

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y  
FENOLES TOTALES DURANTE LA DIGESTIÓN *IN VITRO* DE  
PRODUCTOS A BASE DE *MORINGA OLEIFERA*”.**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Septiembre – 2018**

**Autor:** Gema De Haro Flores

**Tutores:** Francisco Burló Carbonell

Marina Cano Lamadrid



## TÍTULO:

“Evaluación de la capacidad antioxidante y fenoles totales durante la digestión *in vitro* de productos a base de *Moringa oleifera*”.

“Evaluation of the antioxidant capacity and total phenols during *the in vitro* digestion of products based on *Moringa oleifera*”.

## RESUMEN:

Recientemente, se han enumerado una gran cantidad de propiedades funcionales y nutricionales del árbol *Moringa oleifera*, entre las que destacan su elevada calidad proteica, compuestos fenólicos y minerales, dependiendo de la parte de la planta en la que se centre el estudio (hojas, semillas, embrión, vaina). El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la capacidad antioxidante (ensayos DPPH, FRAP y ABTS<sup>+</sup>) y del contenido de fenoles totales (método Folin) de diferentes productos comerciales a base de *Moringa oleifera* (infusiones, cápsulas, hojas en polvo y semilla) durante la digestión *in vitro* (fases oral, digestiva e intestinal). Además, se realizará un seguimiento de los azúcares y ácidos orgánicos durante toda la simulación de digestión humana.

**Palabras clave:** *Moringa oleifera* Lam; digestión *In vitro*; capacidad antioxidante; azúcares; ácidos orgánicos.

## ABSTRACT:

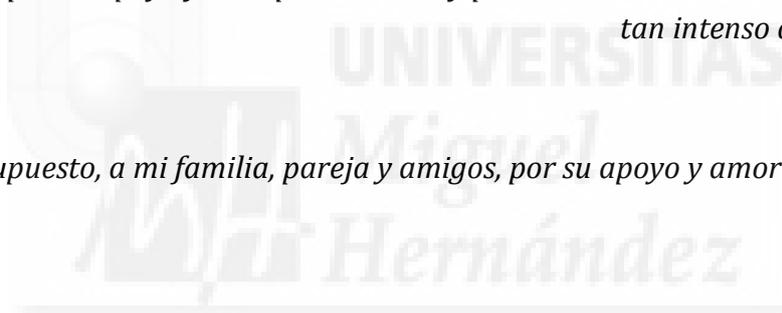
Recently, a large number of functional and nutritional properties of the *Moringa oleifera* tree have been enumerated, among them its high protein quality, phenolic compounds and minerals, depending on the part of the plant in which the study was focus on (leaves, seeds, embryo, sheath). The objective of the present work was the evaluation of the antioxidant capacity (DPPH, FRAP and ABTS<sup>+</sup> assays) and the content of total phenols (Folin method) of different commercial products based on *Moringa oleifera* (infusions, capsules, powdered leaves and seed) during digestion *in vitro* (oral, digestive and intestinal phases). In addition, the sugars and organic acids are monitored throughout the simulation of human digestion.

**Keywords:** *Moringa oleifera* Lam; *in vitro* digestion; antioxidants; sugars; organic acids.

*Gracias a Paco, por haber aceptado ser mi tutor y haberme dejado realizar este trabajo dentro de su grupo de investigación.*

*A Marina, por su apoyo y tiempo dedicado, y por enseñarme tanto durante ese mes tan intenso de laboratorio.*

*Y por supuesto, a mi familia, pareja y amigos, por su apoyo y amor incondicional.*



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1. Cultivo de la Moringa.....	7
1.1.1. Origen.....	7
1.1.2. Descripción botánica y taxonómica.....	9
1.1.3. Variedades de <i>Moringa oleifera</i> .....	11
1.1.4. Aplicaciones de <i>Moringa oleifera</i> .....	12
1.1.5. Producción mundial.....	13
1.1.6. Productos a base de moringa.....	14
1.2. Valor nutricional.....	16
1.3. Valor funcional.....	18
1.3.1. Aminoácidos.....	18
1.3.2. Compuestos fenólicos.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Material vegetal.....	23
3.2. Extracción.....	24
3.2.1. Extracción de polifenoles.....	24
3.2.2. Extracción de ácidos orgánicos y azúcares.....	25
3.3. Determinaciones de capacidad antioxidante.....	26
3.3.1 Método DPPH.....	26
3.3.2 Método ABTS <sup>+</sup> .....	28
3.3.3 Método FRAP.....	29
3.3.4. Determinación de fenoles totales.....	31
3.4. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares por HPLC.....	33
3.5. Digestión <i>in vitro</i> .....	33
3.6. Análisis estadístico.....	39
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	53

# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1. Cultivo de la Moringa

### 1.1.1. Origen

*Moringa oleifera* Lam. (syn. *pterygosperma* Gaertn) (Figura 1) también conocida como Moringa o Marango, es la especie más conocida y extendida de la familia *Moringaceae* (R. K. Saini, Sivanesan, & Keum, 2016)



**Figura 1.** Árboles de *Moringa oleifera*.

La moringa es un cultivo originario del norte de la India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán. Actualmente, se cultiva ampliamente en África oriental, occidental y austral (Etiopía y Sudán), Asia tropical (India, Filipinas y Pakistán), América Latina, el Caribe, Florida y las islas del Pacífico (Figura 2). (FAO)



**Figura 2.** Distribución mundial de *M. oleifera* (Fuente: Trees for life).

En algunos lugares del mundo la moringa es conocida con varias denominaciones: *i*) “palo de tambor” debido a la forma de sus vainas; *ii*) “el árbol del rábano picante”, por el sabor de sus raíces y qué los británicos utilizaban en la India como sustituto del rábano silvestre; y, *iii*) “el mejor amigo de mamá”, en África, ya que sus habitantes conocen y aprecian el gran valor que representa este árbol. (G. Folkard & Sutherland, 1996)

En las últimas dos décadas este cultivo se ha defendido por su excelente fuente de nutrientes esenciales (proteínas, hierro, calcio, vitaminas, carotenoides y otros fitoquímicos). Por lo que, debido a las propiedades nutricionales mencionadas anteriormente y muchas otras que comentaremos más adelante, la moringa tiene la capacidad de suplir los requerimientos de micronutrientes necesarios en una dieta saludable, lo que hace de ella una alternativa útil para combatir la inseguridad alimentaria (inaccesibilidad de la cantidad de alimentos suficientes para su desarrollo y para poder llevar una vida activa y sana).

Cabe destacar que las zonas donde la moringa se localiza actualmente, coinciden con áreas donde la desnutrición afecta especialmente (Figura 3), por lo que este árbol puede desempeñar un papel importante en la nutrición humana.



**Figura 3.** Países con población desnutrida (Fuente: ONG Trees for life).

### 1.1.2. Descripción botánica y taxonómica

Según “Angiosperm Phylogeny Group” (Stevens, 2017) basándose en criterios filogenéticos, la moringa (Figura 4) se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

**Clase:** *Eudicotyledoneae* Doyle y Hotton, 1991

**Subclase:** *Magnoliidae* Novák ex Takht., 1967

**Superorden:** *Malvidae* W.S. Judd, D.E. Soltis & P.S. Soltis., 2007

**Orden:** *Brassicales* Bromhead, 1838

**Familia:** *Moringaceae* Martynov, 1820

**Género:** *Moringa* Adans., 1763

**Especie:** *Moringa oleifera* Lam., 1785



**Figura 4.** Ilustración *M. oleifera*

La familia *Moringaceae* pertenece a un pequeño grupo dentro del orden *Brassicales*, donde se encuentran especies como el rábano, la col o las alcaparras.

El género *Moringa* pertenece a la familia monogénero de las *Moringaceae*. La familia incluye 13 especies conocidas de árboles y arbustos de hojas alternas, caducas, imparipinnadas, con folíolos opuestos y enteros; las flores presentan cinco sépalos desiguales, y cinco pétalos blancos, los dos superiores más pequeños; además presentan frutos en cápsula, trivalvados (Figura 5); y semillas aladas.



**Figura 5.** Flores de *M. Oleifera*

La moringa es un árbol de crecimiento rápido, resistente y con gran facilidad de propagación; puede crecer hasta 4,5 metros en el primer año tras la siembra y en condiciones favorables puede alcanzar una altura de 6-15 metros, con un promedio de vida de 20 años. Este cultivo es capaz de crecer en condiciones áridas, con bajos requerimientos de nutrientes y agua, es por ello la viabilidad en suelos empobrecidos y marginales. (Orwa, 2009)

Las especies del género moringa fueron clasificadas en tres grandes grupos (Olson, 2001), según su forma de vida, sus caracteres morfológicos y su área de distribución:

🌿 **“Bottle trees (árboles botella):** formado por cuatro especies procedentes de África y Madagascar, *Moringa drouhardii* Jum., *Moringa hildebrandtii* Engl., *Moringa ovalifolia* Dinter ex Berger y *Moringa stenopetala* (Baker f.) Cufodontis. Se caracterizan por poseer troncos gruesos y flores con simetría radial.

🌿 **“Slender trees” (árboles esbeltos):** en este grupo predominan las fibras libriformes en las raíces, y las flores con simetría bilateral. Las especies que lo forman son *Moringa oleifera*, *Moringa concanensis* Nimm. y *Moringa peregrina* Forssk. Ex Fiori.

🌿 **“Sarcorrhizal trees” y “Tuberous shrubs” (arbustos tuberosos):** el grupo de los arbustos tuberosos muestran una homogeneidad dentro de la estructura anatómica y está formado por las especies *Moringa borziana* Matt., *Moringa longituba* Engl., *Moringa pygmaea* Verd. y *Moringa rivae* Chiov. Las dos especies de “Sarcorrhizal trees” son *Moringa arborea* Verd. y *Moringa ruspoliana* Engl., ambas muestran diferencias anatómicas entre ellas, a pesar de su similitud en la forma de vida; ambas especies se suelen incluir dentro del grupo de los arbustos tuberosos.

### 1.1.3. Variedades de *Moringa oleifera*

Las variedades perennes tienen varios inconvenientes en cuanto a la producción, y a la vulnerabilidad a plagas y enfermedades; por lo que la necesidad de solventar estos problemas, llevó a varios científicos a desarrollar variedades con mayor rendimiento, con tal de adaptar dichas variedades a diferentes suelos y condiciones climáticas.

A continuación se describen las diferentes variedades de *Moringa oleifera*: (Lalas, 2002) (Arias, 2014)

#### **Variedad PKM-1**

Se caracteriza por ser una variedad de pequeña o mediana estatura, que se propaga por semilla. Esta variedad fue desarrollada mediante una selección de genotipos locales para optimizar la producción de vainas. Las vainas alcanzan los 60-70 cm de largo, unos 6,3 cm de grosor y un peso aproximado de 120 g. Esta variedad produce de 220 a 250 frutos por árbol con un rendimiento de 50-54 toneladas por hectárea.

