

VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES, FENOLES, FLAVONOIDES Y TANINOS EN *Moringa oleifera* Lam. EN FUNCIÓN DE SU EDAD Y ALTURA

José L. Cabrera-Carrión¹, Carmita Jaramillo-Jaramillo¹, Fausto Dután-Torres¹, Jorge Cun-Carrión², Pedro A. García³ y Luisa Rojas de Astudillo⁴

RESUMEN

Las condiciones óptimas de producción de los metabolitos secundarios en plantas medicinales como *Moringa oleifera* resultan importantes para la elaboración de fitofármacos y productos nutricionales estables y seguros. De allí que el objetivo de esta investigación fue evaluar la variabilidad de su contenido de alcaloides, fenoles totales, flavonoides y taninos en *M. oleifera* en función de la edad y altura de la planta. Se tomaron muestras de hojas provenientes de la parte baja, intermedia y alta de plantas de moringa de 12, 15 y 18 meses de edad y se realizaron determinaciones cuantitativas de los principales metabolitos secundarios en el extracto acuoso usando espectrofotometría de absorción. Los resultados obtenidos indican concentraciones con intervalos de 0,58-0,77; 7,36-19,27; 11,83-34,85 y 0,71-4,43 mg·g⁻¹ para los alcaloides, fenoles totales, flavonoides y taninos, respectivamente. Estas concentraciones variaron significativamente ($P \leq 0,01$) en función de la edad y altura de la planta. Las mayores concentraciones de los metabolitos secundarios, a excepción de los alcaloides, se obtuvieron a la edad de 15 meses y en las hojas recolectadas en la altura intermedia de la planta. Estos resultados pueden ser útiles para la estandarización y asegurar la calidad de las potenciales aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas de esta planta medicinal en los procesos de dosificación para consumo humano.

Palabras clave adicionales: Metabolitos secundarios, plantas medicinales

ABSTRACT

Variation of alkaloid, phenol, flavonoid, and tannin content in *Moringa oleifera* Lam. as a function of plant age and height
The optimal conditions for production of secondary metabolites in medicinal plants, like *Moringa oleifera*, are advisable to develop stable and secure herbal medicines and nutritional products. The objective of this research was to evaluate the variability of the content of alkaloids, total phenols, flavonoids and tannins in the plant as affected by its age and height. Samples of leaves coming from the low, intermedium and high sections of the canopy of moringa plants with 12, 15 and 18 months age were taken, and quantitative determinations of those secondary metabolites in the aqueous extract were performed by using absorption spectrophotometry. The results indicate that the concentration ranges were 0.58-0.77, 7.36-19.27, 11.83-34.85 y 0.71-4.43 mg·g⁻¹ for alkaloids, total phenols, flavonoids and tannins, respectively. These concentrations varied significantly ($P \leq 0.01$) according to the age and plant height. The highest concentration of the secondary metabolites was obtained at the age of 15 months and when the plant reached intermedium height. These results may be useful for standardization and quality assurance of potential nutraceutical and pharmaceutical applications of this plant in the process of dosage for human consumption.

Additional key words: Medicinal plants, secondary metabolites

INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera Lam. es la más conocida y cultivada de las 13 especies del género *Moringa* de la familia Moringaceae (Olson, 2002). Aunque

se desconoce su estado silvestre natural, está comprobado por registros de herbario que este árbol se cultiva en todos los países tropicales del mundo (Olson y Fahey, 2011). La planta tiene una gran plasticidad ecológica, ya que es capaz de

Recibido: Abril 23, 2016

Aceptado: Diciembre 13, 2016

¹ Planta Piloto de Farmacia, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador. e-mail: joseluiscc-20@hotmail.com; cjaramillo@utmachala.edu.ec; fdutan_est@utmachala.edu.ec

² Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala, Ecuador. e-mail: jkun@utmachala.edu.ec

³ Dpto. de Estadística e I.O. Universidad de Granada. España. e-mail: pagarcia@ugr.es

⁴ Dpto. de Química, Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela. e-mail: lrojas40@yahoo.com

adaptarse a las más diversas condiciones de suelo, y tiene capacidad de resistencia a la sequía (Pérez et al., 2010; Sánchez et al., 2013). Su valor nutricional y los elevados rendimientos de biomasa la hacen un recurso fitogenético de importancia en los sistemas de producción (Pérez et al., 2010).

