la determinación de cenizas totales se taró los crisoles de porcelana, se pesó 2 g de la muestra por triplicado, con una variación permisible de 0.5 g, se llevó al horno mufla a temperatura de 700 a 750 °C durante 2 horas, se dejó enfriar los crisoles en una desecadora y posteriormente se pesó, repitiendo el proceso hasta que las dos pesadas subsiguientes no difieran en más de 0.5 mg por gramos (masa constante). Se determinó con los cálculos el valor obtenido con la siguiente fórmula, reportándose el valor promedio correspondiente a las tres réplicas.

$$C_T = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

$C_T$ = porcentaje de ceniza totales en base hidratada

$M_2$ = Masa del crisol con las cenizas (g)

$M_1$ = Masa del crisol con la porción del ensayo (g)

$M$ = Masa del crisol vacío (g)

100= Factor matemático

### **II.3.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

A las cenizas totales que se obtuvo anteriormente, se le añadió de 2 a 3 mL de HCl al 10%. Se tapó el crisol con vidrio de reloj y se sometió a calentamiento sobre baño maría durante 10 min, luego se lavó el vidrio de reloj con 5 mL de agua destilada caliente, uniéndose al contenido del crisol. La solución se filtró a través de papel filtro y se lavó repetidas veces hasta que el filtrado no muestre presencia de cloruros, para esto se le añadió 1 o 2 gotas de AgNO<sub>3</sub> (0,1 mol/L). Se transfirió el papel filtro con el residuo al crisol inicial y se incineró en un horno mufla (MAGRICO, Ecuador) a una temperatura de 700 a 750 °C durante 2 horas. Posteriormente, se colocó en una desecadora y se esperó a que alcanzara la temperatura ambiente para luego pesar. Se repitió el procedimiento hasta obtener peso constante. Se realizó el cálculo a través de la siguiente fórmula, reportándose el valor promedio correspondiente a tres réplicas.

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

B = porcentaje de cenizas insolubles en HCl en base hidratada.

M = masa del crisol vacío.

M<sub>1</sub> = masa de crisol con la porción de ensayos (g).

M<sub>2</sub> = masa de crisol con la ceniza (g).

100 = factor matemático.

### **II.3.4 Determinación de proteína**

#### **II.3.4.1 Método de Bradford**

La determinación de proteínas por este método consiste en la cuantificación de la unión del colorante azul de coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de suero Bovino, BSA) (Bradford, 1976).

### **Preparación de la muestra**

Para la preparación de la muestra se pesaron 2 g de droga seca y se realizó la extracción con 50 mL de agua destilada en un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific) por 30 minutos, luego se filtró con papel de filtración rápida.

Para elaborar la curva de calibración se partió de un estándar de albúmina de suero bovino (Bradford Reagent (BSA) marca SIGMA 0,5 mg/mL). En tubos de ensayos de 10 mL, se colocaron 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µL, respectivamente, del patrón BSA, luego se añadió a cada tubo agua destilada hasta completar 200 µL, para el blanco se colocaron 200 µL de agua destilada y para la muestra se tomaron 50 µL de extracto recién preparado. Seguidamente, se añadieron 2 mL del reactivo Bradford (Sigma Aldrich), se agitó con ayuda de un vortex (Fisher Scientific) y luego de 2 minutos se realizó la lectura en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a 590 nm, utilizando microceldas de 2 mL. Las diluciones y las muestras se analizaron por triplicado.

Con la curva de calibración obtenida a partir del estándar de proteína, se realizó el análisis de regresión lineal, obteniendo la siguiente ecuación:  $\text{absorbancia} = 0,00901172 + 0,0282687 * \text{concentración}$ . El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,99424.

### **II.3.5 Determinación de minerales**

Se realizó en el laboratorio NEMALAB S.A donde utilizaron el método de digestión húmeda para determinar los porcentajes de minerales presentes en las hojas de *M. oleifera* Lam e *H. sabdariffa* Lam.

### **II.3.6 Determinación de arsénico (As) y plomo (Pb)**

Servicio solicitado al laboratorio AVVE, siguiendo la metodología MMQ-AAS-04 para determinar As, mientras para el Pb la metodología MMQ-AAS-28; tomando como referencia la Norma NTE INEN 2392:2017 – 04 Segunda Revisión para hierbas aromáticas.

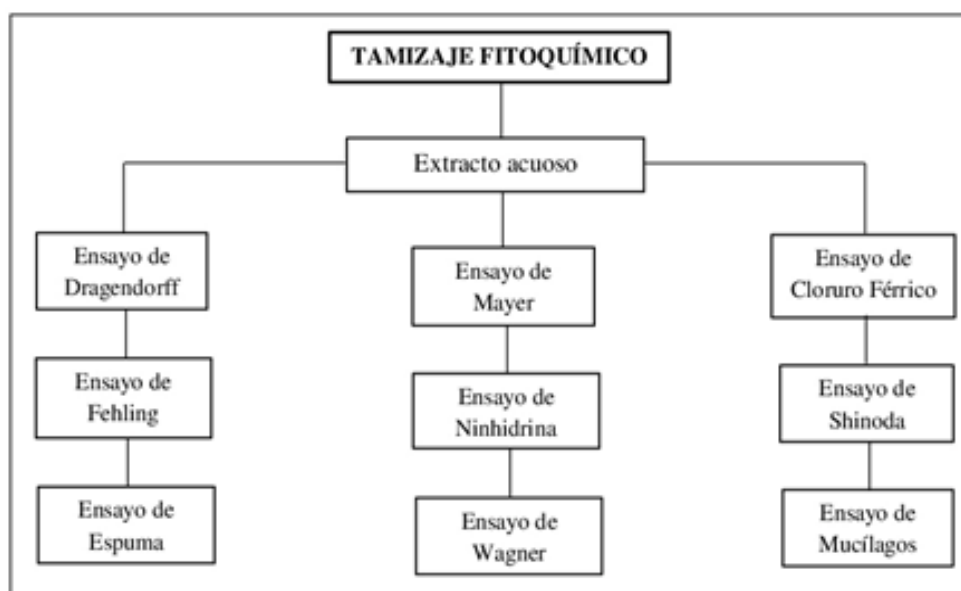
### **II.3.7 Control microbiológico**

El control microbiológico se realizó según las normas de la FDA-BAM: *Norma Food, drugs and cosmetics- Bacteriological analytical manual*, determinando la presencia de gérmenes aerobios totales, mohos y levaduras, coliformes totales y enterobacterias.

## II.4 Tamizaje fitoquímico

El extracto que fue sometido al estudio cualitativo preliminar se elaboró mediante maceración ultrasónica. Se pesaron 15 g de droga cruda, se adicionaron 150 ml de agua destilada y se sonicó durante 30 minutos en el baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific). Luego se filtró para separar el líquido del residuo o marco. Se tomaron las correspondientes alícuotas del extracto y se colocaron en cada uno de los tubos de ensayo, según lo descrito por Miranda y Cuellar, 2000. En la figura 1. se muestran los ensayos realizados.

**Figura 3. Ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico**



## II.5 Cromatografía en capa delgada

Se emplearon placas de Sílica gel GF<sub>254</sub> (0,20 mm; Macherey-Nagel) sobre soporte de vidrio para los análisis cualitativos.

Se utilizó una cámara de vidrio y se trabajó dentro de una campana extractora de vapores a una temperatura ambiente 21 – 24 °C.

Se realizó una aplicación por punteo con el uso de microcapilares y se desarrolló una corrida ascendente utilizando como fase móvil la mezcla butanol:ácido acético:agua (65:25:10), la que fue preparada a través de un simple proceso de mezclado. La aplicación se realizó a 1 cm del borde inferior y la corrida fue, aproximadamente, de 7 cm. La distancia entre cada punteo fue de 1 cm.

Después de la corrida el secado de la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana.

Se realizaron dos tipos de revelado, físico y mixto. El revelado físico se realizó a través de la luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254 nm y 365 nm.

Para el revelado mixto se utilizaron los siguientes reactivos cromogénicos

- Solución de  $\text{FeCl}_3$  al 5 % en solución salina.
- Ácido sulfúrico al 50% en metanol y calor hasta aparición de color.
- Ácido sulfúrico al 50% en metanol y calor hasta aparición de color, posteriormente, vainillina al 1 % en metanol y calor hasta cambio de color.
- Ninhidrina al 0,2% en acetona con unas gotas de ácido acético glacial y calor (100 °C por 5-10 min.).

## **II.6 Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron, aproximadamente, 1 g de droga cruda de moringa y 0,6 g de los cálices de Jamaica, se trasvasaron de manera independiente a un erlenmeyer de 100 mL, y se agregaron 50 mL de agua destilada, sometién dose a sonicación durante 30 minutos en un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific), posteriormente, se filtró.

**Ensayo:** para la determinación de polifenoles en los extractos de moringa y Jamaica por el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), se siguió la metodología descrita por Singleton *et al*, 1999, con algunas modificaciones. Se colocaron 0,05 mL de muestra o patrón (ácido gálico) y en el caso del blanco, agua destilada, en tubos de ensayo de, aproximadamente, 10 ml de capacidad. Se le adicionaron 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (10% diluido en agua destilada) y 450  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se agitó en un vortex (Thermo Scientific, USA) y se esperó 5 minutos. Se adicionaron 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7,5%, se agitó otra vez y se dejó en reposo por 2 h. Se realizó la lectura a 765 nm en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA), empleando microceldas de 2 mL.

Se realizó la cuantificación mediante una curva de calibración con ácido gálico (Sigma Aldrich) en concentraciones 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 mg/mL. Cada una de las diluciones y las muestras se analizaron por triplicado.

La determinación de fenoles totales de los extractos acuosos de *M. oleífera* y *H. sabdariffa*, fue calculada a partir de la curva de calibración obtenida para ácido gálico, se hizo un análisis de regresión lineal dando como resultado la siguiente ecuación:  $\text{absorbancia} = 0,0116667 + 1,12071 * \text{concentración}$ , con un coeficiente de correlación de 0,99933.

## **II.7 Elaboración del extracto acuoso seco**

Se pesaron 20 g de droga cruda de ambas muestras, se le añadió 50 mL de agua destilada y se dejó reposar por unos minutos para su humectación, luego fueron agregados 100 mL más de agua destilada y se sometieron a sonicación en un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific) durante 30 minutos. Se filtró el extracto y se agregaron otros 100 mL al residuo de la droga vegetal, se sónico nuevamente durante 30 minutos y se filtró.

El extracto obtenido se trasvasó a un balón de 500 mL y se llevó a un rotoevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001 efficient) acoplado a un criostato (LAUDA/ALPHA RA-8) y a una bomba de vacío (VACUUBRAND PC 600, Alemania), hasta sequedad total. Finalmente, se pesó el balón con el extracto seco y se realizaron los cálculos respectivos para obtener el porcentaje de rendimiento.

## **II.8 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

### **II.8.1 Análisis cualitativo mediante CCD**

La determinación cualitativa se realizó bajo las mismas condiciones cromatográficas antes descritas para el estudios químico cualitativos por CCD (epígrafe II.5).

En esta ocasión el revelado se realizó con una solución etanólica al 0,2 % de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

### **II.8.2 Análisis cuantitativo por espectrofotometría**

**Preparación de la muestra:** Se pesó 0,01 g de extracto seco y se trasvasó con agua destilada a un balón volumétrico de 10 mL, se sonicó en un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific) y luego de solubilizarse totalmente, se enrazó.

**Ensayo:** El análisis se realizó por el método del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) descrito por (Barrón-Yáñez *et al*, 2011). La capacidad antioxidante de la

muestra se midió a 516 nm por el cambio de coloración gradual del DPPH (púrpura) a DPPH-reducido (amarillo) en un espectrofotómetro. Se preparó una disolución metanólica de DPPH a una concentración 0,1 mM, la que se puso a reaccionar con diferentes concentraciones de los extractos acuosos de las hojas de *M. oleifera* e *H. sabdariffa*. Se partió, en cada caso, de una solución madre de concentración 1 mg/mL, a partir de las cuales se obtuvieron diluciones acuosas de concentración 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4.

A cada dilución por separado (0,5 mL) se le adicionó 1,5 mL de la disolución de DPPH (0,1 mM). Las mezclas se dejaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 min para, posteriormente, medir su absorbancia a 516 nm en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA), empleando microceldas de 2 mL (Barro-Yanez & *et al.*, 2011).

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ DPPH} = (\text{A}_{\text{blanco}} - \text{A}_{\text{muestra}}) \times 100 / \text{A}_{\text{blanco}}$$

Dónde: **A<sub>blanco</sub>**: Absorbancia del DPPH (0,1 mM); **A<sub>muestra</sub>**: Absorbancia de la muestra luego de reaccionar con la solución de DPPH por 30 min.

La actividad antioxidante de cada muestra se determinó a través de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>), que es la concentración requerida por la muestra para disminuir la absorbancia del DPPH al 50%. Para esta determinación se graficó por ciento de inhibición versus concentración, y la CI<sub>50</sub> se calculó mediante la regresión lineal. La curva de calibración obtenida para la cuantificación mostró un coeficiente de correlación de 0,9773 para la moringa y de 0,9721 para la Jamaica.

### **II.8.3 Determinación de la cinética de reacción con el DPPH**

Para la determinación de la cinética se elaboró una curva de calibración con DPPH partiendo de una concentración de 0,1 mM. De esta solución madre se prepararon diluciones metanólicas de concentraciones: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 y 0,08 mM, las cuales, incluyendo a la disolución madre (0,1 mM), les fue medida su absorbancia en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a 516 nm, empleando microceldas de 2 mL. Las lecturas se realizaron por triplicado, utilizando como blanco metanol.

El análisis de regresión lineal de la curva de calibración para la determinación del DPPH remanente dio como resultado la siguiente ecuación:  $\text{absorbancia} = -0,01939 + 11,4344 \cdot \text{Concentración}$ , con un coeficiente de correlación de 0,99913.

Para evaluar la cinética de ambos extractos se siguió el método propuesto por Barron-Yáñez *et al.*, (2011) con algunas modificaciones. De cada muestra se prepararon diluciones acuosas de concentraciones: 1; 1,5 y 2 mg/mL; se tomaron 0,05 mL de cada una y se pusieron a reaccionar con 1,9 mL de DPPH (0,1 mM). Adicionalmente, se preparó la disolución del estándar quercetina (Sigma Aldrich) en una concentración de 0,08 mg/mL. A continuación, se midieron las absorbancias de cada muestra con intervalos de 60 segundos, desde tiempo cero ( $\text{DPPH}_{t=0}$ ) hasta concluir 30 minutos ( $\text{DPPH}_{\text{rem}}$ ), en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a 516 nm, usando microceldas de 2 mL.