#### **Variedad PKM-2**

Variedad híbrida de estatura media, que se propaga fácilmente por semilla. Las vainas son más grandes que la variedad PKM-1, alcanzando los 126 cm, un grosor de 8,40 cm y un peso aproximado de 280 g. Produce una media de 240 frutos por árbol, con un rendimiento de 98 toneladas por hectárea.

#### **Variedad Coimbatore-1**

Esta variedad se caracteriza por el aumento de crecimiento de las vainas y su calidad. Las vainas son más pequeñas que las anteriores variedades, con una longitud de 45-60 cm y un peso de 60-70 g. Cada árbol puede producir unas 400-600 vainas por año.

#### **Variedad Coimbatore-2**

La vaina de esta variedad es más pequeña que la anterior, con una longitud de 25-

35 cm. Cada árbol puede producir de 250 a 375 vainas por año.

### **Variedad Rohit**

Variedad lograda mediante selección progresiva de semillas de moringa. Las vainas son de color verde oscuro, de unos 45-60 cm de longitud. Suele producir de 40 a 135 vainas al año.

#### **1.1.4. Aplicaciones de *Moringa oleifera***

Actualmente, son varios los estudios que se están llevando a cabo acerca de la fortificación de alimentos básicos como el pan, las galletas, el yogur o incluso el queso, mediante la hoja, y la semilla de *Moringa oleifera*, y cuyo objetivo es mejorar el valor nutricional de dichos alimentos. (Oyeyinka, 2018)

En muchas partes del mundo, el uso de *Moringa oleifera* va en aumento, utilizando sus diferentes partes en aplicaciones alimentarias. Por ejemplo, las hojas frescas y secas de este cultivo se incluyen en comidas de diferentes países africanos como Ghana, Nigeria, o Etiopía. (Agbogidi, 2012)

Otros estudios mostraron que este cultivo podría encontrar aplicaciones en la industria ganadera, mejorando la calidad de la carne en términos de composición química, color y estabilidad lipídica. (Nkukwana, 2014) (Qwele, 2013)

En el ámbito de la medicina, ha resaltado por su papel contra la triada de la diabetes, por el papel hipoglucemiante, frente a la hipertensión arterial y dislipemia (Mbikay, 2012). En la dislipemia, se observó un descenso del colesterol plasmático gracias al b-sitosterol presente en las hojas de moringa (Ghasi, 2000).

Las diferentes partes del árbol *Moringa oleifera* (raíces, hojas, flores, semillas) se usan tradicionalmente en diversas aplicaciones terapéuticas, que incluyen tumores abdominales, escorbuto, problemas de próstata, y otras infecciones de la piel (Farooq, 2012).

El aceite de semilla de moringa, también conocido como “aceite de Ben”, se utilizada en la producción de biodiesel, debido al alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados en forma de ácido oleico (C18:1) (Azam, 2005).

Desde hace muchos años los investigadores han estado examinando el potencial de la semilla de *M. oleifera* en el tratamiento de aguas. Sus investigaciones muestran que dicha semilla triturada, un coagulante natural, podría ser una alternativa para reemplazar parcial o completamente el alumbre (sulfato de aluminio) y los demás productos químicos utilizados en el tratamiento de aguas (G. Folkard, Sutherland, J., 1996).

Se investigó la eficacia terapéutica de la administración oral de polvo de semilla de *Moringa oleifera*, después de la exposición al arsénico en ratas. La suplementación de estos animales con *Moringa oleifera*, mostró una reducción marginal pero significativa de la cantidad de arsénico en sangre, una recuperación en la actividad ALAD (ácido 5-aminolevulínico), y se restableció los niveles de GSH (glutación) y ROS (especies de oxígeno reactivo) en la sangre. Los resultados obtenidos en el estudio llevan a concluir que la administración posterior a la exposición al arsénico con la semilla en polvo de moringa tiene un papel importante en la protección de los animales frente al estrés oxidativo inducido por el arsénico (Gupta, 2005).

### 1.1.5. Producción mundial

Actualmente, la información sobre producción, rendimiento y/o exportación mundial de *Moringa oleifera* en fuentes oficiales como FAOSTAT (habitual herramienta para conocer estos datos de un gran número de cultivos) está limitada. Recientemente, algunos autores indicaron que India (Figura 6) es el mayor productor de moringa (principalmente de vainas), con una producción anual promedio de 1,2 millones de toneladas en un área de 38.000 ha. Entre los diferentes estados indios, Andhra Pradesh es el mayor productor tanto en área (15665 ha) como en producción, seguido de Karnataka (10280 ha) y Tamil Nadu (7408 ha). (Patel, 2010)



Figura 6. Mapa de la India.

### 1.1.6. Productos a base de moringa

En los últimos años se han introducido en el mercado una gran variedad de productos fabricados a partir de *Moringa oleifera*, como de sus diferentes partes. El producto más comercializado de *Moringa oleifera* es sin duda los suplementos nutricionales en forma de cápsulas a base de la hoja. Además, también podemos observar productos como el aceite de moringa tanto para uso culinario, como integrado en productos cosméticos. Actualmente, hay diversos productos a base de este cultivo que están siendo comercializados por diferentes empresas en el mundo, algunos de ellos podemos observarlos en la siguiente tabla (Tabla 1).

**Tabla 1.** Productos elaborados y/o enriquecidos a base de moringa consumidos a nivel mundial.

Empresa	Descripción	Producto
<p><b>Moringa Vitalmor, España</b></p>	<p>Productores y distribuidores de Moringa en Europa</p>	<p><b>Moringa ecológica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li> Cápsulas</li> <li> Polvo</li> <li> Hoja</li> <li> Semillas</li> <li> Infusiones</li> <li> Cerveza</li> <li> Suplementos para mascotas</li> <li> Sopa de Moringa</li> </ul>
		

**Stevia Premium,  
España**

Productores y distribuidores de  
Moringa en Europa

**Moringa ecológica:**

-  Cápsulas
-  Hoja
-  Polvo
-  Jabón
-  Infusiones



**Floralp's-Ens,  
España**

Productores y distribuidores de  
Moringa en Europa

**Moringa ecológica:**

-  Cápsulas
-  Polvo
-  Infusiones



**Kuli Kuli,  
Estados Unidos**

Productores y distribuidores de  
Moringa en América

-  Té
-  Barritas
-  Bebida energética



**Moringafarm;  
Alemania**

Productores y distribuidores de  
Moringa en Europa

**Moringa ecológica:**

-  Cápsulas
-  Semillas
-  Polvo
-  Té
-  Aceite
-  Especies



## 1.2. Valor nutricional

El árbol *Moringa oleifera* se caracteriza por ser una planta rica en varios nutrientes, como proteínas, fibra y minerales que desempeñan un papel importante en la nutrición humana (Jongrungruangchok, 2010).

El valor nutricional que desempeña este cultivo es especialmente importante en áreas donde la seguridad alimentaria se puede ver amenazada por períodos de sequía, ya que las hojas de moringa pueden cosecharse durante las épocas secas, cuando no hay disponibles otros vegetales (FAO).

Las hojas de *M. oleifera* presentan cantidades significativas de vitamina A, C y E, además de diferentes minerales como calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso y cobre (Hekmat, 2015).

Es importante mencionar que las hojas de este cultivo se establecen como una rica fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-3 y omega-6, en forma de ácido  $\alpha$ -linolénico y ácido linoleico. Además, el ácido palmítico se registra como el principal ácido graso saturado presente en las hojas de *M. oleifera*. Por otro lado, las vainas y flores inmaduras, se caracterizan por tener bajo contenido de ácidos grasos saturados y un alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) (R. Saini, Shetty, N., Giridhar, P., 2014b).

Se ha encontrado que las hojas frescas de *M. oleifera* presentan cantidades significativas de carotenoides, tales como trans-luteína, trans-b-caroteno y trans-zeaxantina; además de cantidades relativamente altas de ácido ascórbico y tocoferoles (R. Saini, Shetty, N., Giridhar, P., 2014a).

Muchos de los beneficios nutricionales anteriormente mencionados de *M. Oleifera* sugieren que esta planta puede servir como un ingrediente funcional en los alimentos y las industrias aliadas.

**Tabla 2.** Composición nutricional de *Moringa oleifera* por 100g.

<b>Composición nutricional</b>			
	<b>Vainas</b>	<b>Hojas</b>	<b>Polvo moringa</b>
Valor energético	37 Kcal	64 Kcal	350 Kcal
Grasas totales	0,20 g	1,40 g	0,50 g
Hidratos de carbono	8,53 g	8,28 g	50 g
Fibra	3,2 g	2,0 g	30 g
Proteínas	2,10 g	9,40 g	30 g

(Fuente: USDA, National Nutrient Data Base)

**Tabla 3.** Composición nutricional de micronutrientes (vitaminas y minerales) de *Moringa oleifera* por 100g.

Vitaminas			Minerales		
Compuesto	Vainas	Hojas	Elemento	Vainas	Hojas
Vitamina C	141,0 mg	51,7 mg	Calcio, Ca	30 mg	185 mg
Tiamina	0,053 mg	0,257 mg	Hierro, Fe	0,36 mg	4,00 mg
Riboflavina	0,074 mg	0,660 mg	Magnesio, Mg	45 mg	42 mg
Niacina	0,620 mg	2,220 mg	Fósforo, P	50 mg	112 mg
Vitamina B5	0,794 mg	0,125 mg	Potasio, K	461 mg	337 mg
Vitamina B6	0,120 mg	1,200 mg	Sodio, Na	42 mg	9 mg
Folato	44 µg	40 µg	Zinc, Zn	0,45 mg	0,60 mg
Vitamina B12	0,00 µg	0,00 µg	Cobre, Cu	0,084 mg	0,105 mg
Vitamina A	74 UI	7564 UI	Manganeso, Mn	0,259 mg	1,063 mg
Vitamina D	0,0 µg	0,0 µg	Selenio, Se	0,7 µg	0,9 µg

(Fuente: USDA, National Nutrient Data Base)

### 1.3. Valor funcional

#### 1.3.1. Aminoácidos

Las hojas de *Moringa oleifera* presentan una cantidad significativa de aminoácidos, concretamente este cultivo se caracteriza por contener todos los aminoácidos esenciales (Tabla 4).

Los aminoácidos esenciales son de gran importancia para el organismo, ya que al no poder ser sintetizados por el propio organismo es necesario ingerir alimentos ricos en proteínas que los contengan, con tal de obtener dichos aminoácidos y formar nuevas proteínas.