La planta ha sido utilizada como anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, antidiabético, fungicida, antibacterial y hepatoprotectora (Olson y Fahey 2011; Farooq et al., 2012; Padayachee y Baijnath, 2012). Sin embargo, varios investigadores expresan que la variación en estas propiedades es considerable y depende de factores genéticos, ambiente, métodos de cultivo y altura de la planta (Shih et al., 2011; Forster et al., 2015; Guzmán et al., 2015). Por ello, es necesario conocer las condiciones óptimas de producción de los compuestos bioactivos en esta planta, entre ellos los metabolitos secundarios, para producir fitofármacos y/o nutraceuticos estables y apropiados para su consumo.

Los metabolitos secundarios, en particular los alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos, son compuestos químicos que no actúan en el metabolismo primario de las plantas, pero intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Se sintetizan cuando las plantas están en condiciones adversas, entre ellas, el ataque por herbívoros, microorganismos y la presencia de diferentes especies que compiten por luz, agua y nutrientes (Sepúlveda et al., 2003; Granados et al., 2008). Además, tienen importancia por sus propiedades curativas y nutraceuticas (Padayachee, 2012, Leone et al., 2015). El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad de la concentración de los metabolitos secundarios mencionados en función de la edad y la altura de las hojas de la planta *M. oleifera*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de moringa, variedad PKM1, se sembraron en tres hileras (parcelas) a razón de 24 plantas por parcela, con separación de 2 m entre éstas y 1 m entre plantas, dentro de un lote establecido en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (3°16' S; 79°59' W; 6 msnm). Se seleccionaron, mediante muestreo aleatorio simple

sin reemplazo, diez plantas de la zona central de cada parcela, de acuerdo al calendario propuesto de 12, 15 y 18 meses después de la siembra. Se consideró este intervalo para los muestreos para permitir la mayor recuperación del follaje de la planta. Todas las cosechas se efectuaron mediante una poda en horas de la mañana. Cada planta fue dividida visualmente en tres diferentes alturas, denominadas baja, intermedia y alta. A partir de las muestras de las plantas de 12 meses se establecieron las siguientes medidas para las tres alturas definidas: baja de 0 hasta 2 m, intermedia de 2 hasta 5 m, y alta de 5 hasta 7 m. Sucesivamente, para las podas de las plantas de las edades siguientes (15 y 18 meses), se fijó que a cada altura se le sumaran 0,5 m con respecto a la edad anterior. Se recolectaron todas las hojas en cada una de las edades y a las diferentes alturas, seleccionando las hojas en buen estado y separándolas por grupos para el estudio. Para la colecta de las hojas en la parte alta, las plantas fueron cortadas previamente a esas alturas. De cada grupo se tomó una porción de 250 g de hojas frescas, suficiente para ser secadas para las determinaciones cuantitativas de los metabolitos secundarios (WHO, 2011).

El manejo del cultivo fue orgánico, dentro de un concepto agroecológico, sometido a riego por gravedad, para el control de maleza se empleó una roza mecánica (moto guadaña), los controles fitosanitarios no fueron necesarios, la única plaga que se presentó fue la hormiga *Atta* spp., la cual corta los folíolos de las hojas. Se logró controlar inmediatamente y evitar daños en el cultivo con cebos elaborados con arroz cocido e impregnado con levadura que se usa para la elaboración de pan.

Preparación de la muestra. Las hojas de la planta de las diferentes alturas, separadas por bajas, intermedias y altas en los diferentes tiempos de recolección, fueron previamente lavadas con agua destilada y secadas en una estufa con flujo de aire a 37 °C. Luego se trituraron con un molino Lab Mill AR 400 y se tamizaron en malla de 2 mm.