Las absorbancias obtenidas permitieron calcular el DPPH remanente ( $\text{DPPH}_{\text{rem}}$ ) en el medio de reacción, con ayuda de la curva de calibración antes elaborada. Cada lectura se hizo por triplicado y como blanco se usó metanol. La concentración de  $\text{DPPH}_{\text{rem}}$  a los diferentes tiempos se calculó a través de la ecuación:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{rem}} = 100 \cdot \text{DPPH}_{\text{rem}} / \text{DPPH}_{t=0}$$

## **II.9 Estudio químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) de los extractos acuosos de *M. oleifera* e *H. sabdariffa***

Para el análisis se empleó un sistema UHPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000), compuesto por una bomba cuaternaria DIONEX UltiMate 3000 RS, un automuestreador DIONEX UltiMate 3000 RS, un compartimento de columna DIONEX UltiMate 3000 RS, un sistema DAD (Detectores de diodos) DIONEX UltiMate 3000 RS, acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific LTQ XL. Se utilizó un software computarizado “Thermo Xcalibur” para la elaboración del método y observación de los respectivos cromatogramas.

Los análisis se realizaron utilizando una columna Accucore RP-MS C18 de fase reversa de proporciones (100 x 2,1 mm; tp de 2,6  $\mu\text{m}$ ), utilizando como base patrón de quercetina para el acondicionamiento adecuado del sistema. Se estableció para la columna un flujo de 0,400 mL/min, temperatura de 35 °C y rangos de presión de 50 -5000 psi; además de un



volumen de inyección de la muestra de 2  $\mu$ L. La fase móvil utilizada se constituyó de acetonitrilo (B) y agua ácida (D) (ácido fórmico al 0,1% en Agua) aplicando el método de elución en gradiente que partió con 20% (B) y 98% (D). Las condiciones utilizadas en el espectrómetro de masa fueron: voltaje de Spray: 5,00 kV, voltaje capilar: -50,00 V, temperatura del capilar: 225,00 °C. El flujo empleado en el proceso de atomización estuvo conformado por un gas principal: 34; gas auxiliar: 5 y un gas de barrido: 3 Unidades arbitrarias.

Se analizaron las fracciones de la muestra en modo negativo, mediante modo Full Scan en rangos entre 100-1000 DA, modo dependiente MS/MS y finalmente se aplicó el modo SIM para escaneo de iones específicos de las fracciones de la muestra en estudio.

Para la preparación de las muestras se pesaron alrededor de 3 mg en una balanza analítica, las cuales fueron diluidas en 1 mL de metanol para CLAR en viales pequeños de plástico. Posteriormente, se realizó el filtrado de estas diluciones con filtros de 2  $\mu$ m de diámetro y se trasvasó en viales pequeños de vidrio, los cuales fueron colocados en el equipo de CLAR.

## II.10 Diseño de la formulación

La formulación se determinó a través de un diseño experimental completamente al azar, considerando como variables independientes el porcentaje de inclusión en la fórmula tanto de *M. oleifera* como de *H. sabdariffa*, tal como puede observarse en la tabla 8. Como variable independiente se utilizó la respuesta sensorial de un panel de 46 jueces consumidores, aplicando una prueba afectiva de ordenamiento (anexo 2).

**Tabla 8. Diseño experimental completamente al azar**

<b>Variantes</b>	<b><i>M. oleifera</i> (%)</b>	<b><i>H. sabdariffa</i> (%)</b>
240	80	20
140	70	30
310	50	50

El procesamiento estadístico de los datos para la selección de la mejor formulación se hizo con el paquete estadístico *Statgraphics Centurion XVII*, en el que se aplicó un análisis de varianza y una prueba de rangos múltiples.

La formulación de mayor aceptación fue envasada en bolsas de papel filtro sellable, en una envasadora automática para bolsas de té sin sobre, marca ECUAPACK, modelo DXDC-125. La máquina realiza todo el proceso automático de: dosificación (volumétrica), formado de bolsita, enhebrado del cordón, sellado de 3 lados y cortado.

## **II.11 Control de calidad de la infusión**

### **II.11.1 Determinación del peso promedio**

Se realizó en balanza analítica de la firma (Rice Lake TA Series), con una sensibilidad de 0,0001 g, posteriormente se calculó el promedio para 20 fundas.

Se tomó el contenido de un sobre y se agregó en un vaso de precipitación con 200 mL de agua a punto de ebullición (100 °C), se dejó reposar durante 10 minutos. La infusión obtenida fue evaluada por diferentes pruebas que se describen a continuación.

### **II.11.2 Determinación de grados Brix, índice de refracción, fructosa, glucosa y azúcar invertida**

Se realizó en un refractómetro (ANTON PAAR), se colocó una gota de muestra en la cámara de lectura del equipo, la determinación se realizó por triplicado.

### **II.11.3 Determinación de pH**

Se realizó el análisis por triplicado en un pH-metro digital (Fisher Scientific accuMET AE150).

### **II.11.4 Determinación de la densidad relativa**

Se pesó el picnómetro vacío y seco en una balanza (Rice Lake TA series), se llenó el picnómetro con la muestra y se mantuvo a temperatura de 25 °C ( $\pm 1$  °C) mediante 15 minutos, se quitó el exceso con papel de filtro y se secó el picnómetro por fuera. Se pesó el picnómetro con la muestra cuidadosamente y se repitió el procedimiento con agua destilada. La determinación se realizó por triplicado.

El resultado se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Dónde:

$D_{25}$ = densidad relativa a 25 °C

M= peso del picnómetro vacío (g)

$M_1$ = peso del picnómetro con la muestra (g)

$M_2$ = peso del picnómetro con agua destilada (g)

#### **II.11.5 Determinación de fenoles por Folin-Ciocalteu**

Se preparó la muestra, realizando una infusión con una bolsita de té (1,5183 g) en 200 mL de agua caliente y se realizó el mismo procedimiento descrito en el epígrafe II.6.

#### **II.11.6 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

Se realizó con la infusión del té, siguiendo el procedimiento ya descrito en el epígrafe II.8.2.

#### **II.12 Análisis Estadístico**

El análisis de la media y desviación estándar se realizó mediante Excel 2013. El procesamiento estadístico de los datos del análisis de regresión lineal se hizo con el paquete estadístico *Statgraphics Plus* versión 5.0.

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **III.1 Análisis físico-químico a las drogas vegetales crudas**

Las drogas vegetales *M. oleifera* e *H. sabdariffa* fueron recolectadas en los terrenos de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias (UACA). El estudio se inició con el proceso de selección que consistió en eliminar las hojas amarillentas o dañadas por insectos. Una vez recolectadas las muestras, se procedió a su tratamiento (lavado y desinfección) para eliminar materias extrañas como polvo, tierra, insectos; de esta manera se puede evitar el deterioro y pérdida innecesaria de los metabolitos bioactivos de la droga vegetal.

El secado de las hojas de *M. oleifera* se realizó primero a la sombra y a temperatura ambiente durante 3 días, luego en la estufa por 20 horas. De esta manera se logró, primero, escurrir el exceso de agua producto del lavado y, finalmente, eliminar el exceso de humedad en la droga cruda. Con este procedimiento se busca la conservación de la composición química y de las características organolépticas de la materia prima vegetal, como el color verde.

Los cálices de jamaica se colocaron en una superficie, debidamente desinfectada, durante algunos minutos para lograr la eliminación del exceso de agua, posteriormente se llevaron a la estufa. Esta droga presenta un mayor contenido de agua en sus tejidos, por lo que se precisa someterla rápidamente al secado, evitándose procesos de hidrólisis o degradación enzimática. En ambos casos al efectuar el secado en una estufa con recirculación de aire forzado, favoreció la velocidad en el proceso de deshidratación, lo cual contribuye a la preservación de las características físico-químicas de la droga cruda. Una vez seca se molió la droga vegetal y se almacenó en fundas de nylon herméticas en un lugar fresco y seco, para una mejor conservación.

Luego de todo este proceso realizado para la preservación de los metabolitos bioactivos, se procedió a evaluar la calidad de las drogas crudas. Los resultados del análisis farmacognóstico se pueden observar en la tabla 9.

**Tabla 9. Análisis farmacognóstico de las drogas crudas de hojas de *M. oleifera* y cálices de *H. sabdariffa*.**

Parámetros (%)	<i>M. oleifera</i> media / DS	<i>H. sabdariffa</i> media / DS
<b>Humedad residual</b>	5,11/0,45	6,92/0,50
<b>Cenizas totales</b>	9,46/0,03	4,92/0,01
<b>Cenizas insolubles en HCL al 10%</b>	3,39/0,09	1,12/0,07
<b>Determinación de proteína (mg/100 g de droga seca)</b>	27,67/0,27	nd

**nd: No determinado**

El exceso de humedad en la materia prima vegetal podría causar deterioro de la muestra por la acción de microorganismos (bacterias y hongos), además de la hidrólisis de sus compuestos (Enríquez *et al.*, 2008). El contenido de humedad residual de las hojas de moringa y cálices de jamaica (tabla 9) fue inferior en ambos casos, a lo referido por la norma NTE INEN 2392:2013 para hierbas aromáticas, la que establece que no debe sobrepasar del 12%. La cuantificación de cenizas totales ayuda a determinar la pureza de la droga vegetal, ya que demuestra los residuos inorgánicos que posee la planta después de incineración a 700 °C. Una alta concentración de estos residuos puede indicar la presencia de materia inorgánica que pudo ser fácilmente absorbida por la planta, desde el suelo. Guaycha *et al.*, (2017) refieren valores de cenizas totales de 9,79% en hojas de *M. oleifera*, valor cercano al que se muestra en la tabla 9. En la *H. sabdariffa* el valor obtenido es menor a la reportado por Abou-Arab *et al.*, (2011), con 11,24%.

En cuanto a las cenizas insolubles en ácido clorhídrico los valores que se obtuvieron fueron inferiores al 2% establecido en la norma, lo que indica que hay baja concentración de residuos de arena o tierra silícea.

El contenido proteico es uno de los aspectos que le da mayor aceptación y popularidad al consumo de las hojas de moringa, como fuente de nutrientes. En el presente estudio el valor obtenido para dicha droga cruda fue de 27,67 mg por cada 100 g. En el caso de la Jamaica, el ensayo fue realizado pero los valores resultaron prácticamente nulos, según la técnica desarrollada.

Generalmente, los datos de proteínas que se refieren en la literatura, corresponden al 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 también proviene de componentes no proteicos.

En un estudio, Tesfay *et al.* (2011) determinaron proteínas totales en hojas de *Moringa oleífera* cultivadas en semilleros mediante el método de Bradford, obteniendo un valor de 76,1 mg/g, lo que resulta bastante elevado. Sin embargo,

Okiki *et al.*, (2015) determinaron proteínas totales mediante el método de Kjeldahl, obteniendo un resultado de 28,0 % en hojas de *M. oleífera*.

Según Moyo *et al.*, (2011), la *M. oleífera* posee todos los aminoácidos esenciales: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina y cisteína, treonina, fenilalanina y tirosina, valina, triptófano, y los no esenciales como la serina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, alanina, prolina. La falta de alguno de los aminoácidos esenciales dificulta la síntesis de la proteína en la que se requiere dicho aminoácido, lo que puede causar algún tipo de desnutrición. Las proteínas cumplen muchas funciones, son parte de la estructura básica de los tejidos (reparan y mantienen los tejidos corporales en todo el proceso de crecimiento y desarrollo), realizan funciones metabólicas ya que actúan como hormonas, enzimas o anticuerpos, eliminan sustancias tóxicas, transportan oxígeno y grasas en la sangre, entre otras funciones (González *et al.*, 2007).

### III.1.1 Determinación de minerales

La cuantificación de minerales (macro y micronutrientes) para ambas especies se aprecia en la tabla 10.

**Tabla 10. Minerales presentes en hojas de *M. oleífera* y cálices de *H. sabdariffa***

MUESTRA	%					ppm (mg/Kg)					
	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	Na	B
<i>M. oleífera</i>	3,82	0,45	2,58	2,43	0,26	18,6	12,2	114,9	39,4	92,1	-
<i>H. sabdariffa</i>	0,86	0,28	1,97	1,37	0,21	27,5	7,4	54,8	20,4	58,4	3,0

Como se puede apreciar la especie *H. sabdariffa*, muestra valores inferiores de macro y micronutrientes, al compararse con la moringa; a excepción del micronutriente Zn. Estos resultados guardan relación con lo obtenido para cenizas totales, siendo estas superiores para la moringa.

Realizando una comparación de los resultados obtenidos para las hojas de moringa con los referidos por Bastidas y Sojos, 2017 y Howard *et al.*, 2017, cosechadas en la UACA y en Arenillas, respectivamente, se pueden apreciar algunas diferencias (tabla 11).

**Tabla 11. Minerales presentes en hojas de *M. oleifera* referidos por otros autores**

Minerales	% Materia seca					p.p.m (mg /kg)				
	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	Na
<i>M. oleifera</i> (Bastidas y Sojos, 2017)	3,20	0,33	2,67	0,92	0,23	18,60	9,10	78,50	49,00	26,10
<i>M. oleifera</i> (Howard e Illescas, 2017)	4,28	0,40	1,94	0,91	0,22	18,50	9,50	75,30	3,80	27,80

Relacionando las dos especies de moringas cosechadas en la plantación que se ubica en la UACA, se observa una apreciable diferencia en los valores de Ca, Cu, Fe y Na, siendo superiores en la droga actual.

Moyo *et al.*, (2011) refieren valores en hojas de *M. oleifera* de 3,65 % para el Ca y para el Na, Cu y Fe, cantidades de 1,64, 8,25 y 490 mg/kg, respectivamente. Nweze y Nwafor (2014) reportaron niveles de 2,09%, 10 mg/kg y 30 mg/kg, para Ca, Cu y Fe, respectivamente.

El consumo de Ca es de gran importancia pues es un mineral indispensable para el crecimiento y mantenimiento de huesos y dientes sanos. El 99% de calcio se almacena en el tejido óseo como hidroxapatita cálcica y el 1% en forma libre o unida a la albúmina, la que participa en la señalización celular, secreción glandular, coagulación sanguínea, etc. (Ferré, 2015).

El mineral de mayor cantidad en el estudio resultó ser el Fe. Este elemento participa como cofactor en muchos procesos biológicos que son indispensables para la vida, algunos de ellos, el transporte de oxígeno, metabolismo de neurotransmisores, fosforilación oxidativa, síntesis de ADN, etc. (Olivares y Walter, 2003). Este micronutriente está presente en el organismo dividido en dos categorías: funcional, donde la mayor parte se encuentra en hemáties circulantes, en forma de hemoglobina y en menor porcentaje en las enzimas y mioglobinas; y de almacenamiento, en este caso está en forma de ferritina y hemosiderina (Cardero *et al.*, 2009).