**Tabla 4.** Contenido de aminoácidos presente en las hojas de *Moringa oleifera* por 100g.

<b>Aminoácidos</b>	
	<b>Hojas (g)</b>
<b>Triptófano</b>	0,144
<b>Treonina</b>	0,411
<b>Isoleucina</b>	0,451
<b>Leucina</b>	0,791
<b>Lisina</b>	0,537
<b>Metionina</b>	0,123
Cisteína	0,140
<b>Fenilalanina</b>	0,487
Tirosina	0,347
<b>Valina</b>	0,611
Arginina	0,532
<b>Histidina</b>	0,196
Alanina	0,705
Ácido aspártico	0,920
Ácido glutámico	1,035
Glicina	0,517
Prolina	0,451
Serina	0,414

(Fuente: USDA, National Nutrient Data Base)

### 1.3.2. Compuestos fenólicos

Diferentes partes del árbol *Moringa oleifera* como pueden ser las hojas, vainas y semillas presentan cantidades significativas de compuestos bioactivos, como lo son los antioxidantes. Los principales compuestos fenólicos son la quercetina y el kaempferol, responsables de dicha actividad antioxidante (Siddhuraju, 2003).

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Moringa oleifera* por 100g.

<b>Flavonoides</b>	<b>Hojas</b>
Isorhamnetin	0,4 mg
Kaempferol	6,0 mg
Miricetina	0,0 mg
Quercetina	16,6 mg

(Fuente: USDA, National Nutrient Data Base)

## 2. OBJETIVOS

---

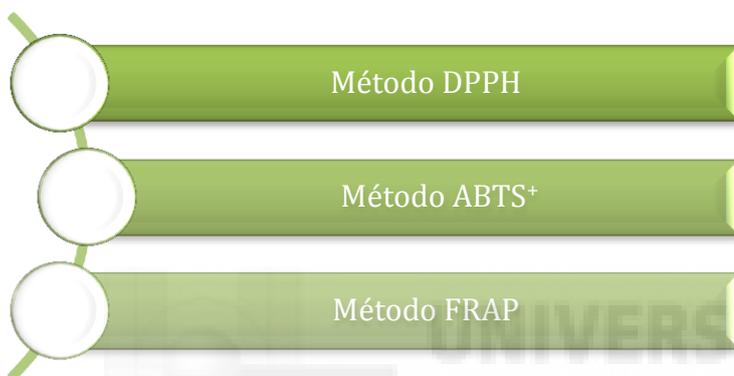


El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es evaluar la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de diferentes productos comerciales a base de *Moringa oleifera* durante la digestión *in vitro*.

El segundo objetivo del trabajo es realizar un seguimiento de los azúcares y ácidos orgánicos durante toda la simulación de digestión humana.

Para la obtención de dichos objetivos, se han utilizado los siguientes métodos:

🌿 Determinación de la capacidad antioxidante total:



🌿 Determinación del contenido de polifenoles totales:



🌿 Determinación del contenido de azúcares y ácidos orgánicos:



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1 Material Vegetal

El estudio que queda reflejado en este Trabajo Fin de Grado, se realizó con 6 muestras diferentes (polvo, cápsulas, infusión, embrión y semilla entera) de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) (Figura 7-11). Estas, se obtuvieron de la empresa Floralp's-ens, ubicada en El Puntal (Murcia).



**Figura 7.** Polvo de Moringa



**Figura 8.** Cápsulas de Moringa



**Figura 9.** Infusión de Moringa



**Figura 10.** Embrión de Moringa



**Figura 11.** Semilla de Moringa

## 3.2. Extracción

### 3.2.1. Extracción de polifenoles

Para la extracción de polifenoles, el primer extractante estaba compuesto por: metanol al 80 %, 20% de agua ultrapura y 1% de ácido clorhídrico (HCl).

Se tomó 1 g de muestra, que fue introducida en un tubo criogénico previamente numerado; se añadió entre 2-4 mL del anterior extractante según el peso de los tubos, y se agitó empleando un agitador mecánico (vórtex) hasta homogeneizar el producto. A continuación las muestras fueron llevadas al ultrasonido durante 15



**Figura 12.** Ultrasonido.

minutos, pasado este tiempo se dejaron en el frigorífico durante 16 horas a 4°C. Nuevamente se volvieron a poner las muestras en el ultrasonido durante 15 minutos (Figura 12) y después se introdujeron en la centrifuga durante 10 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante (750 µL) se filtró y depositó en un eppendorf para las determinaciones de capacidad antioxidante; por otro lado, el residuo se utilizó para llevar a cabo una segunda extracción.



**Figura 13.** Tubos criogénicos en refrigeración.

Para extraer los polifenoles presentes en el residuo se utilizó un segundo extractante compuesto por: 70% de acetona y 30% de agua ultrapura.

Para la extracción del residuo se llevó a cabo el mismo proceso descrito anteriormente, es decir, se puso en los tubos criogénicos (Figura 13) entre 2-4 mL del segundo extractante y se agitaron con un vórtex. Las muestras se colocaron en el ultrasonido durante 15 minutos, seguidamente los tubos se metieron en un frigorífico durante 16 horas a 4°C. Pasadas las horas establecidas, las muestras se volvieron a meter en el ultrasonido 15 minutos, y posteriormente en la centrifuga 10 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante (750 µL) se depositó en un eppendorf. Por último, ambos sobrenadantes (metanol y acetona) se mezclaron con una relación 1:1.

### **3.2.2. Extracción de ácidos orgánicos y azúcares**

Para realizar esta extracción se utilizó tampón fosfato y 1% de ácido clorhídrico (HCl).

Se tomó 1 g de muestra, que fue introducida en un tubo criogénico, se añadió 2-4 mL del extractante anterior según el peso de los tubos y se agitó en un vórtex hasta homogeneizar el producto. Las muestras se llevaron al ultrasonido durante 15 minutos, y se



**Figura 14.** HPLC.

guardaron en un frigorífico durante 16 horas a 4°C. Nuevamente los tubos se metieron 15 minutos en el ultrasonido, y posteriormente a la centrifuga durante 10 minutos a 15.000 rpm.

El sobrenadante se utilizó tanto para actividad antioxidante como para ácidos orgánicos y azúcares, filtrando 20 µL para HPLC (Figura 14) con un filtro de 0,45 µm. Los viales de cromatografía se conservaron en un congelador a -21 °C.

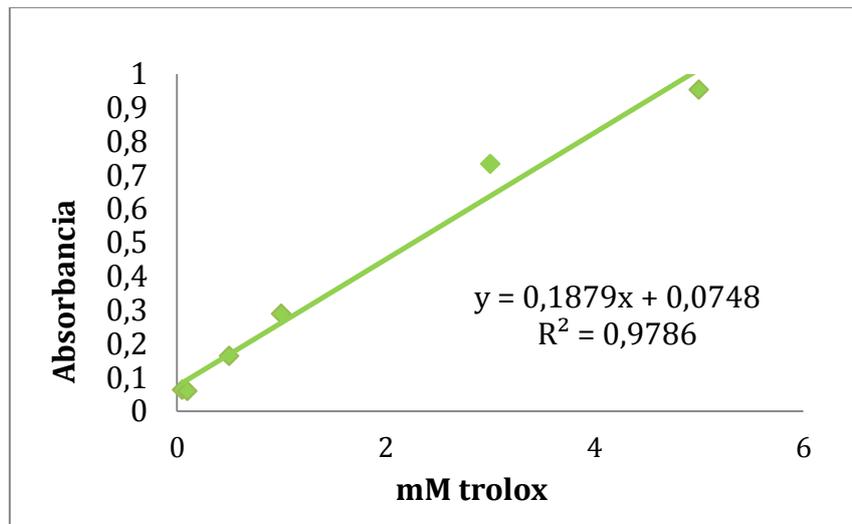
### 3.3. Determinaciones de capacidad antioxidante

#### 3.3.1 Método DPPH

El método DPPH se llevó a cabo siguiendo el método de Brand-Williams, Cuvelier, y Berset ("Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," 1995). El reactivo se preparó con metanol, dejando reaccionar la mezcla 30 minutos en la oscuridad; seguidamente se ajustó su absorbancia a 1 con una longitud de onda de 515 nm. La recta de calibrado o curva patrón se realizó con el reactivo Trolox a partir de una concentración de 10 mM procediendo de la siguiente manera:

- a. Se prepararon 5 tubos de ensayo, previamente numerados.
- b. Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente del reactivo Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL, y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5mL con etanol.
- c. Se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad y se llenaron en el siguiente orden: 10 µL Trolox, 40 µL metanol y 950 µL de la disolución DPPH.
- d. Se dejó reaccionar en oscuridad 10 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm.
- e. A los diferentes resultados obtenidos se les restó la absorbancia del reactivo y se realizó la representación gráfica (Figura 15) para obtener la ecuación de la recta y poder así hallar la concentración de

las muestras.



**Figura 15.** Recta de calibrado método DPPH

Una vez realizada la recta de calibrado, se midió la capacidad antioxidante de las diferentes muestras. Este proceso se realizó por duplicado para cada extracto y se procedió de igual modo que en el llenado de las cubetas para la recta patrón. En cada cubeta se añadieron: 10  $\mu\text{L}$  de muestra, 40  $\mu\text{L}$  de metanol y 950  $\mu\text{L}$  de solución DPPH.

Las muestras se dejaron reaccionar durante 10 minutos en oscuridad, midiendo después de ese tiempo la absorbancia en el espectrofotómetro (Figura 16) a 515 nm. A los diferentes resultados obtenidos se les restó la absorbancia inicial del reactivo y se procedió al cálculo de la concentración de antioxidantes en función de la recta de calibrado.

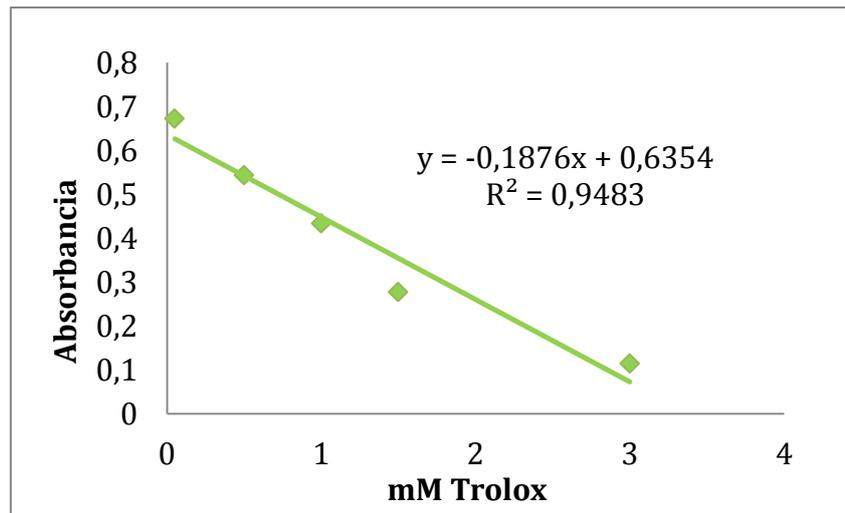


**Figura 16.** Espectrofotómetro.

### 3.3.2 Método ABTS<sup>+</sup>

El método ABTS se llevó a cabo utilizando el ensayo de decoloración del radical catión ABTS<sup>+</sup> (Re, 1999). El reactivo se preparó con una concentración 7 mM, donde seguidamente se le adicionó 1 mL de persulfato de potasio 2,45 mM y se dejó reaccionar en oscuridad a 20° durante 16 horas para que tuviera lugar la formación del catión ABTS<sup>+</sup>. Una vez transcurrido este tiempo, se diluyó la solución ABTS<sup>+</sup> en agua ultrapura hasta ajustar su absorbancia a 0,7 empleando una longitud de onda de 734 nm. La recta de calibrado se realizó con trolox 10 mM procediendo de la siguiente manera:

- a. Se prepararon 5 tubos de ensayo numerados.
- b. Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5 mL con etanol.
- c. Se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad y se llenaron en el siguiente orden: 10 µL trolox; 990 µL solución ABTS<sup>+</sup>.
- d. Se dejó reaccionar en oscuridad durante 6 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm.
- e. A los resultados obtenidos se les restó la absorbancia del reactivo y se realizó la representación gráfica (Figura 17) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.