El extracto acuoso se preparó añadiendo 10 g del polvo de hojas en 40 mL de agua destilada a 95 °C mezclado y dejado en reposo por una hora. Luego, la mezcla se colocó en un filtro percolador y se le agregaron más 40 mL de agua destilada a 95 °C y después de 30 minutos se obtuvo el

extracto acuoso de las hojas a una concentración de $0,125 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Determinación de alcaloides. Se utilizó el método de Shamsa et al. (2008), basado en la reacción del alcaloide con verde de bromocresol (BCG). Se tomaron alícuotas (0,4, 0,6, 0,8, 1 y 1,2 mL) de una solución estándar de atropina de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se transfirieron cada una a diferentes embudos de decantación. A continuación, se añadieron 5 mL de un buffer de fosfato de pH 4,7 y 5 mL de la solución de BCG. Se agregó un total de 10 mL de cloroformo en volúmenes parciales de 2, 2, 3 y 3 mL en cada embudo de decantación y estos extractos de cloroformo se recogieron en un matraz aforado de 10 mL. La absorbancia del complejo en cloroformo se midió usando un espectrofotómetro UV-Visible a 470 nm frente a un blanco preparado con todos los reactivos y sin la atropina.

Para el análisis de las muestras, se aplicó el procedimiento anterior, sustituyendo en el embudo de decantación el volumen del estándar de atropina por 5 mL del extracto acuoso de cada muestra de hojas de *M. oleifera*. Todo el proceso fue realizado por triplicado por muestra.

Determinación de flavonoides. Se utilizó el método sugerido de Feltrin et al. (2012). A partir de una solución de Rutina ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) fueron preparadas las soluciones estándar de concentraciones 10, 20, 30, 40 y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ las cuales se utilizaron para generar la curva de calibración. Se tomó 1 mL de extracto acuoso de muestra de hojas de la planta y se diluyó hasta 10 mL con metanol. De esta solución diluida se tomaron 0,5 mL y se mezclaron con 2,5 mL de metanol, 0,5 mL de cloruro de aluminio al 2 %, se dejó en reposo por 60 min. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto acuoso de las muestras de hojas. Luego, la absorbancia del producto de la reacción de las soluciones de los estándares y de las muestras fue medida a la longitud de onda de 420 nm. El resultado fue expresado en mg equivalentes a Rutina por gramo de muestra seca.

Determinación de fenoles y taninos. Se empleó el procedimiento usado por Velásquez (2004) y Blainski et al. (2013). En este método, los compuestos fenólicos totales reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, produciendo un complejo de color azul. Del extracto acuoso de las muestras de hojas se tomó

1 mL y se diluyó hasta 50 mL con etanol. Se tomaron 2 mL de esta dilución y se mezclaron con 1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó en reposo durante cinco minutos. Luego se le añadieron 0,5 mL de carbonato de sodio al 5 %, la solución se agitó y se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada en un balón aforado que fue protegido de la luz (cubierto con papel aluminio y con luz tenue en el laboratorio). Después de 30 minutos de reacción se hicieron las determinaciones espectrofotométricas a 760 nm. Posteriormente, para garantizar el secuestro de los taninos, 20 mL del extracto diluido se mezclaron con 10 mL de una solución de gelatina al 10 %, 20 mL de la disolución ácida de NaCl y 2 g de caolín en polvo. La mezcla fue agitada durante unos 5 minutos, luego se dejó sedimentar para filtrar el decantado a través de un papel filtro Whatman # 42. Con el líquido filtrado se procedió de la misma forma que lo mencionado anteriormente con el reactivo de Folin Ciocalteu. Por la diferencia de ambas determinaciones se obtuvo la concentración de taninos. Todos los análisis fueron hechos por triplicado. Se usaron soluciones estándar de ácido gálico de concentraciones 0, 10, 20, 30, 40 y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para construir la curva de calibración. Las absorbancias de los productos de las reacciones de las soluciones estándares y de los extractos acuosos de las muestras de hojas fueron leídas en espectrofotómetro a 760 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes a ácido gálico por gramo de material seco.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza para evaluar la significación estadística de los niveles de los dos factores considerados (altura y edad). Previamente, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de la distribución de las variables dependientes (contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos) por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y test de Levene, respectivamente. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. En todos los análisis se utilizó el programa estadístico R (Core Team, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el análisis de varianza se pudo determinar que los cuatro metabolitos secundarios analizados presentaron variaciones significativas