La deficiencia de hierro es la alteración más común a nivel mundial, especialmente en países subdesarrollados, siendo más susceptibles niños menores de 5 años y mujeres embarazadas o en lactancia (Chúa, 2014). El hierro se presenta como Fe hemo, que provienen del consumo de proteína animal (carne de res, aves, pescados), su absorción es muy alta (15 – 35%) y Fe no hemo, que se obtiene de cereales, frutos, legumbres y vegetales, su absorción es menor (2 – 20%) pero su contribución a la nutrición es mucho mayor que el Fe hemo. La deficiencia de hierro puede causar anemia y afectación del neurodesarrollo (Forrellat, 2016). La anemia desencadena otros problemas, tales como, inmunidad celular, insensibilidad ante la capacidad bactericida de los neutrófilos e incapacidad de realizar esfuerzo físico (cansancio extremo). Además, esta enfermedad puede producir mayor susceptibilidad a infecciones (en especial del tracto respiratorio), fallo de la movilización de la vitamina A hepática, problemas en el crecimiento, alteraciones en el desarrollo motor y mental, poca transferencia de Fe al feto, riesgo de partos prematuros, entre otros (Otegui, 2010).

Estudios de la composición inorgánica también se han reportado para la especie *H. sabdariffa* (tabla 12).

**Tabla 12. Minerales analizados en la *H. sabdariffa* según las literaturas reportadas**

<b>Minerales</b>	<b>(Tazoho <i>et al.</i>, 2016)</b>	<b>(Nnam y Onyeke, 2003)</b>
<b>P</b>	0,04	0,022
<b>K</b>	0,05	ND
<b>Ca</b>	0,74	0,003



**Tabla 12.** (continuación)

<b>Minerales</b>	<b>(Tazoho <i>et al.</i>, 2016)</b>	<b>(Nnam y Onyeke, 2003)</b>
<b>Mg</b>	0,08	0,001
<b>Zn</b>	5,60	11,70
<b>Cu</b>	ND	7,00
<b>Fe</b>	32,50	8330,00
<b>Na</b>	11,00	153,30

**ND: No determinado**

Analizando los valores referidos en la tabla 12, se aprecian diferencias entre los estudios realizados. Hay elementos que tienen valores más elevados y otros inferiores a la droga en estudio. Lo que sí coincide es que en los tres casos el mineral que se encuentra en mayor cantidad, respecto al resto, es el Fe.

La biodisponibilidad de estos elementos, depende de los constituyentes del suelo, ya que las plantas lo asimilan a través de las raíces pero también, de otras fuentes adicionales como los polvos atmosféricos, los productos fitosanitarios, fertilizantes y contaminantes del medio ambiente, los que podrían ser absorbidos por vía foliar (Bahadur *et al.*, 2011; Tokalioğlu, 2012; Saraf y Samant, 2013; Apáez *et al.*, 2018).

Además, del efecto nutracéutico o terapéutico que pudieran tener las infusiones, las plantas con las que se elaboran también aportan minerales a la dieta habitual. Elementos tales como calcio, magnesio y zinc, se han determinado como esenciales para la salud humana, sin embargo, otros como plomo, cadmio y aluminio o el arsénico resultan ser tóxicos (Kirmani *et al.*, 2011; Vermani *et al.*, 2010).

En la tabla 13. se puede observar que, si bien los niveles de materia inorgánica en las drogas crudas son elevados, sobre todo en la moringa, estos no corresponden a la presencia de metales pesados.

**Tabla 13. Resultado del análisis de metales pesados en *M. oleífera* e *H. sabdariffa***

Análisis químico			
Parámetros	Unidad	Resultados	**Requisitos
Arsénico	mg/kg	< 0,005	Máx. 1,0
Plomo	mg/kg	< 0,09	Máx. 0,5

**\*\* Requisitos Químicos establecidos según Norma NTE INEN 2392:2017-04 Segunda Revisión para Hierbas Aromáticas**

Los resultados obtenidos fueron iguales para ambas drogas, por lo que se puede concluir que las muestras analizadas cumplen con los requisitos establecidos por la norma NTE INEN 2392:2017-04, ambas drogas vegetales están aptas para el consumo humano.

Los metales pesados se pueden encontrar en forma de minerales, sales u otros compuestos. No se degradan o destruyen fácilmente de forma natural o biológica por no tener funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino *et al.*, 2002). Estos elementos son peligrosos por la tendencia que tienen de acumularse en los cultivos, de ahí la necesidad de cuantificar los niveles en los que pudieran encontrarse. La absorción de metales pesados por las plantas es, generalmente, la primera puerta entrada de éstos en la cadena alimentaria, lo cual pudiera representar un riesgo para la salud, sobre todo, si su nivel de acumulación en el cuerpo es elevado y si el tiempo de exposición del organismo a dicha contaminación es prolongado (Prieto *et al.*, 2009).

### **III.1.2 Control microbiológico**

Se realizó el control microbiológico de las materias vegetales por separado, para asegurar así, una materia prima libre de microorganismo que pueda resultar perjudicial para la salud humana. Los resultados que se obtuvieron se encuentran dentro de límites permisibles establecidos en la norma NTE INEN 2392:2013.

### **III.2 Tamizaje fitoquímico**

El análisis químico cualitativo preliminar del extracto acuoso de moringa, sugirió la presencia de los metabolitos secundarios que se muestran en la tabla 14. Los compuestos

químicos que mostraron un resultado positivo con mayor intensidad fueron: alcaloides, aminoácidos y flavonoides. Estudios fitoquímicos realizados por otros autores en extractos acuosos también han evidenciado la presencia de flavonoides, alcaloides, saponinas, además de antraquinonas, esteroides, terpenoides, glucósidos cardíacos, antocianinas, taninos y carotenoides (Nweze *et al.*, 2014).

Según el ensayo de espuma se sugiere la presencia de saponinas, resultado coincidente con lo referido por Nweze *et al.* (2014) y Okiki *et al.* (2015). Sin embargo, el tamizaje realizado a la moringa cosechada en la misma parcela de tierra, pero siendo la planta más joven, no dio positivo para tal metabolito (Bastidas y Sojos, 2017). Este resultado, aunque es cualitativo y de carácter preliminar, puede sugerir la necesidad de realizar estudios del material vegetal a diferentes grados de maduración de la planta, pues este es un factor que puede influir en la variabilidad química de la droga vegetal.

En los ensayos realizados al extracto acuoso de la *H. sabdariffa* resalta la presencia de flavonoides. Hay que señalar que los principales constituyentes de *H. sabdariffa* son ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y flavonoides (Da-Costa *et al.*, 2014).

Ensayos fitoquímicos realizados por otros autores refieren la presencia de saponinas, solo extraíbles en agua, alcaloides y flavonoides, estos últimos presentes en todas las partes de la planta (Mungole *et al.*; 2011). Kenneth *et al.*; (2015) informa la existencia de alcaloides, flavonoides, fenoles y saponinas en el extracto acuoso de la droga vegetal.

En relación al extracto acuoso de los cálices de Jamaica, este presenta una alta pigmentación roja, atribuible, precisamente a la presencia de antocianinas. Esta alta pigmentación resulta un inconveniente para poder visualizar con certeza los resultados del tamizaje que se determinen por cambios de color (Da-Costa *et al.*, 2014). Esta es la razón por la que el resultado para el ensayo de ninhidrina se muestra como dudoso.

Cabe mencionar que los ensayos realizados no reflejan resultados específicos, ya que pueden estar sometidos a falsos positivos o negativos en dependencia de distintas causas, entre ellas, la naturaleza de la materia vegetal en estudio. Sin embargo, se sugiere la aplicación de otros métodos de análisis más específicos.

**Tabla 14. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos de *M. oleifera* e *H. sabdariffa***

Ensayo	Metabolitos	Resultado	
		Hojas de moringa	Cálices de jamaica
Dragendorff	Alcaloides	+++	-
Mayer	Alcaloides	++	-
Wagner	Alcaloides	+++	-
Espuma	Saponinas	+	-
Fehling	Azúcares reductores	+	+
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+	+
Ninhidrina	Aminoácidos	+++	Dudoso
Shinoda	Flavonoides	+++	++
Mucílagos	Mucílagos	-	-

### III.3 Cromatografía en capa delgada (CCD)

En el campo de la fitoquímica la CCD tiene gran aplicación. Es un método de separación cromatográfico que, aunque puede ser utilizado para cuantificar, su mayor utilidad es de tipo cualitativa. Dentro de sus usos pudieran citarse: la identificación de metabolitos secundarios mediante estándares de referencia; el monitoreo de separaciones cromatográficas obtenidas a través de técnicas cromatográficas preparativas en columna y estudios químicos cualitativos haciendo uso de algunos de los reactivos utilizados en el tamizaje fitoquímico.

En esta última aplicación radica el objetivo del estudio cromatográfico planar realizado, el que se desarrolló utilizando una fase móvil de elevada polaridad (butanol:ácido acético:agua) para lograr la corrida y separación de los metabolitos hidrosolubles extraídos.

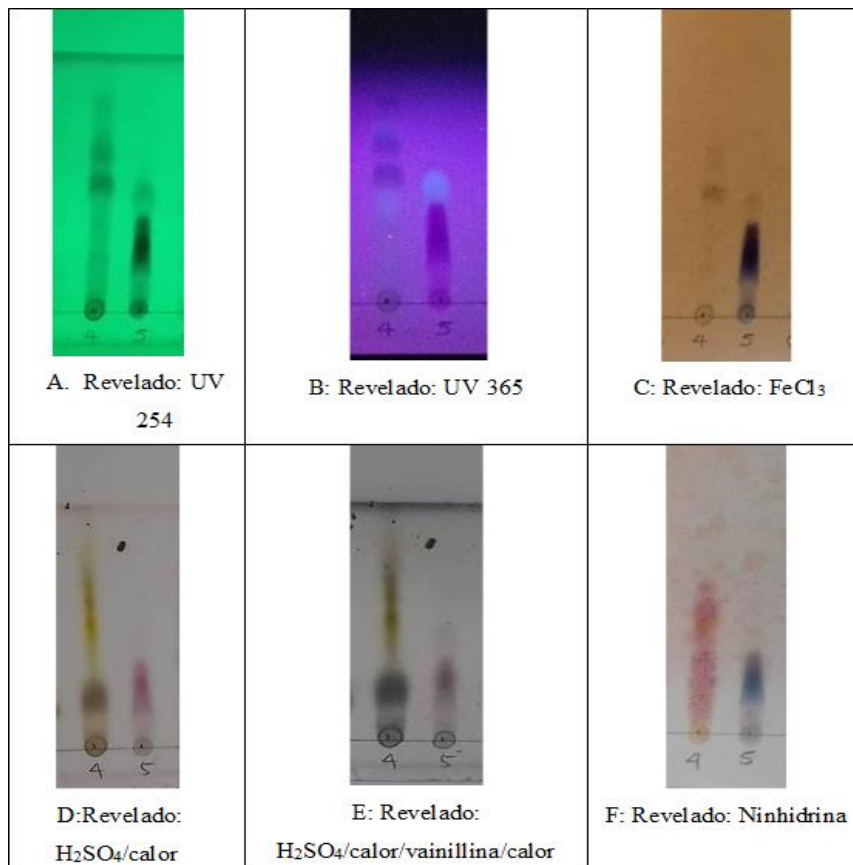
La identificación se llevó a cabo con el uso de diversos reveladores, resultados que se muestran en la figura 4. En todas las placas la primera aplicación (4) corresponde al extracto acuoso de la moringa y la segunda (5) al extracto acuoso de la flor de jamaica.

Al observar la primera y segunda placa se puede apreciar que en ambas muestras revelan un gran número de manchas a la luz UV, tanto a 254 nm (imagen A), como a 365 nm (imagen B). El resultado evidencia que ambos extractos poseen compuestos con grupos cromóforos conjugados. A simple vista podría sugerirse que en el extracto acuoso de los cálices de jamaica, los compuestos con cromóforos conjugados presentan una mayor polaridad que los del extracto de moringa, tomando en consideración el Rf de las manchas más relevantes.

Lógicamente, como segundo análisis, se buscó identificar la posible presencia de compuestos fenólicos en ambas muestras. Para tal objetivo, la placa antes revelada con la luz ultravioleta se roció con la solución de cloruro férrico (imagen C). Como se puede apreciar, las manchas con un Rf intermedio en la corrida de la moringa, tienen el comportamiento propio de metabolitos de naturaleza fenólica. En el caso de la flor de jamaica los cambios no fueron tan apreciables, pues las manchas de mayor intensidad también se observaron al visible, por lo que la pigmentación del extracto enmascara los cambios de coloración que deben observarse en el caso de los compuestos fenólicos.

Otro de los reveladores cromogénicos empleados fueron el ácido sulfúrico (imagen D) y la combinación con vainillina (imagen E). Estos son reveladores que permiten apreciar la mayoría de los compuestos químicos que se separaron con CCD. En el extracto de jamaica no se muestran cambios con relación a las placas antes comentadas, es decir, no se aprecian otras manchas diferentes a las ya observadas.

**Figura 4. Análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos acuosos de *M. oleífera* e *H. sabdariffa*. FM: butanol:ácido acético:agua (65:25:10); FE: placas de vidrio de sílica gel GF254**



Para el extracto de moringa lo más llamativo es el cambio de color de dos zonas fundamentales, a Rf entre medio y elevado se observan zonas de color amarillo, lo cual suele ocurrir con compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos como el ácido gálico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido cafeico, entre otros (Singh *et al.*, 2009), son de gran importancia debido a su actividad antioxidante contra los radicales libres (Sreelatha y Padma, 2009).

Interesante resulta la mancha de color oscuro discretamente violáceo, la cual no reveló bajo la luz UV, indicio éste de ser estructuras que no presentan grupos cromóforos conjugados. Si se hace una asociación con el tamizaje fitoquímico, en el extracto acuoso de moringa dio positiva la prueba de espuma, algo propio de la presencia de saponinas. Las saponinas tienen elevada polaridad y pueden presentar núcleos triterpénicos o esteroidales, los cuales carecen de agrupamientos funcionales capaces de absorber a la luz ultravioleta, sin embargo, la reacción cromogénica de color violeta, la refiere la literatura, cuando se revela

con vainillina/H<sup>+</sup> ante la presencia de dichos productos naturales (Waksmundzka *et al.*, 2008).

En un estudio *in vivo* realizado por Sharma y Paliwal (2012), aislaron y caracterizaron saponinas de las vainas de *M. oleífera*, las que demostraron tener una actividad protectora en el tejido hepático y renal.