**Figura 17.** Recta de calibrado método ABTS<sup>+</sup>

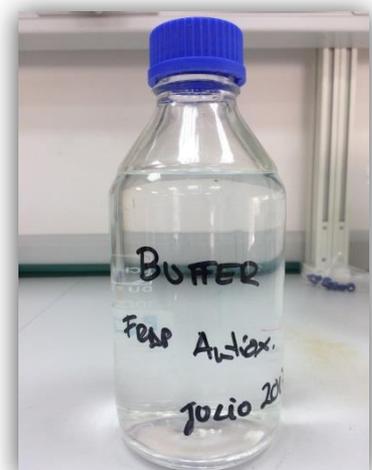
Una vez realizada la recta de calibrado, se procedió a medir la capacidad antioxidante de las diferentes muestras. Este proceso se realizó por duplicado para cada extracto y se procedió de igual modo que en el llenado de las cubetas para la recta patrón. En cada cubeta se añadieron: 10  $\mu$ L de muestra, 990  $\mu$ L de solución ABTS<sup>+</sup>.

Se dejó reaccionar durante 6 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. A los resultados se les restó la absorbancia inicial del reactivo y se procedió al cálculo de la concentración de antioxidantes en función a la recta de calibrado.

### 3.3.3 Método FRAP

El método FRAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Benzie y Strain ("The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay," 1996). El reactivo se preparó con una relación 1:1:10 de TPTZ: FeCl<sub>3</sub>: solución buffer:

- 🌿 La solución buffer se ajustó a pH = 3,6 con 1,55 g de CH<sub>3</sub>COONa (Sodio acetato 3-hidrato) y 0,9 mL de HCl, llevando la solución a 1 L.
- 🌿 Se preparó HCl 40 mM.
- 🌿 Se preparó el reactivo TPTZ 40 mM con el HCl 40 mM.

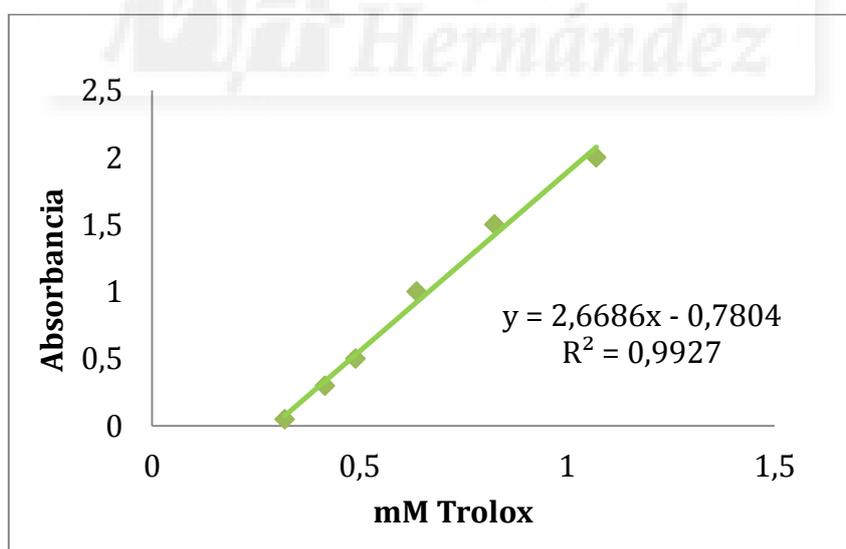


**Figura 18.** Solución Buffer.

- Se preparó 54,05 mg de Cloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM en 10 mL de agua ultrapura.

Una vez preparado el reactivo, se procedió a realizar la recta de calibrado con Trolox 10 mM:

- Se prepararon 5 tubos de ensayo numerados.
- Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5 mL con etanol.
- Se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad y se llenaron en el siguiente orden: 10  $\mu\text{L}$  trolox; 990  $\mu\text{L}$  solución FRAP.
- Se dejó reaccionar en oscuridad durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 593 nm.
- Se realizó la representación gráfica (Figura 19) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.



**Figura 19.** Recta de calibrado método FRAP

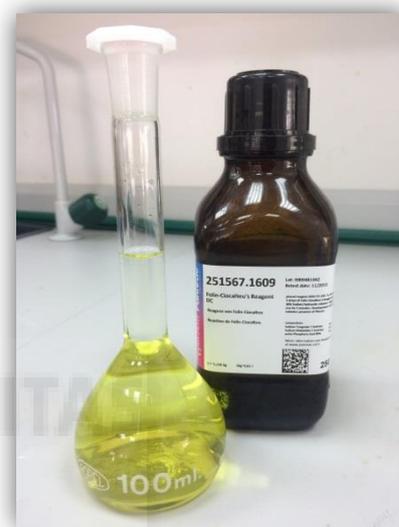
Una vez realizada la recta de calibrado, se procedió a medir la capacidad antioxidante de las muestras. Este proceso se realizó por duplicado para cada extracto y se procedió de igual modo que en el llenado de las cubetas para la recta patrón. En cada cubeta se añadieron: 10  $\mu\text{L}$  de muestra, 990  $\mu\text{L}$  de solución FRAP.

Se dejó reaccionar durante 10 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 593 nm. Con los resultados obtenidos se procedió al cálculo de la concentración de antioxidantes en función a la recta de calibrado.

### 3.3.4. Determinación de fenoles totales

El método para determinar la cantidad de fenoles totales fue descrito por Gao, Ohlander, Jeppsson, Björk y Trajkovski ("Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during Maturation," 2000); para realizar dicho método se necesitaron los siguientes reactivos:

- 🌿 Reactivo de Folin-Ciocalteu (Figura 20)
- 🌿 Carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )



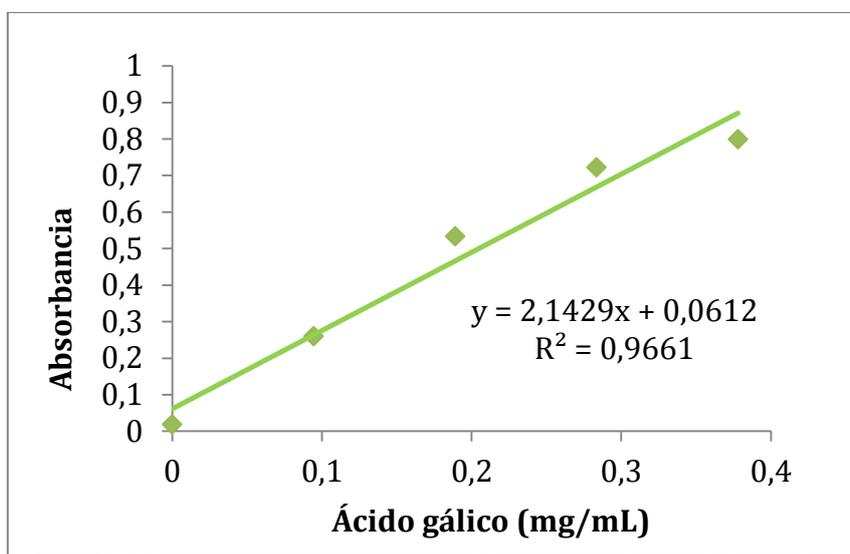
**Figura 20.** Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Una vez preparados los reactivos, se procedió a realizar la recta de calibrado con ácido gálico 1 mM, de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Se prepararon 6 tubos de ensayo numerados.
- b) Se añadió a cada tubo 0,2 mL de reactivo de Folin y 2 mL de agua.
- c) Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de ácido gálico: 0, 25, 50, 75, 100 y 125  $\mu\text{L}$  y se completó hasta un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con agua.
- d) Se agitó y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 3 minutos.
- e) Se añadió 1 mL de carbonato de sódico al 20%.
- f) Se dejaron incubar los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora.

g) Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV visible.

h) Se realizó la representación gráfica (Figura 21) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.



**Figura 21.** Recta de calibrado método fenoles totales

Una vez realizada la recta de calibrado, se procedió a medir los fenoles totales de las muestras. Para este método se realizó una dilución 1:1. Se procedió a medir las muestras diluidas por triplicado, de igual modo que en el llenado de los tubos para la recta patrón.

a) Se prepararon los tubos de ensayo numerados.

b) Se añadió a cada tubo 0,2 mL de reactivo de Folin y 2 mL de agua.

c) Se añadió a cada tubo 0,1 mL de muestra.

d) Se agitó y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 3 minutos.

e) Se añadió 1 mL de carbonato sódico.

f) Se dejaron incubar los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora.

g) Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV visible.

Con los resultados obtenidos se procedió al cálculo de la concentración de fenoles

en función a la recta de calibrado.

### 3.4. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares por HPLC

Los ácidos orgánicos y azúcares se determinaron por cromatografía de alta resolución (HPLC) (Cano-Lamadrid, 2017). Para ello se utilizó un equipo de cromatografía líquida Hewlett Packard HP 1100 con una columna Supelcogel TM C-610H (7,8 mm x 300 mm) y una precolumna Supelguard C-610H (4,6 mm x 50 mm). Los ácidos se monitorizaron a 210 nm con un visible-ultravioleta (V-UV) detector de diodos (DAD G1315A).

Para la fase móvil se utilizó ácido ortofosfórico (Sigma-Aldrich, Madrid) al 0,1 % y el volumen de inyección fue de 20 µL con un flujo de 0,5 mL / minuto en condiciones isocráticas. Los resultados se expresaron en g/L.