($P \leq 0,05$), dependiendo de la edad (Cuadro 1) y de la altura de la planta (Cuadro 2). Los contrastes para los dos factores considerados se presentan como efectos principales ya que el análisis no detectó interacciones significativas entre ellos ($P > 0,05$). En comparación con las hojas a las edades de 12 y 15 meses, las hojas de 18 meses, en las tres diferentes alturas de la planta, presentaron las menores cantidades de flavonoides, taninos y fenoles, con excepción de los alcaloides los cuales no mostraron variación significativa (Cuadro 1). Se destacan los elevados contenidos de flavonoides, particularmente en las plantas de 15 meses de edad. Estos resultados están en correspondencia con otras investigaciones realizadas en *M. oleifera* y en otras especies vegetales, en las que encontraron que los metabolitos secundarios variaron de acuerdo a la edad de las hojas, demostrando que el estado de desarrollo de éstas afecta la biosíntesis y acumulación de estos compuestos químicos, siendo las hojas jóvenes maduras las que secretan mayor cantidad de ellos (Covelo y Gallardo, 2004; Iqbal y Bhangar, 2006; Valares et al., 2016).

Cuadro 1. Efecto de la edad de la planta sobre la concentración de metabolitos secundarios en hojas de *M. olerifera*

Edad (meses)	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Taninos
	(mg·g ⁻¹)			
12	0,68 a	13,00 a	22,88 a	2,95 a
15	0,66 a	13,62 a	24,88 a	3,64 a
18	0,65 a	9,10 b	13,99 b	1,06 b

Medias seguidas de letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey

Cuadro 3. Valores de la concentraciones de los metabolitos secundarios en hojas de *M. oleifera*, a la edad de 12 meses a diferentes alturas (promedio ± SE)

Altura (m)	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Taninos
	(mg·g ⁻¹)			
0-2	0,70 ± 0,01	13,40 ± 0,20	21,14 ± 0,08	3,44 ± 0,00
2-5	0,77 ± 0,02	16,38 ± 0,11	29,26 ± 0,73	4,43 ± 0,10
5-7	0,58 ± 0,01	9,22 ± 0,08	18,24 ± 0,02	0,98 ± 0,01

En el muestreo realizado a los 12 meses de edad de la planta se observa que en la mayor altura (intervalo 5-7 m) hubo la tendencia de que los metabolitos secundarios estudiados

($P \leq 0,05$)

Por otra parte, también se observa que los fenoles y flavonoides mostraron mayores contenidos ($P \leq 0,05$) en las hojas de la parte media de *M. oleifera*, en promedio de las tres edades estudiadas (Cuadro 2), pero no hubo diferencias en los taninos. La disminución en el contenido de taninos probablemente se deba a su polimerización y a la formación de complejos con proteínas y mucopolisacáridos (Macheix et al., 1990).

Es importante señalar la habilidad de *M. oleifera* para regular el contenido de los metabolitos secundarios en los órganos fotosintéticos, la cual es una ventaja para los posibles cambios climáticos que puedan ocurrir, con incrementos de temperatura y radiaciones UV-B (Ballaré et al., 2011).

En los Cuadros 3, 4 y 5 se presentan los promedios individuales, incluyendo el error estándar, de las concentraciones obtenidas en los metabolitos estudiados a los 12, 15 y 18 meses de edad en *M. oleifera*.

Cuadro 2. Efecto de la altura de la hoja en la planta sobre la concentración de metabolitos secundarios en *M. olerifera*

Altura (posición)	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Taninos
	(mg·g ⁻¹)			
Baja	0,73 a	11,77 ab	18,60 b	2,64 a
Intermedia	0,68 b	14,98 a	27,01 a	3,03 a
Alta	0,58 c	8,97 b	16,14 b	1,97 a

Medias seguidas de letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

disminuyeran en las hojas de la planta (Cuadro 3). Este muestreo se realizó en el mes de marzo, en el cual hubo mayor pluviosidad (56,0 mm) lo cual trae como consecuencia mayor presencia de

insectos, en particular en el sitio de colecta (Stewart y Lowe, 2013). La presencia de insectos pudo haber influido en que los alcaloides y los taninos hayan incrementado en las hojas de altura intermedia. La planta incrementa las concentraciones de alcaloides y polifenoles en el

follaje debido a sus potenciales efectos tóxicos contra herbívoros e insectos (Coley, 1988; Macel et al., 2005). También se ha reportado que la síntesis de alcaloides se aumenta en respuesta a la herida producida por los insectos depredadores (Sepúlveda et al., 2003).