Por otra parte el revelado utilizando ninhidrina confirmó la presencia de aminoácidos en la moringa y la ausencia en el extracto acuoso de los cálices de jamaica. La mayoría de los aminoácidos dan un color violeta, mientras que el ácido aspártico da rojo azulado y la prolina e hidroxiprolina dan amarillo (Waksmundzka *et al.*, 2008).

#### **III.4 Determinación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu**

El estudio de los compuestos fenólicos presentes en extractos vegetales ha sido de interés desde tiempos pasados, sobre todo, por las propiedades biológicas y por las características organolépticas que generan como: astringencia, amargor, color, entre otros aspectos (Singleton *et al.*, 1999).

Dichos compuestos bioactivos son componentes importantes en la dieta de los seres humanos debido a la amplia gama de propiedades fisiológicas que le han sido atribuidas, como: antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, efectos cardioprotectores y vasodilatadores. Químicamente, poseen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, y la diversidad estructural varía desde simples moléculas fenólicas hasta complejas estructuras poliméricas (Bravo, 1998; Balasundram *et al.*, 2006).

La cuantificación de tales metabolitos como grupo, ha sido una herramienta que muchos investigadores han utilizado para la estandarización química de extractos vegetales y para relacionar esta con propiedades biológicas como el efecto antioxidante.

El método más utilizado para estimar el contenido de fenoles es, precisamente, el de Folin Ciocalteu. El reactivo esencial del ensayo está conformado por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico que es de color amarillo. La reacción tiene lugar en condiciones básicas (pH 10), donde el ion fenolato que se genera reduce al reactivo de Folin mediante una reacción de tipo óxido/reducción y como consecuencia se forma un complejo que presenta una coloración azul, cuya absorbancia se mide a 765 nm

(Magalhaes *et al.*, 2010; Margraf *et al.*, 2015). Para la cuantificación a través de las curvas de calibración han sido utilizados diferentes estándares fenólicos como ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, etc. (Bastola *et al.*, 2017) El contenido de fenoles totales, generalmente, se expresa en equivalentes del estándar empleado, sobre todo, el ácido gálico.

La cuantificación realizada en los extractos acuosos de *M. oleifera* e *H. sabdariffa*, a partir de la ecuación obtenida utilizando el ácido gálico como patrón y teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido para los extractos, se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15. Fenoles totales presentes en *M. oleifera* e *H. sabdariffa***

Extractos	Cuantificación de fenoles totales mg EAG/100 g de droga cruda / DS
<i>M. oleifera</i>	2748,26/77,57
<i>H. sabdariffa</i>	5138,83/111,29

**EAG: equivalentes a ácido gálico; DS: desviación estándar**

Como se puede apreciar la cantidad de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de *H. sabdariffa* resulta ser casi el doble de la cantidad determinada en el de *M. oleifera*.

Al comparar los resultados obtenidos con los referidos por Bastidas y Sojos (2017), se puede observar que las hojas de moringa, recolectadas en los mismos terrenos, pero con solo 3 meses de sembrada, presentó una mayor cantidad de compuestos fenólicos (3521 mg EAG/100 g de hojas secas). La determinación se realizó con igual procedimiento y bajo las mismas condiciones de extracción. Este resultado hace notar la importancia de los estudios de dinámica de acumulación de los metabolitos secundarios, para explotar la planta medicinal cuando presente la madurez óptima o en su mejor estado fenológico.

La presencia de compuestos fenólicos en moringa ha sido referida por diversos autores. Rodríguez-Pérez *et al.*, (2015) compararon diferentes métodos de extracción (maceración y extracción por ultrasonido) utilizando como menstruos: metanol, etanol, acetona y mezclas hidroalcohólicas (70:30 y 50:50). Los resultados mostraron que la cantidad de compuestos fenólicos extraídos por ambos métodos, usando disolventes orgánicos puros, es menor que con el uso de las mezclas hidroalcohólicas.



Sreelatha y Padma (2009), realizaron la cuantificación de fenoles totales en un extracto acuoso de hojas de moringa, reportando valores de 45,81 mg EAG/g de muestra.

En relación con el método de extracción, la maceración por sonicación logra una mayor extracción de compuestos fenólicos, lo cual puede deberse a que el uso de ultrasonidos puede romper las paredes celulares de la planta favoreciendo el rendimiento del proceso de extracción (Vinatoru, 2001).

Resulta importante considerar que los extractos de productos vegetales contienen una gran cantidad de biomoléculas, algunas de las cuales, aunque son de características no polifenólicas, pero pueden interactuar con el Folin-Ciocalteu, lo que puede interferir en el resultado obtenido. Dentro de estos metabolitos se encuentran los azúcares reductores (fructosa y glucosa y en menor medida ramnosa, manosa y glucosa), aminoácidos y ácido ascórbico (Granato *et al.*, 2016; Muñoz-Bernal *et al.*, 2017).

La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de la actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante.

### **III.5 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

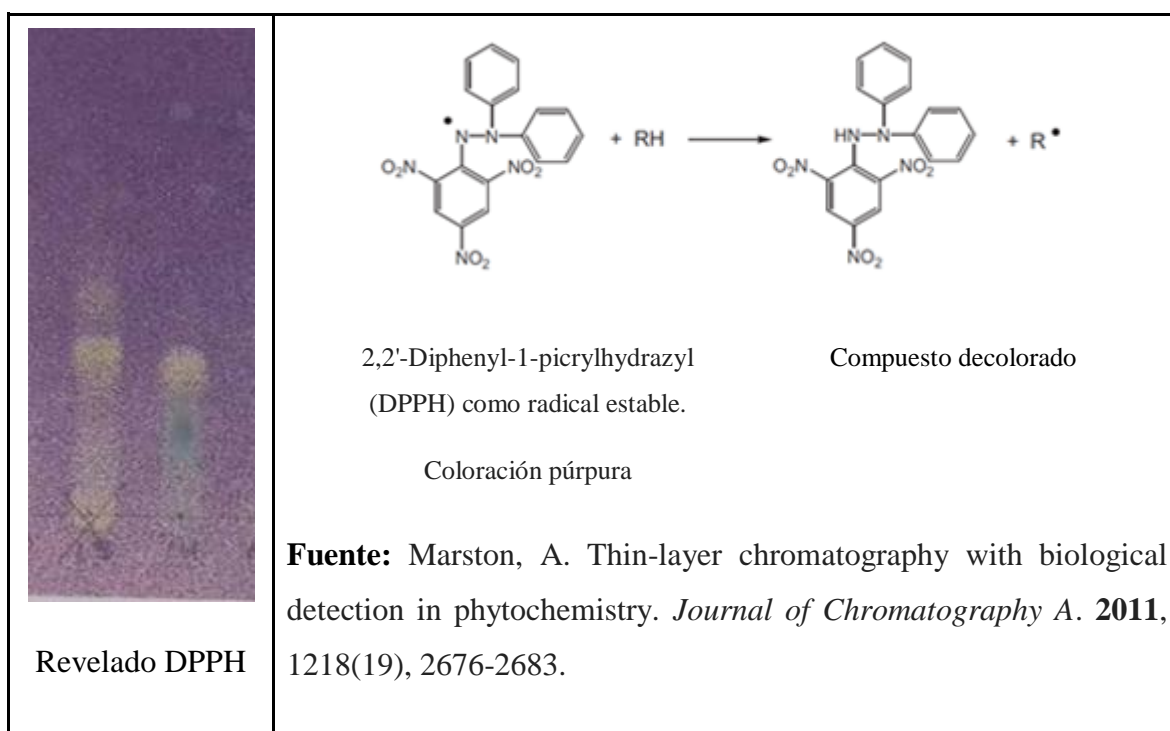
Los estudios químicos cualitativos realizados mediante tamizaje fitoquímico y CCD, sugieren la presencia de compuestos químicos con posible actividad antioxidante. Lógicamente, la idea de evaluar la actividad antioxidante surge, no sólo por dichos estudios, sino también por los diversos artículos que hacen alusión al poder antioxidante de ambas drogas en estudio (Siddhuraju y Becker, 2003; Iqbal y Bhangar, 2006; Sreelatha y Padma, 2009; Ush *et al.*, 2005; Mohd *et al.*, 2010). Aunque la literatura evidencia tal efecto, se considera importante la evaluación de cada materia prima vegetal, pues factores tanto intrínsecos (edad, estado fenológico) como extrínsecos (clima, suelo, control fitosanitario) pudieran influir en los resultados (Miranda y Cuellar, 2000).

La actividad antioxidante cualitativa pudo ser evaluada al rociar una placa con una disolución de DPPH en etanol (0,2 %), el cual actúa como generador de radicales libres. El DPPH puede reaccionar directamente con las sustancias con actividad antioxidante, después de que el disolvente se ha evaporado bajo la campana del laboratorio. Como consecuencia, si hay presencia de sustancias capaces de secuestrar radicales libres, se

produce un cambio del color púrpura a diferentes tonalidades de amarillo con un fondo que permanece de color morado (figura 5) dependiendo de la cantidad de antioxidante presente en la reacción. De no existir compuestos con capacidad de secuestrar radicales libres en la placa, el color violeta inicial propio de la disolución de DPPH no experimenta ningún cambio (Glavind y Holmer, 1967; Marston, 2011).

Como se puede apreciar en ambos extractos, las zonas que antes mostraron fluorescencia a 254 nm, las mismas que revelaron con FeCl<sub>3</sub> (figura 4), ahora fueron capaces de decolorar la disolución de DPPH, por lo que se demuestra la capacidad antioxidante de ambos extractos acuosos.

**Figura 5. Resultados de la actividad antioxidante por CCD de los extractos acuosos de *M. oleifera* e *H. sabdariffa***



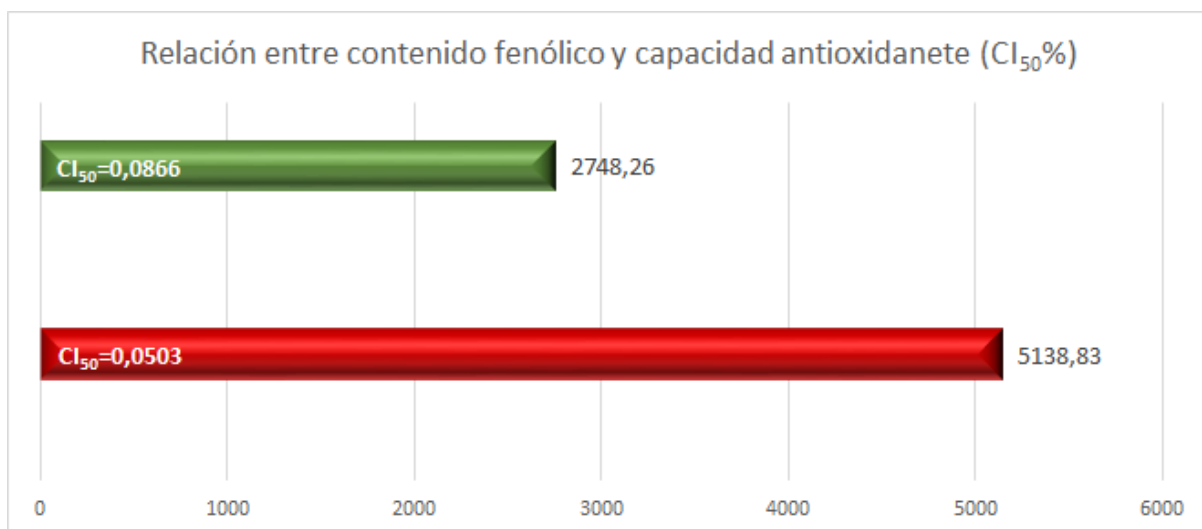
Luego del análisis cualitativo, se procedió a cuantificar dicho poder secuestrador de radicales libres mediante espectrofotometría UV. Los resultados correspondientes a la CI<sub>50</sub> de cada extracto se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16. Capacidad secuestradora de radicales libres frente al DPPH de la *M. oleifera* e *H. sabdariffa***

Extractos	CI <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>M. oleifera</i>	0,0866
<i>H. sabdariffa</i>	0,0503

Como se puede constatar el extracto acuoso de *H. sabdariffa*, a una menor concentración (0,0503 mg/mL) logra inhibir el 50% de la concentración inicial del radical DPPH. Este resultado, sin lugar a dudas, guarda estrecha relación con los niveles de polifenoles totales determinados para dicho extracto. Los resultados infieren que, en la medida que exista mayor contenido de metabolitos de naturaleza fenólica, mayor será la capacidad antioxidante (figura 6). Resultados similares han sido referidos para infusiones realizadas con otras plantas (Bramati *et al.*, 2003).

**Figura 6. Relación entre los mg EAG por cada 100 g de droga y la capacidad secuestradora de radicales libres (CI<sub>50</sub>) de las dos especies estudiadas**



Chumark *et al.*, (2008) realizaron un estudio de la actividad antioxidante por el método del DPPH, en un extracto acuoso de hojas de *M. oleifera*, obteniendo un valor de la CI<sub>50</sub> de 0,0781 mg/mL. En otro estudio realizado con el polvo de hojas secas de *M. oleifera*,

utilizando como menstruo el metanol, dio una  $CI_{50}$  de 1,60 mg/mL, según el método del radical DPPH (Charoensin, 2014).