### 3.5. Digestión *In vitro*

#### Muestras

**Tabla 6.** Codificación *in vitro* de las diferentes muestras del estudio y su respectiva fase de digestión.

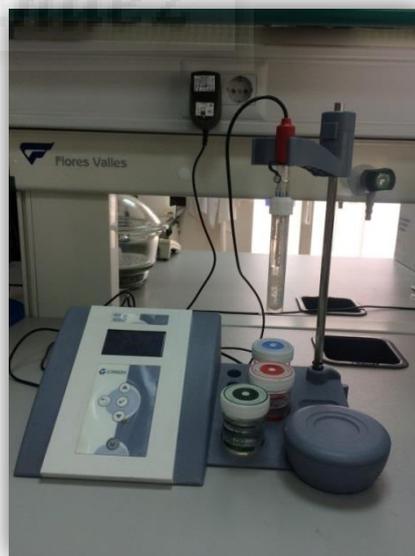
Muestra	Codificación <i>In vitro</i>	Fase digestión
Polvo	1	Oral: <b>1a</b>
		Gástrica 1h: <b>1b</b>
		Gástrica 2h: <b>1c</b>
		Intestinal 1h: <b>1d</b>
		Intestinal 2h: <b>1e</b>
	2	Oral: <b>2a</b>
		Gástrica 1h: <b>2b</b>
		Gástrica 2h: <b>2c</b>
		Intestinal 1h: <b>2d</b>
		Intestinal 2h: <b>2e</b>
Cápsulas	3	Oral: <b>3a</b>
		Gástrica 1h: <b>3b</b>

<b>Semilla entera</b>	<b>4</b>	Gástrica 2h: <b>3c</b>
		Intestinal 1h: <b>3d</b>
		Intestinal 2h: <b>3e</b>
		Oral: <b>4a</b>
		Gástrica 1h: <b>4b</b>
		Gástrica 2h: <b>4c</b>
	<b>5</b>	Intestinal 1h: <b>4d</b>
		Intestinal 2h: <b>4e</b>
		Oral: <b>5a</b>
		Gástrica 1h: <b>5b</b>
		Gástrica 2h: <b>5c</b>
		Intestinal 1h: <b>5d</b>
<b>6</b>	Intestinal 2h: <b>5e</b>	
	Oral: <b>6a</b>	
	Gástrica 1h: <b>6b</b>	
	Gástrica 2h: <b>6c</b>	
	Intestinal 1h: <b>6d</b>	
	Intestinal 2h: <b>6e</b>	
<b>7</b>	Oral: <b>7a</b>	
	Gástrica 1h: <b>7b</b>	
	Gástrica 2h: <b>7c</b>	
	Intestinal 1h: <b>7d</b>	
	Intestinal 2h: <b>7e</b>	
	Oral: <b>8a</b>	
<b>8</b>	Gástrica 1h: <b>8b</b>	
	Gástrica 2h: <b>8c</b>	
	Intestinal 1h: <b>8d</b>	
	Intestinal 2h: <b>8e</b>	
	Oral: <b>9a</b>	
	<b>9</b>	Gástrica 1h: <b>9b</b>
Gástrica 2h: <b>9c</b>		
Intestinal 1h: <b>9d</b>		
<b>Embrión</b>		
<b>Infusión 3'</b>		

<b>Infusión 5'</b>	<b>10</b>	Intestinal 2h: <b>9e</b>
		Oral: <b>10a</b>
		Gástrica 1h: <b>10b</b>
		Gástrica 2h: <b>10c</b>
		Intestinal 1h: <b>10d</b>
	<b>11</b>	Intestinal 2h: <b>10e</b>
		Oral: <b>11a</b>
		Gástrica 1h: <b>11b</b>
		Gástrica 2h: <b>11c</b>
		Intestinal 1h: <b>11d</b>
	<b>12</b>	Intestinal 2h: <b>11e</b>
		Oral: <b>12a</b>
		Gástrica 1h: <b>12b</b>
		Gástrica 2h: <b>12c</b>
		Intestinal 1h: <b>12d</b>
		Intestinal 2h: <b>12e</b>

### Materiales

- 🌿 Baño con agitación (Figura 23)
- 🌿 Botes de cristal + pesos (Figura 24)
- 🌿 PHmetro (Figura 22)
- 🌿 Pipetas
- 🌿 Balanza de precisión
- 🌿 Probeta
- 🌿 Bolsas de stomacher
- 🌿 Stomacher
- 🌿 Cronómetro
- 🌿 Tubos criogénicos (Figura 25)
- 🌿 Ependorf (Figura 26)
- 🌿 Viales de cromatografía para filtrar ácidos orgánicos y azúcares.
- 🌿 Filtros y jeringuillas



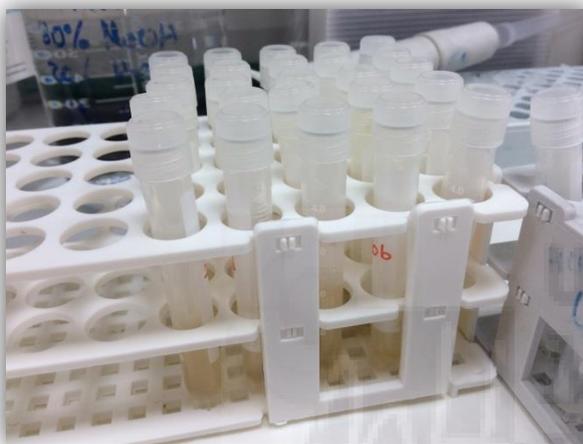
**Figura 22.** pHmetro.



**Figura 23.** Baño con agitación.



**Figura 24.** Botes de cristal con pesos.



**Figura 25.** Tubos criogénicos.



**Figura 26.** Ependorf.

## Reactivos

- 🌿 SSF; SGF; SIF
- 🌿 HCl (6M)
- 🌿  $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$  (0,3M)
- 🌿 NaOH (1M)
- 🌿 Extractantes AAT
- 🌿 Pancreatina (Figura 27)
- 🌿 Pepsina (Figura 27)
- 🌿 Alfa-amilasa
- 🌿 Sales biliares (Figura 27)



**Figura 27.** Pepsina, Sales biliares, Pancreatina.

Para llevar a cabo correctamente la digestión *in vitro* de este estudio, se prepararon 3 fluidos: SSF (simulated salivary fluid) fluido salival; SGF (simulated gastric fluid) fluido gástrico; y SIF (simulated intestinal fluid) fluido intestinal.

Los fluidos fueron preparados con los reactivos y volúmenes (mL) que se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Preparación de fluidos, necesarios para la digestión *in vitro*.

Reactivos	SSF (mL)	SGF (mL)	SIF (mL)	Total
KCl 0,5 M	15,1	6,9	6,8	28,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M	3,7	0,9	0,8	5,4
NaHCO <sub>3</sub> 1M	6,8	12,5	42,5	61,8
NaCl 2M	-	11,8	9,6	21,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> 0,15 M	0,5	0,4	1,1	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5 M	0,06	0,5	-	0,56
NaOH 1M (ajustar pH)	-	-	-	-
HCl 6M (ajustar pH)	0,09	-	0,7	2,09
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> 0,3 M	Echar después cuando esté a 37°C: CaCl <sub>2</sub> (100µL)			

## Fases de digestión

### Fase Oral

En primer lugar se realizó una simulación de la masticación (fase oral), mezclando en una bolsa de stomacher 10 gramos de muestra y 10 mL de SSF, fluido salival, (8,95 mL de SSF, 50 µL CaCl<sub>2</sub> y 1 mL de α-amilasa). Una vez se realizó este paso, se introdujo la bolsa al stomacher durante 1 minuto; posteriormente la disolución se pasó a un bote de cristal (5 minutos a 37 °C). Transcurridos los 5 minutos se recogió 5 mL de muestra (muestra tras fase oral), y se introdujo al frigorífico. El siguiente paso fue centrifugar las muestras en frío y guardar el sobrenadante y residuo a -20 °C.

## Fase gástrica

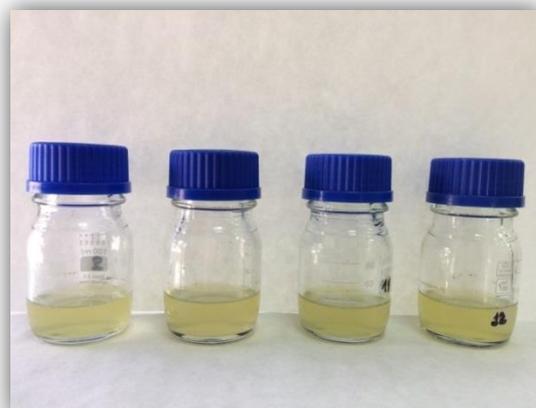
Para poder llevar a cabo la fase gástrica se mezcló 15 mL de la fase oral con 15 mL de SGF, fluido gástrico, calentado previamente a 37 °C. Los 15 mL de SGF estaban compuestos por: 12,24 mL SGF; 2,4 mL de pepsina; 7,5 µL CaCl<sub>2</sub> y 0,3 mL de HCl, reactivo con el que se ajustó el pH de la reacción a 3. La simulación gástrica se mantuvo durante 2 horas a 37 °C, bajo agitación constante a 170 rpm. Las muestras fueron recogidas tras 1 hora de reacción (muestra tras 1 hora fase gástrica) y 2 horas (muestra tras 2 horas fase gástrica); posteriormente se introdujeron las muestras en el frigorífico. Una vez enfriadas las muestras, se centrifugaron, y el sobrenadante y residuo se almacenó a -20 °C.

## Fase intestinal

Para esta última fase se mezcló 20 mL de fase gástrica y 20 mL de SIF, fluido intestinal, dicho fluido estaba compuesto por: 12,31 mL SIF; 5 mL de pancreatina; 2,5 mL de sales biliares; 40 µL de CaCl<sub>2</sub> y 0,15 mL de NaOH, reactivo que se utilizó para ajustar la reacción a pH 7. La simulación intestinal se mantuvo durante 2 horas a 37 °C, bajo agitación constante a 170 rpm. Para las determinaciones analíticas, se tomó 5 mL de muestra tras finalizar 1 hora de reacción (muestra tras 1 hora fase intestinal) y 2 horas de reacción (muestra tras 2 horas fase intestinal) (Figura 28, 29); posteriormente se introdujeron en el frigorífico. Una vez enfriadas las muestras se centrifugaron, y el sobrenadante y residuo se almacenó a -20 °C.



**Figura 28.** Polvo tras digestión intestinal.



**Figura 29.** Infusiones tras digestión intestinal.

Una vez realizada la digestión se llevaron a cabo los tres métodos de capacidad antioxidante anteriormente desarrollados en este trabajo (DPPH, ABTS y FRAP) así como los fenoles totales (Folin-Ciocalteu) y la determinación de ácidos orgánicos y azúcares. Cada ensayo se realizó por duplicado para cada una de las muestras.

### 3.6. Análisis estadístico

Los resultados de los análisis realizados, fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, con el fin de comprobar si las diferencias observadas durante los análisis realizados en las muestras eran significativas. Adicionalmente se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para correlacionar las muestras con los resultados obtenidos. Se utilizó el software **StatGraphicsPlus 5.0**.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

A continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio de la simulación de la digestión *in vitro* de productos de moringa; el cual se basó en determinar la capacidad antioxidante, el contenido total de fenoles y el perfil de azúcar de seis muestras antes y en cada una de las fases de la digestión.