Cuadro 4. Valores de la concentraciones de los metabolitos secundarios en hojas de *M. oleifera*, a diferentes alturas a la edad de 15 meses (promedio \pm SE)

Altura (m)	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Taninos
0,0 - 2,5	0,75 \pm 0,03	11,27 \pm 0,17	21,42 \pm 0,98	2,88 \pm 0,10
2,5 - 5,5	0,65 \pm 0,02	19,27 \pm 0,08	34,85 \pm 1,11	3,95 \pm 0,25
5,5 - 7,5	0,58 \pm 0,02	10,32 \pm 0,06	18,36 \pm 0,18	4,08 \pm 0,12

Cuadro 5. Valores de la concentraciones de los metabolitos secundarios en hojas de *M. oleifera*, a diferentes alturas a la edad de 18 meses (promedio \pm SE)

Altura (m)	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Taninos
0 - 3	0,75 \pm 0,02	10,65 \pm 0,09	13,24 \pm 0,06	1,60 \pm 0,05
3 - 6	0,62 \pm 0,03	9,30 \pm 0,08	16,91 \pm 0,04	0,71 \pm 0,06
6 - 8	0,58 \pm 0,02	7,36 \pm 0,05	11,83 \pm 0,11	0,86 \pm 0,08

A la edad de 15 meses de la planta (Cuadro 4) se nota que, al igual que a los 12 meses, se produjeron las mayores concentraciones de flavonoides y fenoles en la altura intermedia (2,5 a 5,5 m), mientras que a la mayor altura (5,5-7,5 m) los promedios más bajos correspondieron a los flavonoides, fenoles y alcaloides.

La menor precipitación mensual (10,5 mm) ocurrió durante la fecha de este muestreo, en el mes de junio, momento en que las hojas intermedias presentaron las mayores concentraciones de flavonoides y fenoles. Karabourniotis y Fasseas (1996) mencionaron que las hojas jóvenes e inmaduras son escasas de epidermis y, por lo tanto, los polifenoles pueden servir de protección a la hoja en contra de varios factores ambientales como las radiaciones solares, en particular las del tipo UV-B (Jansen et al., 1998; Tattini et al., 2000) y al ataque de microorganismos patógenos, insectos y herbívoros (Martínez et al., 2000; Sepúlveda et al., 2003; Sosa et al., 2004). Por otra parte, los taninos constituyen la principal fracción fenólica responsable de producir las características de astringencia y/o amargas de las especies vegetales (Ozawa et al., 1987), y por ende, resultan

desagradables para los depredadores de la planta. No obstante, las concentraciones detectadas en los taninos, fueron bajas, considerándose de aceptabilidad para el consumo como forraje (Diagayete y Huss, 1981).

En el Cuadro 5 se observa que a los 18 meses existieron importantes concentraciones de taninos, fenoles y alcaloides en la menor altura (0-3 m), excepto los flavonoides cuyos promedios fueron más notorios en la altura intermedia (3-6 m). Las condiciones estresantes en las plantas producen altas concentraciones de los nocivos radicales libres (Halliwell, 1987; Iturbe et al., 1998), de forma que la presencia de flavonoides sería deseable por sus funciones como antioxidantes (Chakraborty et al., 2015).

En general, los valores de flavonoides estuvieron entre 11,83 y 34,85 mg·g⁻¹. El resultado obtenido (34,85 mg·g⁻¹), a la edad de 15 meses y a la altura de 2,5-5,5 m, fue cercano al de Singh et al. (2009), de 31,28 mg·g⁻¹ (0,33%). También, Charoensin (2014) reportó 40,14 mg·g⁻¹ de flavonoides, y Mukunzi et al. (2011) consiguieron 39,08 mg·g⁻¹ de flavonoides. Sin embargo, ninguna de esas publicaciones refirió las edades ni a que alturas de la planta se produjeron

esos resultados.