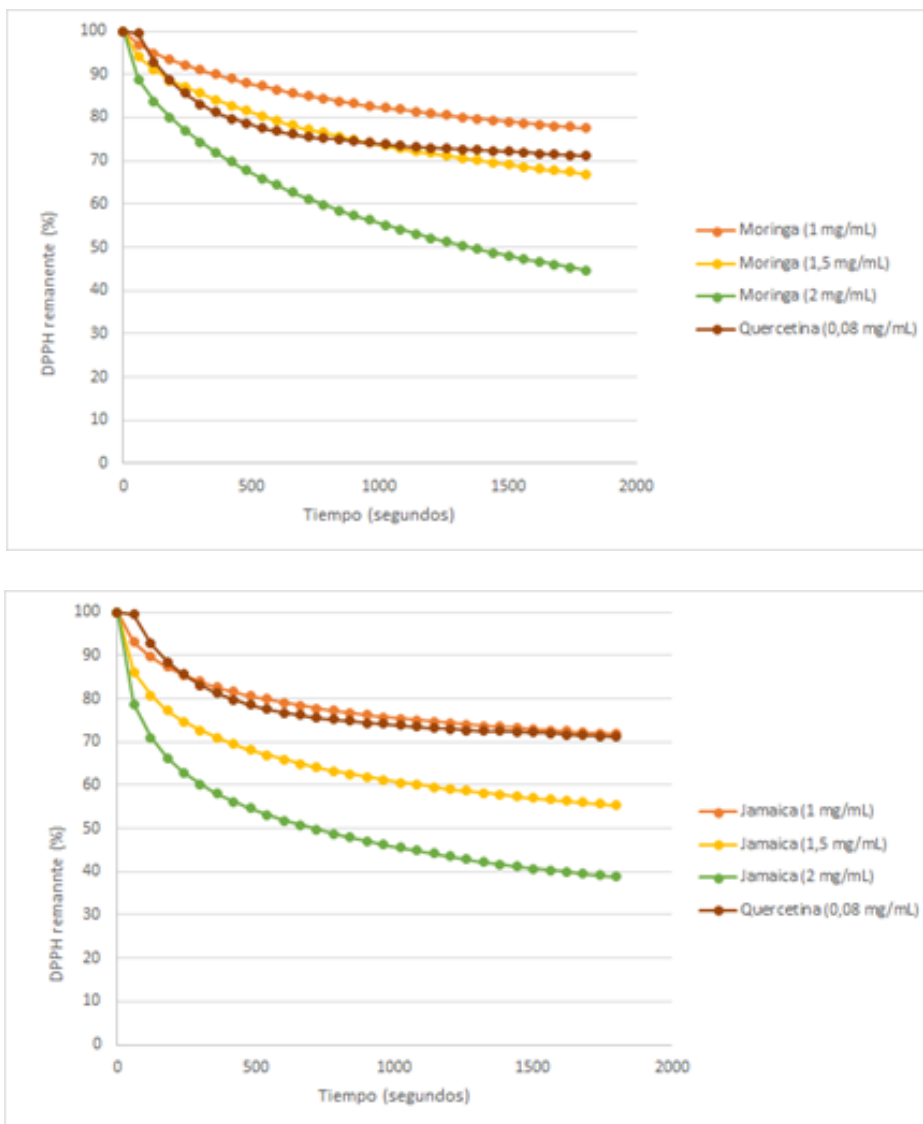
Reyes *et al.*, (2015), evaluaron la capacidad antioxidante de un extracto acuoso de los cálices secos de Jamaica, obteniéndose una  $CI_{50}$  de 0,1133 mg/mL. En otro estudio se evaluó la capacidad secuestradora que presentaba un extracto metanólico de los cálices de la flor de jamaica, mediante la misma técnica (DPPH), dando un  $CI_{50}$  de 0,0371 mg/mL (Formagio *et al.*, 2015). En cada uno de los estudios, lógicamente, existen aspectos que podrían incidir en la variabilidad de los resultados. Podrían señalarse, por ejemplo, los factores intrínsecos y extrínsecos que afectan la composición química de una planta (clima, suelo, edad, etc.) y como consecuencia su actividad biológica. También las condiciones en las que se realizó cada ensayo, el método de extracción de la muestra, entre otros.

Luego de determinada la  $CI_{50}$  se procedió a evaluar la cinética del proceso, en los extractos acuosos de ambas drogas vegetales. Los resultados se muestran en la figura 7.

Como se puede apreciar el estado estacionario a las diferentes concentraciones ensayadas se logra de manera lenta. Lógicamente, en la medida que la concentración del extracto aumenta la velocidad de inhibición del DPPH se incrementa, incluso el comportamiento resulta ser similar al que muestra la quercetina, utilizada en el ensayo como patrón. Cabe señalar que el patrón muestra perfil muy similar al obtenido con el extracto de moringa a una concentración de 1,5 mg/mL y con el extracto de Jamaica a la concentración de 1 mg/mL. Evidentemente, el poder antioxidante del extracto acuoso de la Jamaica es superior al de moringa, resultados que confirman lo antes obtenido con la  $CI_{50}$ .

Según Brand-Williams *et al.*, (1995) no todos los metabolitos muestran una misma cinética de reacción. Estudios han mostrado que compuestos como el ácido ascórbico, ácido isoascórbico e isoeugenol reaccionan rápidamente con el DPPH, alcanzando su máximo de actividad en menos de 1 min. Otros metabolitos tienen un comportamiento intermedio, por ejemplo, el  $\alpha$ -tocoferol, el cual alcanza el estado estacionario después de, aproximadamente, 5 minutos. Los extractos en estudio muestran un comportamiento similar al guayacol, en donde la reacción con el DPPH ocurre más lentamente.

**Figura 7. Cinética de la reacción con DPPH para los extractos acuosos de *M. oleífera* e *H. sabdariffa* a diferentes concentraciones**

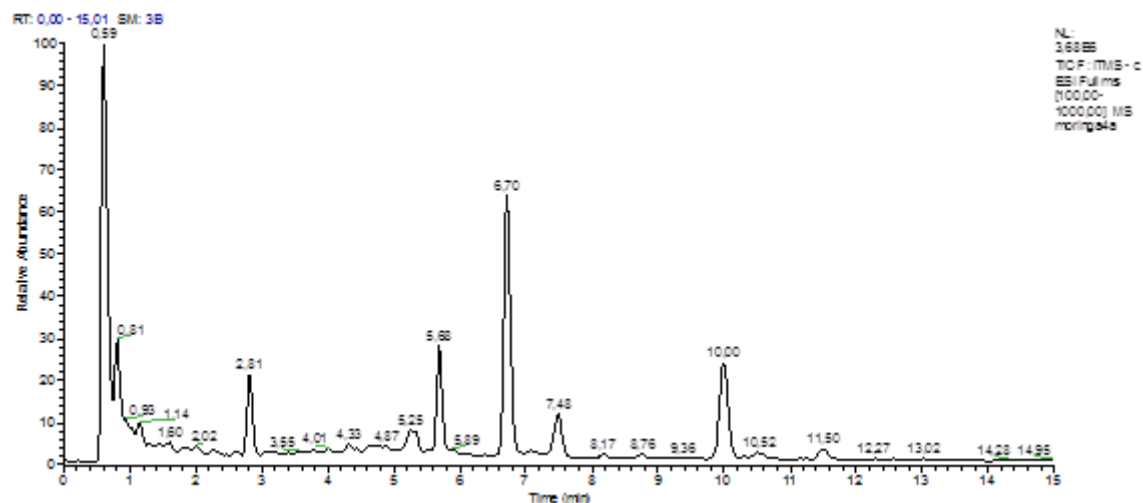


### **III.6 Estudio químico mediante CLAE-EM de los extractos acuosos de *M. oleífera* e *H. sabdariffa*.**

El análisis mediante CLAE acoplado a masa, permitió la identificación de los principales metabolitos presentes en los extractos acuosos de ambas especies.

Del análisis correspondiente al extracto acuoso de la *M. oleífera* se obtuvo el cromatograma de la corriente iónica principal que se muestra en la figura 6, donde fue posible identificar 18 compuestos.

**Figura 8. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto acuoso de *M. oleífera***



El análisis de los iones moleculares (modo negativo), así como los fragmentos  $m/z$  obtenidos para cada compuesto, junto a la búsqueda bibliográfica, logró la identificación de los compuestos que se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17. Compuestos químicos identificados en la *M. oleifera*, mediante CLAE-EM (modo negativo).**

Tr (min)	Producto natural Moringa	M/Z [M - H]	MS <sup>2</sup>	Bibliografía
0,61	ácido glucónico	195	176, 158, 129*, 99	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
0,67	ácido cítrico	191	173, 129, 127, 111*	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
0,83	Fenilalanina	164	147	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
0,85	3,4-di-O-caffeoilquínico	515	353, 341, 335, 191, 179*, 173	Masike <i>et al.</i> 2017
1,43	3,4-di-O-caffeoilquínico (isómero)	515	353, 341*, 335, 191, 179, 173	Masike <i>et al.</i> 2017
1,14	ácido 3-O-caffeoilquínico	353	191*, 179, 135	Masike <i>et al.</i> 2017
1,47	quercetina diglicosidada	625	463*, 301	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
1,82	ácido 4-O-caffeoilquínico	353	191, 179, 173*	Masike <i>et al.</i> 2017

**Tabla 17.** (continuación)

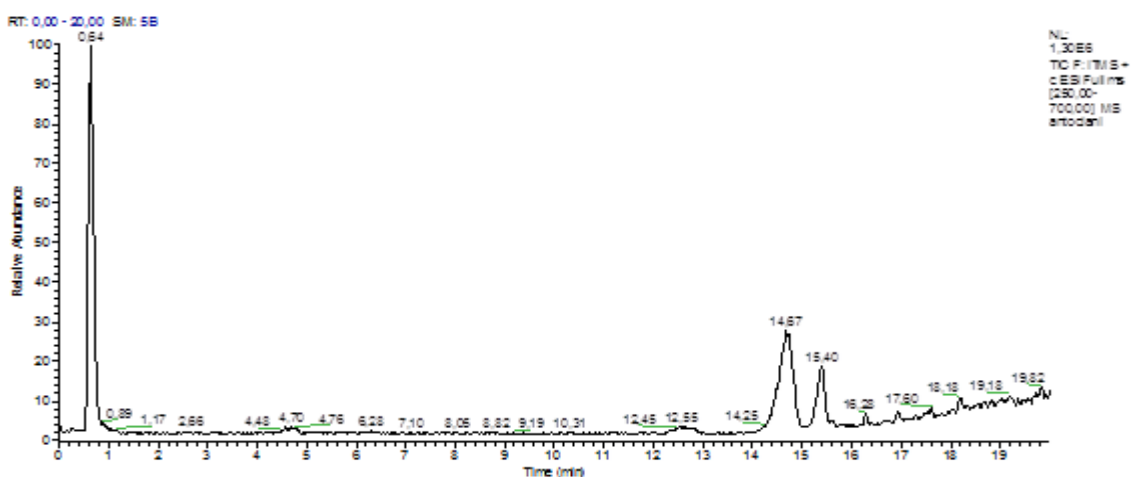
<b>Tr (min)</b>	<b>Producto natural Moringa</b>	<b>M/Z [M - H]</b>	<b>MS<sup>2</sup></b>	<b>Bibliografía</b>
2,82	6,8-C-dihexosa apigenina	593	575, 503, 473*, 383, 353,	Makita <i>et al.</i> 2016
3,86	quercetina diglicosidada	625	463*, 301	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
5,16	Isolariciresinol glicósido/lariceresinol glicósido	521	359	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
5,32	glicósido de apigenina	431	341, 311*, 283	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
5,68	quercetina-3-O-galactósido	463	301*, 300	Masike <i>et al.</i> 2017
6,73	quercetina-3-O-acetil galactósido	505	463, 301*, 300	Masike <i>et al.</i> 2017
7,06	hidroxi-metilglutaroil hexosa quercetina	607	463*, 545, 505, 301	Makita <i>et al.</i> 2016
7,50	kaempferol 3-O-glicósido	447	327, 285, 284*,255	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> 2015
9,98	kaempferol acetil glicósido	489	285	Makita <i>et al.</i> 2016
11.52	acetil hexose-isoramnetina	519	315*	Makita <i>et al.</i> 2016

Para la *M. oleifera* se identificaron metabolitos de naturaleza fenólica, tales como flavonoides glicosidados, fundamentalmente, derivados de quercetina, apigenina y kaempferol; ácidos fenólicos (3,4-di-O-caffeoilquínico, ácido 3-O-caffeoilquínico, ácido 4-O-caffeoilquínico) y un lignano (isolariciresinol glicósido/lariceresinol glicósido). Además de ácidos orgánicos (ácido glucónico y ácido cítrico) y el aminoácido fenilalanina.

Bastidas y Sojos, (2017) determinaron la presencia de glucosinolatos en moringa recolectada a los 3 meses de nacimiento, metabolitos que no fueron hallados en la muestra analizada. Este hallazgo sugiere la necesidad de estudiar la planta en diferentes grados de madurez.

Similar análisis se realizó para el extracto acuoso de los cálices de Jamaica. Del análisis correspondiente al extracto acuoso de la *H. sabdariffa* se obtuvo el cromatograma de la corriente iónica principal tanto para el modo positivo como para el negativo. En la figura 9, tabla 18 se presentan los 3 metabolitos detectados en modo positivo y en la figura 10, tabla 19, los 5 productos naturales identificados en modo negativo.

**Figura 9. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto acuoso seco de *H. sabdariffa* (modo positivo)**

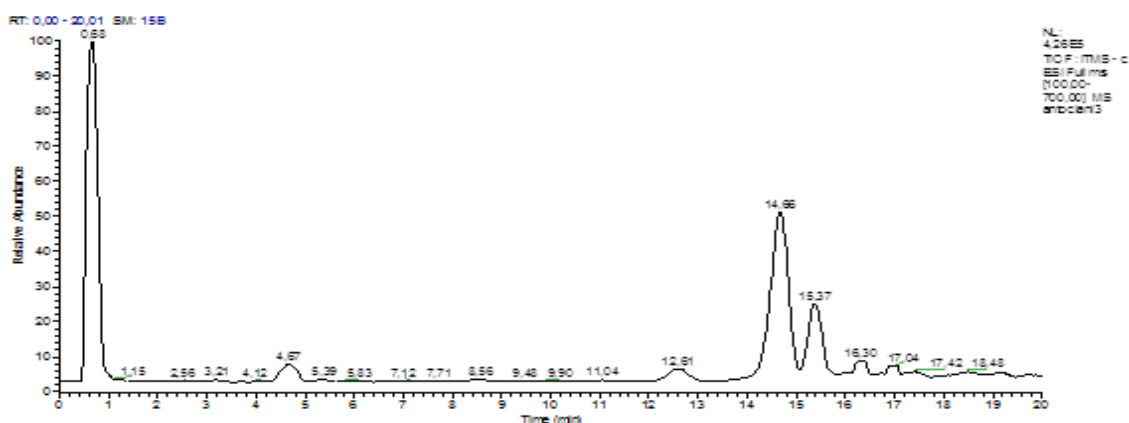


**Tabla 18. Compuestos químicos identificados en el extracto acuoso de *H. sabdariffa* mediante CLAE-EM (modo positivo).**

Tr (min)	Producto natural	[M+H]	MS <sup>2</sup>	Bibliografía
14,70	delfinidina-3-sambubiósido	597	303	Beltrán <i>et al.</i> , 2010
15,42	cianidina 3-sambubiósido	581	287	Sarkar <i>et al.</i> , 2017
17,44	delfinidina-3-galactósido	465	315*, 303	Sarkar <i>et al.</i> , 2017 Beltrán <i>et al.</i> , 2010



**Figura 10. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto acuoso seco de *H. sabdariffa* (modo negativo)**



**Tabla 19. Compuestos químicos identificados en el extracto acuoso de *H. sabdariffa* mediante CLAE-EM (modo negativo)**

Tr (min)	Producto natural Jamaica	[M-H]	MS <sup>2</sup>	Bibliografía
0,66	ácido hidroxycítrico	207	189*, 127	(Rodríguez-Medina <i>et al.</i> 2009)
0,68	ácido hibiscus	189	127	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2009)
17,28	quercetina 3-rutinósido	609	301	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2009) (Beltrán <i>et al.</i> , 2010)
17,50	quercetina 3-glucósido	463	301	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2009)
17,86	kaempferol3-( <i>p</i> -coumarilglucósido)	593	447, 285*	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2009)

En la muestra de *H. sabdariffa* se lograron identificar las antocianinas (delfinidina-3-sambubiósido, cianidina 3-sambubiósido, delfinidina-3-galactósido) utilizando el modo positivo. Sin embargo, los flavonoides glicosidados (quercetina 3-rutinósido, quercetina 3-glucósido, kaempferol 3-(*p*-coumarilglucósido) y los ácidos orgánicos (ácido hidroxycítrico, ácido hibiscus), se identificaron en el modo negativo.