## 4.1. Capacidad antioxidante y fenoles totales

### 4.1.1. Muestras

Para conocer la capacidad antioxidante se utilizaron tres métodos diferentes (ABTS<sup>+</sup>, DPPH y FRAP) con tal de poder explicar las propiedades antioxidantes de la matriz alimentaria debido a los mecanismos naturales implicados en esta propiedad. Como reconocen varios autores (Tabart, 2009) (Heo, 2007), no es válido el uso de un solo método para determinar la capacidad antioxidante en alimentos, ya que varios métodos pueden dar resultados diferentes. Los métodos citados anteriormente se basan en la generación de radicales libres que reaccionan con la muestra, de modo que los antioxidantes presentes en esta generan una respuesta inhibiendo dichos radicales. Estos métodos determinan el efecto antioxidante global de la muestra, no de cada componente por separado, por lo que resulta interesante realizar las determinaciones con varios métodos diferentes y así comparar el efecto antioxidante sobre diferentes tipos de radicales.

La **Tabla 8** muestra la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles de las seis muestras implicadas en el estudio, antes y en cada una de las fases de la simulación de la digestión *in vitro*. Con respecto al ensayo ABTS<sup>+</sup>, la muestra 1 (polvo) presentó la mayor capacidad antioxidante (36,7 mmol Trolox kg<sup>-1</sup>). En cuanto al método DPPH al igual que el método anterior, también se observó que la mayor capacidad antioxidante corresponde a la muestra 1 (polvo), seguida de la muestra 2 (cápsulas) y muestra 4 (embrión) (29,9, 26,4 y 19,6 mmol Trolox kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Los resultados obtenidos tras el método FRAP mostraron que la mayor capacidad antioxidante se encuentra en la muestra 1 (polvo) seguida de la muestra 3 (semilla) (91,1, y 18,1 mmol Trolox kg<sup>-1</sup>, respectivamente). En relación al contenido total de fenoles (TPC), tanto la muestra 1 (polvo) como la muestra 2 (cápsulas) presentaron una elevada cantidad de compuestos fenólicos (1712 y 896

g GAE kg<sup>-1</sup>, respectivamente), cabe destacar las muestras 3 (semilla) y 4 (embrión) que mostraron un elevado contenido de compuestos fenólicos sin diferencias significativas (296 y 148 g GAE kg<sup>-1</sup>, respectivamente), lo que supondría que la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en la semilla y no en la cáscara.

**Tabla 8.** Capacidad antioxidante (ABTS<sup>+</sup>, DPPH y FRAP) (mmol Trolox kg<sup>-1</sup>) y contenido total de fenoles (TPC) (g GAE kg<sup>-1</sup>) de las muestras antes y en cada una de las fases de la simulación de la digestión *in vitro*.

	ABTS <sup>+</sup> (mmol Trolox kg <sup>-1</sup> )	DPPH <sup>·</sup> (mmol Trolox kg <sup>-1</sup> )	FRAP (mmol Trolox kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )
<b>ANOVA test<sup>a</sup></b>				
<b>Entre muestras</b>				
<b>Tipo de producto</b>	**	***	***	***
<b>Tukey's test<sup>b</sup></b>				
1. Polvo	36,7 <sup>b</sup> a	29,9 a	91,1 a	1712 a
2. Cápsulas	3,50 b	26,4 ab	11,9 bc	896 b
3. Semilla	1,15 b	0,20 c	18,1 b	296 bc
4. Embrión	0,70 b	19,6 b	11,8 bc	148 c
5. Infusión 3'	0,60 b	0,40 c	4,59 bc	9,85 e
6. Infusión 5'	2,30 b	0,35 c	1,75 c	29,9 d
<b>ANOVA test</b>				
<b>Diferentes fases en la simulación <i>in vitro</i></b>				
1. Polvo	***	*	*	***
2. Cápsulas	*	***	**	***
3. Semilla	***	**	***	**
4. Embrión	***	***	**	*
5. Infusión 3'	***	NS	***	**
6. Infusión 5'	***	NS	***	***
<b>Tukey's test</b>				
<b>Muestra 1</b>				
Fase oral (FO)	60,6 b	23,8 ab	65,7 a	456 d
Fase gástrica 1h (FG1)	21,1 c	19,8 ab	50,2 b	813 b
Fase gástrica 2h (FG2)	18,3 c	14,7 b	41,9 b	554 c
Fase intestinal 1h (FI1)	116 a	29,2 a	29,7 c	1001 a
Fase intestinal 2h (FI2)	109 a	21,8 ab	25,7 c	903 ab
<b>Muestra 2</b>				
Fase oral (FO)	nd	nd	nd	nd
Fase gástrica 1h (FG1)	85,6 b	29,4 ab	53,4 a	540 c
Fase gástrica 2h (FG2)	57,7 b	18,7 c	40,7 b	345 d
Fase intestinal 1h (FI1)	148 a	30,0 a	35,0 bc	796 a
Fase intestinal 2h (FI2)	97,1 ab	26,0 b	28,8 c	669 b
<b>Muestra 3</b>				
Fase oral (FO)	3,58 cd	3,46 c	4,26 d	299 b
Fase gástrica 1h (FG1)	4,19 c	7,30 bc	6,84 c	361 b
Fase gástrica 2h (FG2)	3,04 d	6,57 bc	4,97 d	307 b
Fase intestinal 1h (FI1)	105 a	13,9 a	10,2 a	647 a
Fase intestinal 2h (FI2)	72,2 b	11,9 ab	9,17 b	569 a
<b>Muestra 4</b>				

Fase oral (FO)	7,45 d	26,4 a	3,61 c	31,1 c
Fase gástrica 1h (FG1)	14,4 c	2,43 c	6,08 bc	317 b
Fase gástrica 2h (FG2)	11,8 cd	2,94 c	4,69 c	284 b
Fase intestinal 1h (FI1)	100 a	5,99 b	9,95 a	574 a
Fase intestinal 2h (FI2)	75,9 b	5,04 b	8,86 ab	523 a
<b>Muestra 5</b>				
Fase oral (FO)	1,44 c	0,58	0,77 c	20,2 b
Fase gástrica 1h (FG1)	0,91 cd	0,80	1,20 b	11,8 b
Fase gástrica 2h (FG2)	0,58 d	0,54	0,93 c	10,1 b
Fase intestinal 1h (FI1)	5,81 b	0,74	1,62 a	56,0 a
Fase intestinal 2h (FI2)	12,9 a	0,52	1,27 b	52,3 a
<b>Muestra 6</b>				
Fase oral (FO)	0,96 d	0,52	0,85 c	18,8 b
Fase gástrica 1h (FG1)	2,63 c	0,76	1,34 b	14,8 b
Fase gástrica 2h (FG2)	0,42 e	0,42	1,03 c	9,98 b
Fase intestinal 1h (FI1)	17,8 a	0,74	1,60 a	53,3 a
Fase intestinal 2h (FI2)	5,01 b	0,43	1,30 b	65,9 a

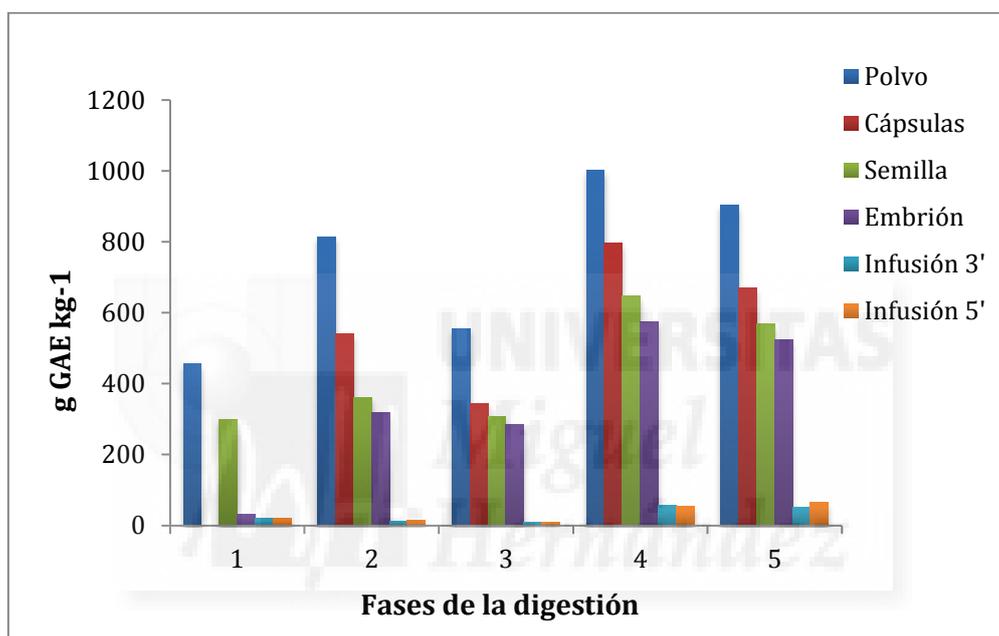
#### 4.1.2. Digestión *In vitro*

Con respecto a la capacidad antioxidante y contenido total de fenoles en cada una de las fases de la digestión (**Tabla 8**), valorando los resultados obtenidos por el método ABTS<sup>+</sup> se puede observar que los valores más altos de antioxidantes se encontraron en la fase intestinal, seguida de la fase gástrica; y la fase oral por el contrario presentó los valores más bajos. En cuanto al método DPPH, la mayor capacidad antioxidante se observó en la fase intestinal en todos los productos de moringa, excepto la muestra 5 (infusión 3') y 6 (infusión 5') en las que no se encontró efecto de digestión. En el ensayo FRAP se puede destacar que en las muestras 1 (polvo) y 2 (cápsulas), la fase gástrica presentó mayor capacidad antioxidante en comparación a la fase intestinal, sin embargo las muestras 3 (semilla), 4 (embrión), 5 y 6 (infusión) mostraron mayor capacidad antioxidante en la fase intestinal. Finalmente, el contenido total de fenoles (TPC) mostró el mismo resultado que el ensayo ABTS<sup>+</sup>, es decir, todas las muestras del estudio presentaron mayor contenido de antioxidantes en la fase intestinal, convirtiendo a la fase oral en la fase con menor contenido antioxidante presente en las muestras.

Un estudio reciente (Bouayed, 2011), reveló que el aumento del contenido de fenoles totales después de la fase intestinal podría explicarse por el tiempo adicional de extracción y/o el efecto de las enzimas digestivas intestinales (lipasa y

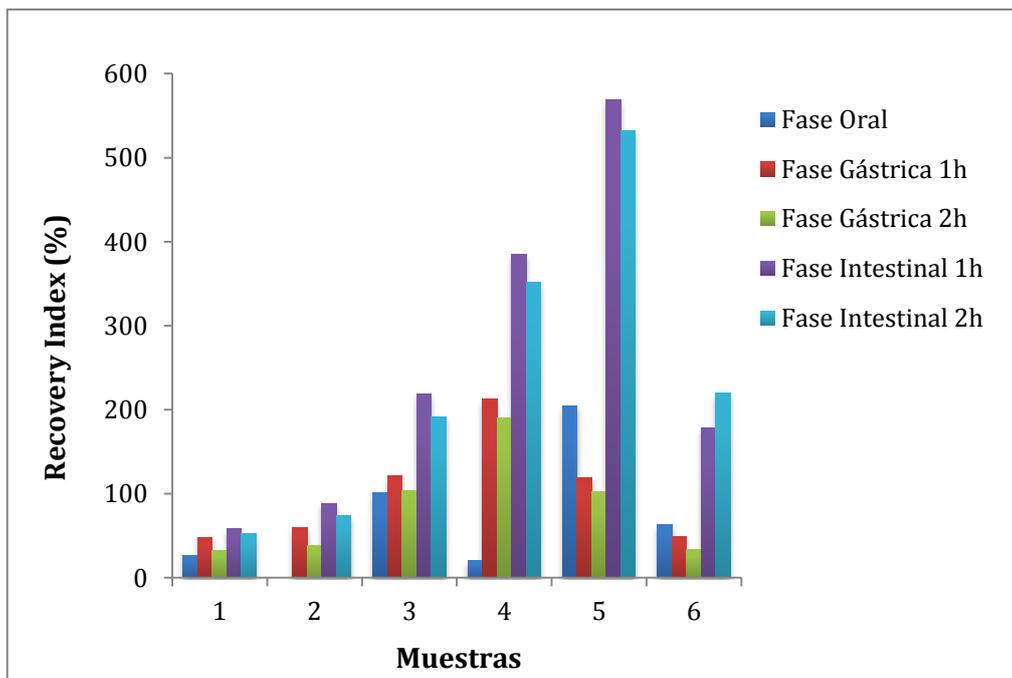
pancreatina, que tienen actividad de amilasa y proteasa) en la matriz alimentaria, lo que facilita la liberación de los compuestos fenólicos unidos a la matriz.

A continuación se puede observar la **Figura 30**, que hace referencia al contenido total de fenoles (TPC) en cada una de las fases de la digestión *in vitro*. Esta gráfica sirve para ilustrar mejor los resultados mencionados anteriormente en la **Tabla 8**; donde se puede observar que las últimas etapas de la digestión *in vitro*, es decir, la fase intestinal presenta mayor contenido de compuestos fenólicos, siendo el polvo y las cápsulas, las muestras con mayor contenido en estos compuestos bioactivos.



**Figura 30.** Contenido total de fenoles (TPC) (g GAE kg<sup>-1</sup>) en cada una de las fases de la simulación de la digestión *in vitro*.

La siguiente gráfica (**Figura 31**) muestra el recovery index, es decir, el índice de recuperación del contenido total de fenoles de las seis muestras en cada una de las fases de la digestión *in vitro*. Los resultados fueron obtenidos mediante la siguiente fórmula  $\frac{\text{Extracción digerida}}{\text{Extracción inicial}} \times 100$ ; dichos datos revelaron que a mayor extracción de compuestos antioxidantes y mayor contenido inicial de estos compuestos en las muestras, menor es el porcentaje del recovery index, es decir, del índice de recuperación.



**Figura 31.** Recovery Index (índice de recuperación) del contenido total de fenoles de las seis muestras en cada una de las fases de la digestión *in vitro*.

La **Tabla 9** muestra la correlación de Pearson entre el contenido total de fenoles y los diferentes métodos antioxidantes. Como se puede observar hay una correlación positiva y significativa entre el método TPC y ABTS<sup>+</sup> [excepto en la muestra 1 (polvo), donde la correlación no fue significativa]. Con respecto al ensayo DPPH, las muestras 2 (cápsulas) y 3 (semilla) tuvieron una correlación positiva y significativa con respecto al método TPC. Por último, el método FRAP presentó una correlación positiva y significativa con el método TPC en las muestras 3 (semilla), 4 (embrión) y 5 (infusión 3').

Por los resultados comentados anteriormente se puede comprobar que los métodos llevados a cabo en el estudio son una buena opción para explicar las propiedades antioxidantes de los productos de moringa.

**Tabla 9.** Correlación de Pearson entre contenido fenoles totales (TPC) y los métodos antioxidantes (ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>·</sup> and FRAP) para cada muestra antes y en cada una de las fases de la simulación.

	TPC	ABTS <sup>+</sup>	DPPH <sup>·</sup>	FRAP
<b>Inicial</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,897***	1		
DPPH <sup>+</sup>	0,790***	0,583*	1	
FRAP	0,878***	0,935***	0,623**	1
<b>Muestra 1 (Polvo)</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,621	1		
DPPH <sup>+</sup>	0,415	0,729***	1	
FRAP	-0,769***	-0,533	-0,099	1
<b>Muestra 2 ( Cápsulas)</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,902***	1		
DPPH <sup>+</sup>	0,809***	0,734**	1	
FRAP	-0,437	-0,334	0,109	1
<b>Muestra 3 (Semilla)</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,959***	1		
DPPH <sup>+</sup>	0,949***	0,902***	1	
FRAP	0,958***	0,925***	0,951***	1
<b>Muestra 4 (Embrión)</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,819***	1		
DPPH <sup>+</sup>	-0,647**	-0,308	1	
FRAP	0,807***	0,935***	-0,500	1
<b>Muestra 5 (Infusión 3')</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,824***	1		
DPPH <sup>+</sup>	-0,096	-0,258	1	
FRAP	0,740**	0,502	0,327	1
<b>Muestra 6 (Infusión 5')</b>				
TPC	1			
ABTS <sup>·</sup>	0,639**	1		
DPPH <sup>+</sup>	0,019	0,500	1	
FRAP	0,599	0,825***	0,599	1

## 4.2. Ácidos orgánicos y azúcares

### 4.2.1. Muestras

En cuanto al perfil de azúcar (**Tabla 10**), la muestra 1 (polvo) presentó mayor concentración de azúcares, concretamente 3,01, 1,92, 0,75, 0,06 (g kg<sup>-1</sup>) de glucosa, sorbitol, fructosa y xilitol, respectivamente. En la muestra 3 (semilla) se identificó glucosa y fructosa (2,59 y 1,15 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente) y la muestra 4 (embrión) presentó solamente glucosa (2,57 g kg<sup>-1</sup>). En cuanto a las demás muestras (3, 5 y 6) no se encontraron azúcares detectables bajo nuestras condiciones de trabajo. Investigaciones recientes mostraron resultados similares a los del presente estudio; los datos revelaron que los azúcares predominantes en harina de moringa fueron, fructosa (0,088%), glucosa (0,086%) y sorbitol (0,003%) (Gaafar, 2016), al igual que en otro ensayo, los azúcares principales en hojas y semillas de moringa eran fructosa (3,63%) y glucosa (2,77%) (Al Juhaimi, 2017).

### 4.2.1. Digestión *In Vitro*

Con respecto al contenido total de azúcares en cada una de las fases de la digestión (**Tabla 10**), podemos observar que todas las muestras del estudio presentaron una mayor cantidad de glucosa en la fase gástrica. En cuanto a la fructosa, se detectó una mayor cantidad en las muestras 1, 2, 3, y 4, después de la fase oral y gástrica. Por lo que respecta a los azúcares, sorbitol y xilitol, se observó que no hay una correlación significativa entre las muestras del estudio y las diferentes fases de la digestión *in vitro*.

**Tabla 10.** Contenido total de azúcares y ácidos orgánicos (glucosa, fructosa, sorbitol, xilitol y ácido oxálico) (g kg<sup>-1</sup>) de las muestras antes y en cada una de las fases de la simulación de la digestión *in vitro*.

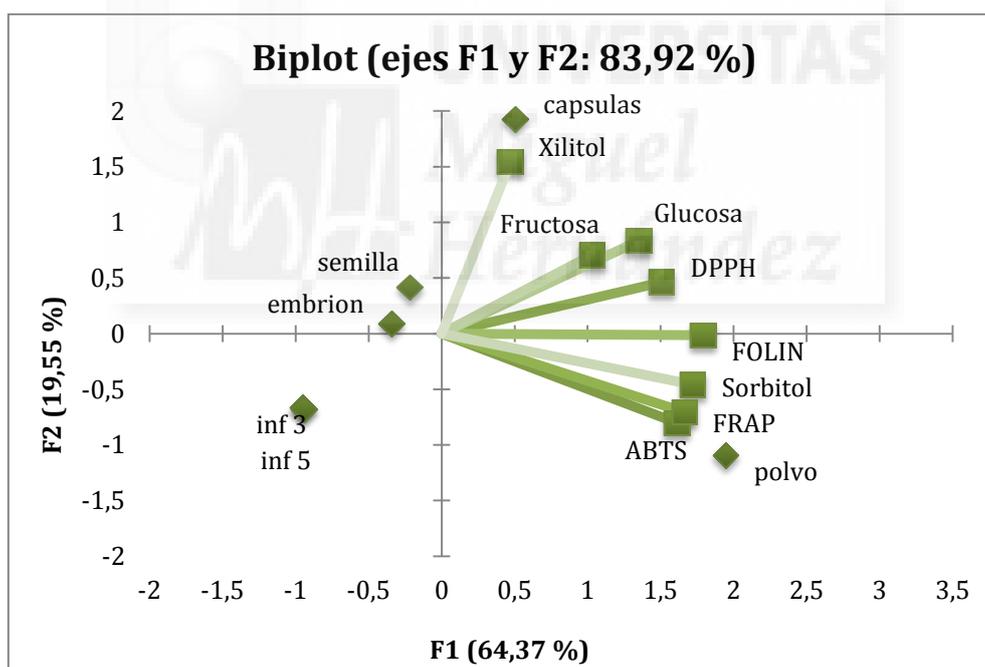
	Glucosa (g kg <sup>-1</sup> )	Fructosa (g kg <sup>-1</sup> )	Sorbitol (g kg <sup>-1</sup> )	Xilitol (g kg <sup>-1</sup> )	Ácido oxálico (g kg <sup>-1</sup> )
<b>ANOVA test <sup>a</sup></b>					
<b>Entre muestras</b>					
<b>Tipo de producto</b>	***	***	***	**	nd <sup>e</sup>
<b>Tukey's test</b>					
1. Polvo	3,01 a	0,75 b	1,92 a	0,06 a	nd
2. Cápsulas	nd	nd	nd	nd	nd
3. Semilla	2,59 b	1,15 a	nd	nd	nd
4. Embrión	2,57 b	nd	nd	nd	nd
5. Infusión 3'	nd	nd	nd	nd	nd
6. Infusión 5'	nd	nd	nd	nd	nd
<b>ANOVA test</b>					
<b>Diferentes fases de la simulación <i>in vitro</i></b>					
1. Polvo	***	**	**	***	**
2. Cápsulas	**	**	*	**	***
3. Semilla	***	***	*	*	*
4. Embrión	***	**	**	**	**
5. Infusión 3'	***	nd	nd	nd	nd
6. Infusión 5'	***	nd	nd	nd	nd
<b>Tukey's test</b>					
<b>Muestra 1</b>					
Fase oral (FO)	15,0 b	12,5 a	12,3 a	54,6 a	15,9 a
Fase gástrica 1h (FG1)	41,8 a	8,03 b	5,74 b	21,6 b	3,59 b
Fase gástrica 2h (FG2)	31,0 ab	6,77 b	3,91 c	16,6 bc	2,99 b
Fase intestinal 1h (FI1)	9,00 c	nd	3,37 c	10,2 c	0,17 c
Fase intestinal 2h (FI2)	7,21 c	nd	2,50 c	8,66 c	0,24 c
<b>Muestra 2</b>					
Fase oral (FO)	nd	nd	nd	nd	nd
Fase gástrica 1h (FG1)	20,3 a	34,9 a	30,9 a	41,2 a	13,6 a
Fase gástrica 2h (FG2)	16,1 b	25,7 b	22,9 b	30,1 b	2,42 b
Fase intestinal 1h (FI1)	3,63 c	nd	11,4 c	13,9 c	2,16 b
Fase intestinal 2h (FI2)	4,04 c	nd	10,4 c	12,1 c	1,61 b
<b>Muestra 3</b>					
Fase oral (FO)	15,9 c	69,8 a	8,24 a	2,39 b	4,67 c
Fase gástrica 1h (FG1)	40,7 a	19,5 b	2,81 bc	nd	20,9 a
Fase gástrica 2h (FG2)	24,6 b	7,3 bc	4,14 b	nd	15,9 b