Los resultados químicos obtenidos en ambas drogas vegetales a través de la CLAR-EM, evidencian la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos en sentido general y de flavonoides glicosidados en particular.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales. Químicamente están compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Pueden presentarse libres o glicosidados (Bruneton, 2001). Como parte de su estructura química poseen un número variable de grupos hidroxilos fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les concede una gran capacidad antioxidante. Por tal razón desempeñan un papel esencial en la protección frente al daño oxidativo, por lo que se pueden emplear en patologías, tales como la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Pace-Asciak *et al.*, 1995). Dentro de los flavonoides la quercetina se ubica entre los que muestran una mayor capacidad antioxidante por reunir los elementos estructurales necesarios para tal actividad (presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; doble enlace conjugado con la función 4 oxo del anillo C e hidroxilos en posición 3 y 4) (Martínez-Flórez, 2002). Muchos de los metabolitos identificados, sobre todo en la moringa, corresponden a derivados de este producto natural.

Los ácidos orgánicos (ácidos cítrico, málico, tartárico) y las antocianinas derivadas de la cianidina y delfinidina (delfinidin-3-sambubiosido, cianidin-3-sambubiosido y cianidin-3,5-diglucoside), son los compuestos que refiere la literatura como los marcadores químicos de la *H. sabdariffa* (Ali *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2009).

Las antocianinas constituyen un grupo de pigmentos hidrosolubles de amplia distribución en el reino vegetal, perteneciente a la familia de los flavonoides (Fennema, 1993). Estructuralmente están constituidas por una molécula de antocianidina, a la que se le une a través de un enlace  $\beta$ -glucosídico, un azúcar.

Estos metabolitos resultan de gran interés para la industria de colorantes alimenticios debido a los atractivos colores que brindan (Konczack y Zhang, 2004). Desde el punto de vista terapéutico la mayoría de los efectos biológicos están relacionados con su actividad antioxidante. Dentro de sus beneficios se plantea, efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, preventivo de afecciones cardiovasculares y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual (Shipp y Abdel, 2010).

### III.7 Diseño de la formulación y control de calidad de la infusión.

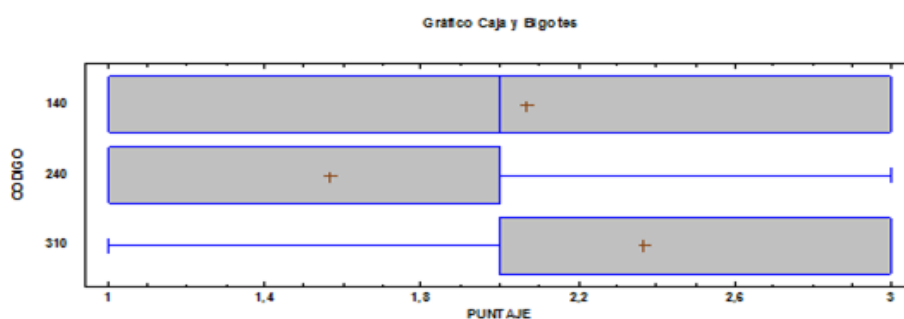
El diseño de la formulación parte de la idea de utilizar las hojas de moringa en infusión, investigación que inició el grupo de trabajo en un trabajo anterior, combinándola con cascarilla de cacao (Bastidas y Sojos, 2017). El proyecto pretende el diseño de varias opciones de infusiones que sean potencialmente funcionales, sin embargo, siempre combinando al polvo de moringa con otra droga vegetal, por las pocas atractivas propiedades organolépticas (sabor y olor) que dicho material brinda en una infusión.

En esta ocasión se diseñaron tres combinaciones de moringa con los cálices de Jamaica en diferentes proporciones. Para la elección de la mejor formulación la respuesta del diseño se centró básicamente, en la evaluación sensorial de las tres opciones referidas en la tabla 8.

Como resultado del análisis de varianza aplicado a los datos obtenidos durante la evaluación sensorial preferencial, se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las formulaciones diseñadas, con un nivel de confianza del 95% (ver anexo 3).

Así mismo, al realizar la prueba de rangos múltiples no se pudo establecer diferencia significativa entre las muestras 140 (70:30) y 310 (50:50) (ver anexo 4). Sin embargo, al analizar la distribución de los datos en el diagrama de caja y bigotes (figura 11), se observa claramente que la muestra 310 presenta datos dispersos entre 2 y 3 puntos, lo que indicaría que esta tiene una tendencia hacia el valor de mayor aceptación sensorial.

**Figura 11. Diagrama de caja y bigotes para la evaluación sensorial de ordenamiento**



Si se hace un análisis conjunto de los resultados obtenidos, de la cuantificación de fenoles totales y la capacidad antioxidante, se considera que al incrementar los niveles de *H. sabdariffa*, no solo se favorece la aceptación sensorial, sino también los niveles de contenido fenólico y por consecuencia de la actividad antioxidante.

La elaboración de la formulación se realizó a través del mezclado de los ingredientes y posterior enfundado de manera automática, en una bolsita de papel poroso. El peso promedio obtenido del proceso de enfundado fue de 1,69 g.

En la preparación se recomienda añadir el agua caliente, a punto de ebullición, sobre la funda; tapar el recipiente y esperar 10-15 minutos.

Organolépticamente la infusión presentó un olor agradable y su color resultó ser rojo, a lo cual contribuye, muy favorablemente, la incorporación de las antocianinas presentes en la *H. sabdariffa*. En relación al sabor, es discretamente ácido por el aporte de los ácidos orgánicos que presenta la droga antes citada y se recomienda endulzar según el gusto de cada usuario.

Una vez preparada la infusión se establecieron los parámetros que definen la calidad de la misma, resultados que se determinaron en la preparación sin endulzar (tabla 20).

Como podemos observar el pH es ácido por lo antes referidos, esta acidez contribuye al posible efecto antibacteriano y ayuda a la absorción de iones metálicos en el cuerpo (Salinas *et al.*, 2012). Los valores obtenidos de grados Brix y azúcares, son aportados por ambas drogas vegetales.

**Tabla 20. Resultados del control de calidad en la infusión de *M. oleifera* e *H. sabdariffa***

<b>CONTROL DE CALIDAD</b>	<b>MEDIA / DE</b>
Índice de refracción	1,33/0,00
Grados Brix	0,84/0,01
Fructosa (%)	0,86/0,01
Glucosa (%)	0,85/0,01
Azúcar invertida (%)	0,86/0,01
pH	3,16/0,00
Densidad relativa	1,00/0,00
Fenoles totales (mg EAG/funda de té)	49,34/2,6
CI <sub>50</sub> (mg/mL)	0,01

EAG: equivalente de ácido gálico. DE: Desviación estándar.

El resultado obtenido para la determinación de fenoles totales fue de 49,34 mg de polifenoles EAG por cada funda de té con un peso neto de 1,69 g y de 1,52 g del contenido de materia vegetal propiamente. Debe considerarse que el método de Folin-Ciocalteu, no es específico sólo para compuestos polifenólicos, compuestos como la fructosa, azúcares reductores, aminoácidos y ácido ascórbico pudieran contribuir en el resultado (Lester *et al.*, 2012; Ludwig *et al.*, 2013; Granato *et al.*, 2016).

La importancia de los antioxidantes en la salud es algo de gran actualidad, debido a la capacidad de neutralizar radicales libres (Thomas, 2000), siendo estos responsables de diversas enfermedades degenerativas, cardiovasculares, infecciosas, arteriosclerosis, muerte celular y cáncer, entre otras (Friedman, 1997).

La formulación estudiada, por los resultados obtenidos, podría resultar una opción más para los consumidores que gusten de una bebida que, además de ser agradable, contribuya al cuidado de la salud humana.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

- El control de calidad de las hojas de moringa y cálices de Jamaica seca y molida (humedad residual, cenizas totales e insolubles en ácido, proteínas, análisis microbiológico, metales pesados) permitió caracterizar a la droga vegetal cruda, encontrándose cada parámetro dentro de los límites referidos o permitidos en la literatura.
  
- El tamizaje fitoquímico realizado en el extracto acuoso de las drogas vegetales, sugirió la presencia en ambos casos de: saponinas, azúcares reductores, compuestos fenólicos, aminoácidos y flavonoides. Para el extracto de moringa se pudo además identificar alcaloides. La cromatografía en capa delgada (CCD), complementa los resultados antes referidos.
  
- El análisis del contenido de minerales determinó la presencia de los macrominerales N, P, K y Ca, observándose valores más elevados para la moringa, en todos los casos. Respecto a los microminerales cuantificados (Mg, Zn, Cu, Fe, Mn, Na y B), destaca la presencia de Fe en la moringa.
  
- Los cálices de *H. sabdariffa* poseen mayor contenido de fenoles totales que la moringa, lo cual incide en que la primera posea una mayor capacidad antioxidante que la moringa.
  
- Se realizó un análisis mediante CLAE/DAD/EM que permitió identificar en el extracto acuoso de la *M. oleifera* metabolitos de naturaleza fenólica, tales como flavonoides glicosilados, derivados de quercetina, apigenina y kaempferol; ácidos fenólicos y un lignano. Además de ácidos orgánicos y el aminoácido fenilalanina. En el extracto acuoso de los cálices de *H. sabdariffa* se identificaron antocianinas, flavonoides glicosilados y ácidos orgánicos.

- La formulación sensorialmente mejor aceptada fue la mezcla 1:1 de ambas drogas secas. El control de calidad de la infusión, mediante diversas pruebas físico-químicas, permitió su estandarización y demostró que la infusión diseñada posee las características necesarias para ser considerada como una bebida funcional, útil en la prevención de trastornos inherentes a la salud humana.

## **CAPÍTULO V**

### **RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios de dinámica de acumulación de los metabolitos secundarios en diferentes épocas de recolección y grado de madurez de la planta, fundamentalmente, en la *M. oleifera*.
  
- Realizar el control microbiológico de la formulación final.
  
- Determinar la concentración de otros posibles nutrientes tales como: vitaminas y aminoácidos.
  
- Determinar la estabilidad del producto ya embalado.



## ANEXOS

**Anexo 1. Valor nutritivo de hojas frescas y polvo de hojas secas por cada 100 g de droga vegetal.**

<b>Componente analizado</b>	<b>Unidad</b>	<b>Hojas (fresca)</b>	<b>Polvo de hojas (seca)</b>
<b>Calorías</b>		92	205
<b>Proteína</b>	g	6,70	27,10
<b>Grasa</b>	g	1,70	2,30
<b>Carbohidratos</b>	g	13,40	38,20
<b>Fibra</b>	g	0,90	19,20
<b>Minerales</b>	g	2,30	-
<b>Calcio</b>	mg	440	2003
<b>Magnesio</b>	mg	24	368
<b>Fósforo</b>	mg	70	204
<b>Potasio</b>	mg	259	1324
<b>Cobre</b>	mg	1,10	0,57
<b>Hierro</b>	mg	7,00	28,20
<b>Azufre</b>	mg	137	870
<b>Ácido oxálico</b>	mg	101	1600
<b>Vitamina A (beta-caroteno)</b>	mg	6,80	16,30
<b>Vitamina B (colina)</b>	mg	423	-
<b>Vitamina B1 (tiamina)</b>	mg	0,21	2,64
<b>Vitamina B2 (riboflavina)</b>	mg	0,05	20,50
<b>Vitamina B3 (ácido nicótico)</b>	mg	0,80	8,20
<b>Vitamina C (ácido ascórbico)</b>	mg	220	17,30
<b>Vitamina E (alfa-tocoferol acetato)</b>	mg	-	113
<b>Arginina</b>	mg	402	1325
<b>Histidina</b>	mg	141	613
<b>Lisina</b>	mg	288	1325
<b>Triptófano</b>	mg	127	425

<b>Fenilalanina</b>	mg	429	1388
<b>Metionina</b>	mg	134	350
<b>Treonina</b>	mg	328	1188
<b>Leucina</b>	mg	623	1950
<b>Isoleucina</b>	mg	422	825
<b>Valina</b>	mg	476	1063

**Fuente:** (Price, 2007).

### Anexo 2. Ficha de evaluación sensorial de ordenamiento

<b>FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE TÉ DE MORINGA Y JAMAICA</b>	
<b>Nombre:</b>	
<b>Fecha:</b>	
Frente a usted tiene tres muestras de Té de Moringa y Jamaica. Por favor pruebe la muestra y ordene de forma ascendente los códigos correspondientes según su nivel de aceptación.	
140	_____
240	_____
310	_____

### Anexo 3. Tabla de análisis de varianza

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	15,1739	2	7,58696	13,33	0,0000
Intra grupos	76,8261	135	0,569082		
Total (Corr.)	92,0	137			

#### Anexo 4. Prueba de rangos múltiples

<b>CÓDIGO</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
240	46	1,56522	X
140	46	2,06522	X
310	46	2,36957	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
140 - 240	*	0,5	0,311088
140 - 310		-0,304348	0,311088
240 - 310	*	-0,804348	0,311088

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, Emad. Antibacterial properties of leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. growing in sudan. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. **2015**, 5(1), 1-5.
- Abollino, O.; Aceto, M.; Malandrino, M.; Mentasti, E.; Sarzanini, C.; Barberis, R. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental pollution*, **2002**, 119(2), 177-193.
- Abou-Arab, A. A.; Abu-Salem, F. M.; Abou-Arab, E. A. Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of American Science*. **2011**, 7(7), 445-456.
- Alarcón Cruz, N.; Cruz, N. A.; de Investigaciones Forestales, I. N.; Pecuarías, A. y.; Solano, J. P. L.; Chapingo, U. A. morphological characterization of an ethnographic sample of roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. **2013**, XIX (1), 85–98.
- Ali, B. H; Wabel, N. A., Blunden, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. **2005**, 19(5), 369-375.
- Amaglo, N. K.; Bennett, R. N.; Lo-Curto, R. B.; Rosa, E. A.; Turco, V. L.; Giuffrida, A.; Lo-Curto, A.; Crea, F.; Timpo, G. M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*. **2010**, 122(4), 1047-1054.
- Anwar, F.; Latif, S.; Ashraf, M.; Hassan, A. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res*. **2007**, 21, 17-25.
- Apáez-Barrios, P.; Pedraza-Santos, M. E.; de las Nieves, M. Yield and Anthocyanin Concentration in *Hibiscus Sabdariffa* L. with Foliar Application of Micronutrients *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. **2018**, 24(2).
- Ara, N.; Rashid, M.; Amran, M. S. Comparison of *Moringa oleifera* leaves extract with atenolol on serum triglyceride, serum cholesterol, blood glucose, heart weight, body weight in adrenaline induced rats. *Saudi J Biol Sci*. **2008**, 15(2), 253-58.
- Atoui, A.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. **2005**, 89, 27-36.

- Atsukwei, D.; Eze, E. D.; Adams, M. D.; Adinoyi, S. S.; Ukpabi, C. N. Hypolipidaemic effect of ethanol leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. in experimentally induced hypercholesterolemic wistar rats. *Int J Nutr Food Sci.* **2014**, 3(4), 355-360.
- Bahadur, A.; Chaudhry, Z.; Jan, G.; Danish, M.; ur Rehman, A.; Ahmad, R.; Jan, F. G. Nutritional and elemental analyses of some selected fodder species used in traditional medicine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **2011**, 5(8), 1157-1161.
- Bahattacharya, A.; Agrawal, D.; Sahu, P. K.; Kumar, S.; Mishra, S. S.; Patnaik, S. Analgesic effect of ethanolic leaf extract of *Moringa oleifera* on albino mice. *Indian Journal of Pain.* **2014**, 28(2), 89.
- Bakre, A. G.; Aderibigbe, A. O.; Ademowo, o. g. studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* **2013**, 149(3), 783-789.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry.* **2006**, 99(1), 191-203.
- Barquero, A. A. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química viva,* **2007**, 6(2).
- Barron, R. M.; García, M. R.; Soto, M. R.; Colinas, T.; Kite, G. flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) yakovlev. *Rev. Fitotec. Mex.* **2011**, 34(3), 151-157.
- Bastidas-Bastidas, E. V.; Asencio-Sojos, G. C. elaboración de una formulación tipo té, a partir de hojas de moringa como ingrediente activo esencial y cascarilla de cacao. Tesis, Universidad Técnica de Machala, septiembre **2017**.
- Bastola, K. P.; Guragain, Y. N.; Bhadriraju, V.; Vadlani, P. V. evaluation of standards and interfering compounds in the determination of phenolics by folin-ciocalteu assay method for effective bioprocessing of biomass. *American Journal of Analytical Chemistry,* **2017**, 8(06), 416.
- Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Foidl, N.; Pratt, J. H.; Dupont, M. S.; Perkins, L.; Kroon, P. A. profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) AND *Moringa stenopetala* L. *Journal of agricultural and food chemistry.* **2003**, 51(12), 3546-3553.
- Bobadilla-Carrillo, G. I., Valdivia-Reynoso, M. G., Machuca-Sánchez, M. L., Balois-Morales, R., & González-Torres, L. Factores precosecha, cosecha y poscosecha inherentes al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). **2016**.
- Bonal, R.; Rivera, R; Bolívar, M. *Moringa oleifera*: una opción saludable para el bienestar. *Medisan.* **2012**, 16 (10), 1596-1599.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. **1976**, 72(1-2), 248-254.

Bramati, L.; Aquilano, F.; Pietta, P. Unfermented rooibos tea: quantitative characterization of flavonoids by HPLC– UV and determination of the total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51(25), 7472-7474.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E; Berset, C. use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *lwt-Food science and Technology*. **1995**, 28(1), 25-30.

Bravo, Laura. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. **1998**, 56(11), 317-333.

Bruneton, Jean. *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*; Zaragoza 2da ed., 2001.

Canett, R.; Arvayo, K.; Ruvalcaba, N. Aspectos tóxicos más relevantes de *moringa oleífera* y sus posibles daños. *Biotecnia*. **2014**, 16(2), 36-43.

Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. *Acta farmacéutica bonaerense*, **2003**, 22(3), 265-279.

Cardero-Reyes, Yusimy; Sarmiento-González, Rodolfo; Selva-Capdesuñer, Ana. Importancia del consumo de hierro y vitamina c para la prevención de anemia ferropénica. *Medisan*. **2009**, 13(6), 1-13.

Charoensin, Suphachai. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2014**, 8(7), 318-325.

Chúa, Carlos. El hierro en la nutrición humana. *Revista del Colegio Médico de Guatemala*. **2014**, 151, 15-18.

Chumark, P.; Khunawat, P.; Sanvarinda, Y.; Phornchirasilp, S.; Phumala, N.; Phivthong, L.; Ratanachamnong, P.; Srisawat, S.; Pongrapeeporn, K. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, 116, 439-446.

Cid-Ortega, S.; Guerrero-Beltrán, J. Propiedades funcionales de la jamaica (*hibiscus sabdariffa* l.). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. **2012**, 6(2), 47-63.

Coz-Bolaños, X.; Campos-Vega, R.; Reynoso-Camacho, R.; Ramos-Gómez, M.; Flavia Loarca-Piña, G.; Guzmán-Maldonado, S. H. Moringa Infusion ( *Moringa Oleifera*) Rich in Phenolic Compounds and High Antioxidant Capacity Attenuate Nitric Oxide pro-Inflammatory Mediator in Vitro. *Ind. Crops Prod*. **2018**, 118, 95–101.

Da-Costa-Rocha, I.; Bonnlaender, B.; Sievers, H.; Pischel, I.; Heinrich, M. *Hibiscus Sabdariffa* L. – A Phytochemical and Pharmacological Review. *Food Chem.* **2014**, *165*, 424–443.

Dahiru, D.; Onubiyi, J. A.; Umaru, H. A. Phytochemical screening and antiulcerogenic effect of *moringa oleifera* aqueous leaf extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* **2006**, *3*(3), 70-75.

Debnath, S.; y Guha, D. Role of *moringa oleifera* on enterochromaffin cell count and serotonin content of experimental ulcer model. *Indian Journal of Experimental Biology.* **2007**, *45*, 726-731.

Doménech, G.; Durango, A.; Ros, G. *Moringa oleifera*: revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* **2017**, *67*(2), 86-97.

Enriquez Flores, A. M.; Prieto Vela, E. P.; De Los Ríos Martínez, E.; Ruiz Reyes, S. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “jengibre” de la ciudad de Chanchamayo-Región Junín-Perú. *Rev. Med. Vallejiana.* **2008**, *5*(1), 50-64.

Fakurazi, S.; Sharifudin, S. A.; Arulselvan, P. *Moringa oleifera* Hydroethanolic extracts effectively alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats through their antioxidant nature. *Molecules.* **2012**, *17*(7), 8334-8350.

Farré Rovira, R. La leche y los productos lácteos: fuentes dietéticas de calcio. *Nutrición Hospitalaria.* **2015**, *31*(2), 1-9

Fennema, O. *Química de los Alimentos (Food Chemistry)*; Editorial Acribia, SA.: Zaragoza, España, 1993.

Formagio, A. S. N.; Ramos, D. D.; Vieira, M. C.; Ramalho, S. R.; Silva, M. M.; Zárata, N. A. H.; Foglio, M. A.; Carvalho, J. E. Phenolic Compounds of *Hibiscus Sabdariffa* and Influence of Organic Residues on Its Antioxidant and Antitumoral Properties. *Braz. J. Biol.* **2015**, *75*(1), 69–76.

Forrellat-Barrios, Mariela. Regulación del metabolismo del hierro: dos sistemas, un mismo objetivo. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* **2016**, *32*(1), 4-14.

Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **1997**, *45*(5), 1523-1540.

Gamboa Gómez, C. I. Efecto del consumo de bebidas funcionales (infusiones) utilizadas en México como alternativa para el control de obesidad y sus complicaciones. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Querétaro, 2014.

- Ghasi, S.; Nwobodo, E.; Ofili, J. O. HYpocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam In high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 69(1), 21-25.
- Glavind, J.; Holmer, G. Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical  $\alpha$ - $\alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1967**, 44(9), 539-542.
- Godino, M.; Villegas, S.; Izquierdo, M.; Velásquez, J.; Vargas, R. evaluación del uso energético de la *Moringa oleifera*. *Agroforestería Neotropical*. **2012**, 2, 48-58.
- González, Laura; Téllez, Alfredo; Sampedro, José; Nájera, Hugo. Las proteínas en la nutrición. *Revista Salud Pública y Nutrición*. **2007**, 8(2), 1-7.
- Granato, D.; Santos, J. S.; Maciel, L. G.; Nunes, D. S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2016**, 80, 266-279.
- 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.). *Revista Ciencia UNEMI*. **2017**, 10(22), 60-68.
- Hdalgo Villatoro, S. G.; Villatoro, S. G. H.; De León Cifuentes Reyes, W. A.; Ruano-Solís, H. H.; Cano-Castillo, L. E. Caracterización de Trece Genotipos de Rosa de Jamaica *Hibiscus Sabdariffa* En Guatemala. *Agronomía Mesoamericana* **2008**, 20(1), 101.
- Hernández, N.; Hernández, C.; Ruiz, V. Elaboración de tamal a base de sorgo blanco (*Sorghum bicolor* l. moench) Y MORINGA (*M. oleifera*) como alimento funcional. *Jóvenes en la Ciencia*. **2017**, 3, 81-84.
- Howard, M.; Ortega, S.; Jaramillo, C.; Campo, M. Diseño de cápsulas como suplemento nutricional de extracto seco de hojas de Moringa oleifera LAM. *Conference Proceedings*. **2018**, 2(2), 140-149.
- Hukkeri, V. I.; Nagathan, C. V.; Karadi, R. V.; Patil, B. S. Antipyretic and wound healing activities of *Moringa oleifera* Lam. IN RATS. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. **2006**, 68(1), 124.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2007). Hierbas aromáticas. Requisitos. NTE INEN 2392:2007.
- Iqbal, S; Bhangar, M. I.; Effect of season and production location on antioxidant activity of *moringa oleifera* leaves grown in pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**, 19, 544-551.



ITIS REPORT. (2018). *Moringa oleifera* Lam, Taxonomic Serial No.: 503874. [Online] [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=503874#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503874#null). (11/05/2018).

Jabeur, I.; Pereira, E.; Barros, L.; Calhelha, R. C.; Soković, M.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, I. C. F. R. *Hibiscus Sabdariffa* L. as a Source of Nutrients, Bioactive Compounds and Colouring Agents. *Food Res. Int.* **2017**, *100* (Pt 1), 717–723.

Jaiswal, D.; Rai, P. K.; Kumar, A.; Mehta, S.; Watal, G. EFFECT OF *Moringa oleifera* Lam. Leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of ethnopharmacology.* **2009**, *123*(3), 392-396.

Jamshidi-Kia, F.; Lorigooini, Z.; Amini-Khoei, H. Medicinal Plants: Past History and Future Perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology* **2018**, *7*(1), 1–7.

Jung, I. Lae. Soluble extract from *moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *Plos one.* **2014**, *9*(4), e95492.

Khaghani, S.; Razi, F.; Yajloo, M. M.; Paknejad, M.; Shariftabrizi, A.; Pasalar, P. Selective Cytotoxicity and Apoptogenic Activity of *Hibiscus Sabdariffa* Aqueous Extract Against MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *J. Cancer Ther.* **2011**, *02* (03), 394–400.

Kirman, M. Z. Determination of some toxic and essential trace metals in some medicinal and edible plants of karachi city. *Journal of Basic & Applied Sciences.* **2011**, *7*(2).

Konczak, I., & Zhang, W. Anthocyanins-more than nature's colours. *BioMed Research International.* **2004**, *2004*(5), 239-240.

Lamou, Bonoy; Sotoing Taiwe, Germain; Hamadou, André; Abene; Houlray, Justin; Mey Atour, Mahamat; Vernyuy Tan, Paul. Antioxidant and antifatigue properties of the aqueous extract of *moringa oleifera* in rats subjected to forced swimming endurance test. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2016**, 1-9.

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*(6), 12791-12835.

Lester, G. E.; Lewers, K. S.; Medina, M. B.; Saftner, R. A. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis.* **2012**, *27*(1), 102-107.

Liñán T., F. *Moringa oleifera* El árbol de la nutrición. *Ciencia y Salud virtual.* **2010**, *2*(1), 130-138.

- Ludwig, I. A.; Bravo, J.; De Peña, M. P.; & Cid, C. Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. *LWT-Food Science and Technology*. **2013**, *51*(2), 553-559.
- Luqman, S.; Srivastava, S.; Kumar, R.; Maurya, A. K.; Chanda, D. Experimental assessment of *moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using in vitro and in vivo assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2011**, 2012, 1-12.
- Madi, N.; Dany, M.; Abdoun, S.; Usta, J. *Moringa oleifera's* Nutritious aqueous leaf extract has anticancerous effects by compromising mitochondrial viability in an ROS-dependent manner. *Journal of the American College of Nutrition*. **2016**, *35*(7), 604-613.
- Magalhães, L. M.; Santos, F.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of folin-ciocalteu reducing capacity. *Talanta*. **2010**, *83*(2), 441-447.
- Magaña B., W. Aprovechamiento poscosecha de la moringa (*Moringa oleifera*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. **2012**, *13*(2), 171 – 174.
- Mahmood, K.; Mugal, T.; Haq I. *Moringa Oleifera*: A natural gift-a review. *Pharm. Sci. & Res.* **2010**, *2*(11), 775-781.
- Makita, C.; Chimuka, L.; Steenkamp, P.; Cukrowska, E.; Madala, E. Comparative Analyses of Flavonoid Content in *Moringa Oleifera* and *Moringa Ovalifolia* with the Aid of UHPLC-qTOF-MS Fingerprinting. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, *105*, 116–122.
- Mallya, Roopashree; Kumar, Pratik; Vinodini, N. A.; Chatterjee, Poulomi; Mithra, Prasanna. *Moringa oleifera* Leaf extract: beneficial effects on cadmium induced toxicities - a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. **2017**, *11*(4), 1-4.
- Manaheji, H.; Jafari, S.; Zaringhalam, J.; Rezazadeh, S.; Taghizadfarid, R. Analgesic effects of methanolic extracts of the leaf or root of *Moringa oleifera* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Chinese integrative medicine*. **2011**, *9*(2), 216-222.
- Margraf, T.; Karnopp, A. R.; Rosso, N. D.; Granato, D. Comparison between folin-ciocalteu and prussian blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. *Journal of food science*. **2015**, *80*(11), C2397-C2403.
- Márquez, I.; Bastidas, T.; Fernández, G., Campo, M.; Jaramillo, G.; Rojas, L. Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie *Moringa oleifera* Lam cosechada en machala. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **2017**, *22*(1), 1-13.