Fase intestinal 1h (FI1)	30,1 b	0,7 c	2,05 c	3,71 a	0,13 d
Fase intestinal 2h (FI2)	15,6 c	4,5 bc	1,92 c	1,60 c	1,12 d
<b>Muestra 4</b>					
Fase oral (FO)	11,6 c	38,9 a	1,01 c	11,6 a	66,1
Fase gástrica 1h (FG1)	17,5 b	18,8 b	0,42 c	7,97 b	67,0
Fase gástrica 2h (FG2)	23,1 a	nd	16,6 a	3,92 c	77,8
Fase intestinal 1h (FI1)	21,5 a	nd	14,8 b	nd	85,6
Fase intestinal 2h (FI2)	4,41 d	nd	1,57 c	4,32 c	51,7
<b>Muestra 5</b>					
Fase oral (FO)	nd	nd	nd	nd	nd
Fase gástrica 1h (FG1)	0,48 b	nd	nd	nd	nd
Fase gástrica 2h (FG2)	0,71 a	nd	nd	nd	nd
Fase intestinal 1h (FI1)	nd	nd	nd	nd	nd
Fase intestinal 2h (FI2)	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Muestra 6</b>					
Fase oral (FO)	nd	nd	nd	nd	nd
Fase gástrica 1h (FG1)	0,95 a	nd	nd	nd	nd
Fase gástrica 2h (FG2)	0,79 a	nd	nd	nd	nd
Fase intestinal 1h (FI1)	0,37 b	nd	nd	nd	nd
Fase intestinal 2h (FI2)	0,18 c	nd	nd	nd	nd

### 4.3. Análisis de componentes principales

Por último, la **Figura 32** muestra el análisis de componentes principales (PCA), es decir, la correlación de las muestras empleadas en el estudio con los diferentes parámetros estudiados. El primer componente principal (F1) representó el 64,37% de la varianza de datos totales, mientras que el segundo componente principal (F2) representó el 19,55% de la varianza total. Es importante recordar que cuanto mayor sea la distancia entre dos parámetros, menor será su correlación.

Considerando F1 como la dimensión que explica las principales diferencias entre los parámetros, se puede decir que la muestra 1 (polvo) y 2 (cápsulas) se asociaron positivamente con los métodos de capacidad antioxidante como lo son el ABTS+, DPPH, y FRAP; con el método del contenido total de fenoles (TPC), y los diferentes azúcares, glucosa, fructosa, sorbitol y xilitol.



**Figura 32.** Análisis de componentes principales (PCA); correlación de las muestras con los parámetros estudiados.

## 5. CONCLUSIONES

---

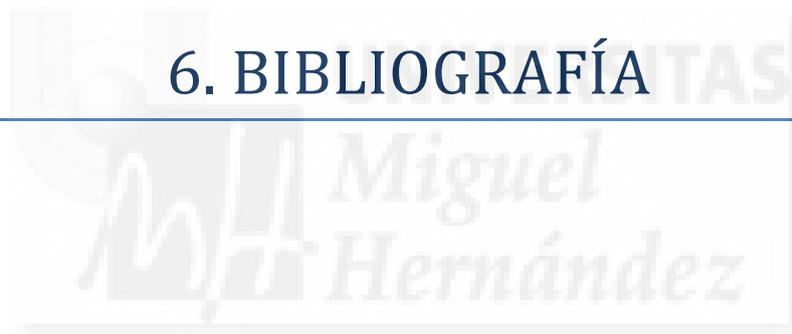


A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

- Entre todas las muestras, los productos elaborados a partir de hojas deshidratadas “polvo y cápsulas” fueron las que presentaron mayor capacidad antioxidante como contenido en fenoles totales.
- No hubo diferencias entre la infusión durante 3 minutos y 5 minutos. Ambas no presentaron concentraciones elevadas de fenoles totales, y por tanto una baja capacidad antioxidante.
- Se observó un aumento de glucosa en la fase gástrica respecto a la fase oral en todas las muestras. Estos resultados abren nuevas líneas de investigación en cuanto a productos destinados a personas diabéticas.
- Las muestras utilizadas en este estudio son productos interesantes por su alto contenido en compuestos bioactivos.
- Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el desarrollo de productos a partir de moringa podría ser una oportunidad innovadora para la industria agroalimentaria.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---



- Agbogidi, O. M., and Ilondu, E.M. (2012). Moringa Oleifera Lam: Its Potentials as food security and rural medicinal item *J. Bio. Innov* 1, 6, 156-167.
- Al Juhaimi, F. G., K; Babiker, E; Matthäus, B; Özcan, M. (2017). The biochemical composition of the leaves and seeds meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. *Journal of Food Biochemistry*, 41(1).
- Arias, C. (2014). Estudio de las posibles zonas de introducción de la moringa oleifera Lam. en la península ibérica, islas baleares e islas canarias.
- Azam, M., Waris, A., Nahar, N. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass and Bioenergy*, 29(4), 293-302. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.05.001>
- Bouayed, J. H., L; Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- Cano-Lamadrid, M. H., F; Corell, M; Burló, F; Legua, P; Moriana, A; Carbonell-Barrachina, Á A. (2017). Antioxidant capacity, fatty acids profile, and descriptive sensory analysis of table olives as affected by deficit irrigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2), 444-451.
- Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during Maturation. (2000). *J Agric Food Chem*, 48(5), 1485-1490. doi:10.1021/jf991072g
- FAO. Cultivo tradicional del mes: Moringa. Retrieved from <http://www.fao.org/traditional-crops/moringa/es/>
- FAO. Cultivo tradicional del mes: Moringa.
- Farooq, F., Rai, M., Tiwari, A., Khan, A., Farooq, S. (2012). *Medicinal properties of Moringa oleifera: An overview of promising healer* (Vol. 6).
- The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. (1996). *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. doi:<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Folkard, G., & Sutherland, J. (1996). Moringa oleifera: a tree and a litany of potential. *Agroforestry Today*, 8(3), 5-8.
- Folkard, G., Sutherland, J. (1996). Moringa oleifera un árbol con enormes potencialidades. 8, 5-8.

- Gaafar, A. A. I., E; Asker, M; Moustafa, A; Salama, D. (2016). *Characterization of Polyphenols, Polysaccharides by HPLC and Their Antioxidant, Antimicrobial and Antiinflammatory Activities of Defatted Moringa (Moringa oleifera L.) Meal Extract* (Vol. 8).
- Ghasi, S., Nwobodo, E., Ofili, J., (2000). Hypcholesterolemic effects of crude extract of leaf of Moringa oleifera Lam in high-fat diet fed wistar rats. *J Ethnopharmacol*, 69(1), 21-25.
- Gupta, R., Kannan, G., Sharma, M., Flora, S. (2005). Therapeutic effects of Moringa oleifera on arsenic-induced toxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(3), 456-464. doi:10.1016/j.etap.2005.05.005
- Hekmat, S., Morgan, K., Soltani, M., Gough, R. (2015). Sensory evaluation of locally-grown fruit purees and inulin fibre on probiotic yogurt in Mwanza, Tanzania and the Microbial Analysis of Probiotic Yogurt Fortified with Moringa oleifera. *J Health Popul Nutr*, 33(1), 60-67.
- Heo, H. K., Y; Chung, D; Kim, D. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87-92.
- Jongrungruangchok, S. (2010). Nutrients and minerals content of eleven different samples of Moringa oleifera cultivated in Thailand. *J Health Res*, 24(3), 123-127.
- Lalas, S. T., J. (2002). Characterization of Moringa oleifera Seed Oil Variety "Periyakulam 1". *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(1), 65-77.
- Mbikay, M. (2012). Therapeutic potential of Moringa oleifera leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 3 MAR. doi:10.3389/fphar.2012.00024
- Nkukwana, T., Muchenje, V., Masika, P., Hoffman, L., and Dzama, K., (2014). The effect of moringa oleifera leaf meal supplementation on tibia strength, morphology and inorganic content of broiler chickens. *South African Journal of Animal Sciences*, 44(3), 228-239. doi:10.4314/sajas.v44i3.4
- Olson, M. E., & Carlquist, S. . (2001). Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in Moringa (Moringaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 135, 315-348.
- Orwa, C. M., A; Kindt, R; Jamnadass, R; Simons, A. (2009). *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0*, World Agroforestry Centre, Kenya.
- Oyeyinka, A. T., and Oyeyinka, Samson.A., (2018). Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 127-136. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>

- Patel, S., Thakur, A.S., Chandy, A., and Manigauha, A. (2010). Moringa Oleifera: A Review of There Medicinal and Economical Importance to the Health and Nation. *Drug Invention Today*, 2(7), 339-342.
- Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S., Moyo, B., Masika, P., and Muchenje, V.,. (2013). Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Science*, 93(3), 455-462. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.009>
- Re, R. P., N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. doi:[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Saini, R., Shetty, N., Giridhar, P. (2014a). Carotenoid content in vegetative and reproductive parts of commercially grown *Moringa oleifera* Lam. cultivars from India by LC-APCI-MS. *European Food Research and Technology*, 238(6), 971-978. doi:10.1007/s00217-014-2174-3
- Saini, R., Shetty, N., Giridhar, P. (2014b). GC-FID/MS analysis of fatty acids in Indian cultivars of *Moringa oleifera*: Potential sources of PUFA. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 1029-1034. doi:10.1007/s11746-014-2439-9
- Saini, R. K., Sivanesan, I., & Keum, Y. S. (2016). Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech*, 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0526-3
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). 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*, 51(8), 2144-2155. doi:10.1021/jf020444+
- Stevens, P. F. (2017). Angiosperm Phylogeny.
- Tabart, J. K., C; Pincemail, J; Defraigne, J; Dommès, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.
- Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. (1995). *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)