- Marrero, D. D.; Vicente, M. R.; González C. V.; Gutiérrez A. J. Composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de *Moringa oleífera* que crece en la habana, cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **2014**, 19(2), 197-204.
- Marston, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218(19), 2676-2683.
- Martín, C.; Martín, G.; García, A.; Fernández, T.; Hernández, E.; Puls, J. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleífera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. **2013**, 36(2), 137-149.
- Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. **2012**, 17(6), 271-278.
- Masike, K.; Khoza, B. S.; Steenkamp, P. A.; Smit, E.; Dubery, I. A.; Madala, N. E. A Metabolomics-Guided Exploration of the Phytochemical Constituents of *Vernonia fastigiata* with the Aid of Pressurized Hot Water Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecules*. **2017**, 22 (8).
- Matos, A.; Capote, I.; Pérez, A.; Lezcano, Y.; Aragón, C.; Pina, D.; Vives, K.; Daquinta M.; Escalona M. Propagación in vitro de cultivares de *Moringa oleífera* Lam. *Cultivos Tropicales*. **2016**, 37, 49-56.
- McKay, D. L.; Chen, C.-Y. O.; Saltzman, E.; Blumberg, J. B. Hibiscus Sabdariffa L. Tea (tisane) Lowers Blood Pressure in Prehypertensive and Mildly Hypertensive Adults. *J. Nutr.* **2010**, 140 (2), 298–303.
- Miranda, M.; Cuéllar, A. Farmacognosia y productos naturales. *La Habana: Editorial Félix Varela*. **2000**, 141.
- Mohd, N.; Hern, F.; Ismail, A.; Yee, C. Antioxidant activity in different parts of roselle (*hibiscus sabdariffa* l.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*. **2010**, 122, 1055-1060.
- Moyo, B.; Masika, P. J.; Hugo, A.; Muchenje, V. Nutritional characterization of moringa (*moringa oleífera* lam.) LEAVES. *African Journal of Biotechnology*. **2011**, 10(60), 12925-12933.
- Muñoz, E.; Rivas, K; Loarca, M.; Mendoza, S.; Reynoso, R.; Ramos, M. Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. **2012**, 3(3), 481-495.
- Muñoz-Bernal, Ó. A.; Torres-Aguirre, G. A.; Núñez-Gastélum, J. A.; de la Rosa, L. A.; Rodrigo-García, J.; Ayala-Zavala, J. F.; Álvarez-Parrilla, E. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de folin-ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de

polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **2017**, 20(2), 23-28.

Nnam, N. M.; Onyeke, N. G. Chemical Composition of Two Varieties of Sorrel (*Hibiscus Sabdariffa* L.), Calyces and the Drinks Made from Them. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2003**, 58 (3), 1–7.

Nweze, Nkechinyere; Nwafor, Felix. Phytochemical, proximate and mineral composition of leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. From Nsukka, South-eastern Nigeria. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. **2014**, 9, 99-103.

Okiki, P. A., Osibote, I. A., Balogun, O., Oyinloye, B. E., Idris, O. O., Adelegan, O., ... & Olagbemide, P. T. Evaluation of Proximate, Minerals, Vitamins and Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Ado Ekiti, Nigeria. *Advances in Biological Research*. **2015**, 9(6), 436-443.

Olivares, Manuel; Walter, Tomás. Consecuencias de la deficiencia de hierro. *Rev. chil. nutr.* **2003**, 30(3).

Omodanisi, Elizabeth; Aboua, Yapo; Oguntibeju, Oluwafemi. Assessment of the anti-hyperglycaemic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Moringa Oleifera* in diabetes-induced nephrotoxic male wistar rats. *Molecules*. **2017**, 22, 439.

Onyenekwe, P.; Ajani, E. O.; Ameh, D. A.; Gamaniel, K. S. Antihypertensive effect of roselle (hibiscus sabdariffa) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in wistar rats. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*. **1999**, 17(3), 199-206.

Otegui, A. U.; Sanz, J. M. M.; Minuesa, P. G. Intervención dietético-nutricional en la prevención de la deficiencia de hierro. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. **2010**, 30(3), 27-41.

Pace, C. R.; Hahn, S.; Diamandis, E. P.; Soleas, G.; Goldberg, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica chimica acta*. **1995**, 235(2), 207-219.

Padilla S., F.; Cruz B., J. Extractos de hojas de *moringa oleífera* en la prevención y tratamiento de la diabetes mellitus. *Rev Cubana de Medicina Natural y Tradicional*. **2016**, 1(2).

Padilla, C.; Fraga, N.; Scull, I.; Tuero, R.; Sarduy, L. Efecto de la altura de corte en indicadores de la producción de forraje de *Moringa oleifera* vc. Plain. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. **2014**, 48(4), 405-409.

- Panda, S.; Kar, A.; Sharma, P.; Sharma, A. Cardioprotective potential of N,  $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl vincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: In vivo and in vitro studies. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. **2013**, 23(4), 959-962.
- Pari, L.; Kumar, N. A. Hepatoprotective activity of *moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats. *Journal of Medicinal Food*. **2002**, 5(3), 171-177.
- Patel, P.; Patel, N.; Patel, D.; Desai, S.; Meshram, D. phytochemical analysis and antifungal activity of *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **2014**, 6(5), 144-147.
- Paula, P. C.; Sousa, D. O.; Oliveira, J. T.; Carvalho, A. F.; Alves, B. G.; Pereira, M. L.; Farias, D. F.; Viana, M. P.; Santos, F. A.; Morais, T. C.; Vasconcelos, I. M. A protein isolate from *Moringa oleifera* leaves has hypoglycemic and antioxidant effects in alloxan-induced diabetic mice. *Molecules*. **2017**, 22(2), 271.
- Pérez, A.; Sánchez, T.; Armengol, N.; Reyes, F. Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark. una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y forrajes*. **2010**, 33(4), 1-10.
- Price, M. L. The moringa tree. *Echo technical note*. **2007**, 1-16.
- Prieto Méndez, J.; González Ramírez, C.; Román Gutiérrez, A.; Prieto García, F. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. **2009**, 10(1).
- Proestos, C., Komaitis, M. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. *Journal of food quality*. **2006**, 29(5), 567-582.
- Promkun, C.; Kupradinun, P.; Tuntipopipat, S.; Butryee, C. Nutritive evaluation and effect of *moringa oleifera* pod on clastogenic potential in the mouse. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **2010**, 11(3), 627-632.
- Puerto, M.; Arece, J.; López, Y.; Roche, Y. Molina, M.; Argemiro Sanavria, A.; Da Fonseca, A. Efecto in vitro de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de estrógenos gastrointestinales de ovinos. *Rev. Salud Anim*. **2014**, 36(1), 28-34.
- Raclariu, A. C.; Heinrich, M.; Ichim, M. C.; de Boer, H. Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochem. Anal*. **2018**, 29(2), 123–128.
- Reyes-Luengas, A.; Salinas-Moreno, Y.; Ovando-Cruz, M. E.; Arteaga-Garibay, R. I.; & Martínez-Peña, M. D. Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos

acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*. **2015**, 49(3), 277-290.

Reyes, N.; Mendieta, B. Guía para el establecimiento y cultivo del marango (*Moringa oleifera*) [Online]. Universidad Nacional Agraria: Nicaragua, **2017**.

Riaz, G.; Chopra, R. A Review on Phytochemistry and Therapeutic Uses of Hibiscus Sabdariffa L. *Biomed. Pharmacother*. **2018**, 102, 575–586.

Rodríguez-Medina, I. C.; Beltrán-Debón, R.; Molina, V. M.; Alonso-Villaverde, C.; Joven, J.; Menéndez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Direct Characterization of Aqueous Extract of *Hibiscus Sabdariffa* Using HPLC with Diode Array Detection Coupled to ESI and Ion Trap MS. *J. Sep. Sci*. **2009**, 32 (20), 3441–3448.

Rodríguez-Pérez, C.; Quirantes-Piné, R.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Optimization of Extraction Method to Obtain a Phenolic Compounds-Rich Extract from *Moringa Oleifera* Lam Leaves. *Ind. Crops Prod*. **2015**, 66, 246–254.

Salinas, Y.; Zúñiga, A.; Serrano, V.; Sánchez, C. Color en cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. **2012** 18(3), 395-407.

Saraf, A.; Samant, A. Evaluation of some minerals and trace elements in *Achyranthes aspera* Linn. *International Journal of Pharma Sciences*. **2013**, 3(3), 229-233.

Sarwar, M. Biodiversity and conservation of *Moringa* species. *Journal of Biodiversity and Conservation*. **2017**, 1(1), 5-8.

Sáyago-Ayerdi, S.; Goñi, I. *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. **2010**, 60(1), 79-84.

Seck, S. M.; Doupa, D.; Dia, D. G.; Diop, E. A.; Ardiet, D.L.; Nogueira, R. C.; Graz, B.; Diouf, B. Clinical Efficacy of African Traditional Medicines in Hypertension: A Randomized Controlled Trial with *Combretum micranthum* and *Hibiscus sabdariffa*. *J. Hum. Hypertens*. **2017**, 32(1), 75–81.

Sharma, Veena; Paliwal, Ritu. 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), 215-28.

Sheikh, A.; Yeasmin, F.; Agarwal, S.; Rahman, M.; Islam, K.; Hossain, E.; Karim, R.; Nikkon, F.; Saud, A.; Hossain, K. (2014). Protective effects of *Moringa oleifera* Lam. leaves against arsenic-induced toxicity in mice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. **2014**, 4, S353-S358.

Shipp J. y Abdel-Aal S. M. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*. **2010**, 4, 7-22.

Siddhuraju, P.; Becker, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) LEAVES. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2144-2155.

Singh, B. N.; Singh, B. R.; Singh, R. L.; Prakash, D.; Dhakarey, R.; Upadhyay, G.; Singh, H. B. Oxidative dna damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*. **2009**, 47(6), 1109-1116.

Singh, D.; Arya, P. V.; Aggarwal, V. P.; Gupta, R. S. Evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Antioxidants*. **2014**, 3(3), 569-591.

Singleton, Vernon; Orthofer, Rudolf; Lamuela, Rosa. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. **1999**, 299, 152-178.

Sreelatha, S.; Jeyachitra, A.; Padma, P. R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2011**, 49(6), 1270-1275.

Sreelatha, S.; Padma, P. R. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa Oleifera* Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2009**, 64 (4), 303–311.

Sudha, P.; Asdaq, S. M.; Dhamingi, S. S.; Chandrakala, G. K. Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *moringa oleifera* in animals. *Indian J Physiol Pharmacol.* **2010**, 54(2), 133-140.

Sulaiman, M. R.; Zakaria, Z. A.; Bujarimin, A. S.; Somchit, M. N.; Israf, D. A.; Moin, S. Evaluation of *moringa oleifera* aqueous extract for antinociceptive and anti-inflammatory activities in animal models. *Pharmaceutical biology*. **2008**, 46(12), 838-845.

Tazoho, G. M.; Gouado, I.; Ndomou, M.; Bonsi, S. T.; Wamba, Y. M.; Agbor, E. E. Clinical, Hematological and Biochemical Health Benefit Effects of *Hibiscus Sabdariffa* Lin Dried Calyces Beverage in Human. *Food Nutr. Sci.* **2016**, 07 (05), 383–395.

Tesfay, S. Z.; Bertling, I.; Odindo, A. O.; Workneh, T. S.; Mathaba, N. Levels of anti-oxidants in different parts of moringa (*Moringa oleifera*) seedling. *African Journal of Agricultural Research*. **2011**, 6(22), 5123-5132.

Thilza, I. B.; Sanni, S.; Zakari, A. I.; Sanni, F. S.; Muhammed, T.; Musa, B. J. In vitro antimicrobial activity of water extract of *moringa oleifera* leaf stalk on bacteria normally implicated in eye diseases. *Academia arena*. **2010**, 2(6), 80-82.

- Thomas, M. J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*. **2000**, 16(7), 716-718.
- Tokalioğlu, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by icp-ms and multivariate analysis. *Food Chemistry*. **2012**, 134(4), 2504-2508.
- Urdampilleta, A.; Martínez, J.; González, P. Intervención dietético-nutricional en la prevención de la deficiencia de hierro. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. **2010**, 30(3), 27-41.
- Usoh, I. F.; Akpan, E. J.; Etim, E. O; Farombi, E. O. Antioxidant actions of dried flower extracts of *hibiscus sabdariffa* l. on sodium arsenite - induced oxidative stress in rats. *Pakistan Journal of Nutrition*. **2005**, 4(3), 135-141.
- Velázquez Z., M.; Peón E., I.; Zepeda B., R.; Jiménez A., M. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): Potential uses in agriculture, industry and medicine. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. **2017**, 22 (2), 95-116.
- Vermani, A.; Navneet, P.; Chauhan, A. Physico-chemical analysis of ash of some medicinal plants growing in uttarakhand, india. *Nature and Science*. **2010**, 8(6), 88-91.
- Viada Pupo, Esther; Gómez Robles, Esther; Campaña Marrero, Ibel. Estrés oxidativo. *CCM*. **2017**, 21(1).
- Villarreal, A.; Ortega, K. Revisión de las características y usos de la planta *Moringa oleifera*. *Revista Investigación & Desarrollo*. **2014**, 22(2), 309-330.
- Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*. **2001**, 8(3), 303-313.
- Vinoth, B.; Manivasagaperumal, R.; Balamurugan, S. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Moringa oleifera* Lam. *International Journal of Research in Biological Sciences*. **2012**, 2(3), 98-102.
- Vongsak, B.; Sithisarn, P.; Mangmool, S.; Thongpraditchote, S.; Wongkrajang, Y.; Gritsanapan, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 44, 566-571.
- Waksmundzka-Hajnos, Monika; Kowalska, Teresa; Sherma, Joseph. Thin layer chromatography in phytochemistry. *CRC Press*, **2008**.
- Waterman, C.; Cheng, D. M.; Rojas, P.; Poulev, A.; Dreifus, J.; Lila, M. A.; Raskin, I. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. *Phytochemistry*, **2014**, 103, 114-122.



Williamson, E.; Driver, S.; Baxter, K. (Eds.). *Stockley's herbal medicines interactions*. Pharmaceutical Press: London, 2013.

Yu-ri, Kwon; Kwang-Sup, You. Antioxidant activity and physiological properties of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves extracts with different solvents. *Korean Journal of Food Preservation*. **2014**, 21, 831-837.