Los valores de las concentraciones de taninos se hallaron entre 0,71 y 4,43 mg·g⁻¹. El resultado promedio obtenido a los doce meses a una altura de 0-2 m, de 3,44 mg·g⁻¹, fue muy similar al resultado (3,30 mg·g⁻¹) de Olufunke (2012).

De manera aproximada a los resultados de García et al. (2006) en hojas de *M. oleifera*, las concentraciones de los taninos fueron bajas. Los taninos a altas concentraciones son considerados antinutricionales, debido a que forman complejos insolubles con proteínas, carbohidratos y otros polímeros del alimento, lo cual disminuye su digestibilidad (Chaparro et al., 2009). Lo anterior sugiere que las hojas de *M. oleifera* son una buena alternativa como alimento suplementario en los sistemas de producción en el trópico.

La variabilidad del contenido de fenoles fue notable, los cuales estuvieron entre 7,36 y 19,27 mg·g⁻¹. Los valores fueron relativamente menores al obtenido (24,65 mg·g⁻¹) por Mukunzi et al. (2011).

Para alcaloides, los valores obtenidos estuvieron comprendidos entre 0,58 y 0,77 mg·g⁻¹. Al comparar el resultado obtenido de 0,70 mg·g⁻¹, a los doce meses y a una altura entre 0-2 metros, fue similar al valor publicado por Madukwe et al. (2013), en extracto acuoso (0,70 mg·g⁻¹); sin embargo, no refieren ni la edad ni la madurez de la planta.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte conocido de evaluación de la variabilidad del contenido de metabolitos secundarios dependiendo de la edad y la altura de *M. oleifera*. Se destaca que la evaluación fue realizada en el campo, en áreas cultivadas, donde la planta mostró que sus hojas son un fuente segura de metabolitos secundarios que pueden ser usados como ingredientes farmacéuticos, nutracéuticos y funcionales.

Las hojas jóvenes de la planta a los 15 meses después de la siembra pueden ser usadas como antioxidantes y para otras propiedades terapéuticas que requieren altas concentraciones de flavonoides.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto Prometeo de la Secretaría de

Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador por su patrocinio en este trabajo. A la Universidad Estatal de la Península de Santa Elena y al Sr. Francisco Cantón por el aporte de las semillas de *M. oleifera*.

LITERATURA CITADA

1. Ballaré, C.L., M. Caldwell, S.D. Flint, S.A. Robinson y J.F. Bornman. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Science* 10: 226-241.
2. Blainski, A., G. Cristiny, G. Lopes y J. Palazzo de Mello. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865.
3. Chakraborty, K., S. Bhattacharjee, T. Kumar Pal y S. Bhattacharyya. 2015. Evaluation of *in vitro* antioxidant potential of Tea (*Camelia sinensis*) leaves obtained from different heights of Darjeeling Hill, West Bengal. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5(1): 63-68.
4. Chaparro-Acuña, S.P., I. Aristizábal-Torres y J.H. Gil González. 2009. Composición y factores antinutricionales de las semillas del género *Mucuna*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 62(1): 4843-4853.
5. Charoensin, S. 2014. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plant Research* 8(7): 318-325.
6. Coley, P.D. 1988. Effects of plant growth rate and leaf time on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* 74: 531-536.
7. Core Team R. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. <http://www.R-project.org/> (consulta del 20/12/2016).
8. Covelo, F. y A. Gallardo. 2004. Green and senescent leaf phenolics showed spatial autocorrelation in a *Quercus robur* population in northwestern Spain. *Plant Soil* 259: 267-276.

9. Diabayete, M. y W. Huss. 1981. Tannin contents of African pasture plants: Effects on analytical data and *in vitro* digestibility. *Animal Research and Development* 15: 79-90.
10. Farooq, F., M. Rai, A. Tiwari, A. Arif y S. Farooq. 2012. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(27): 4368-4374.
11. Feltrin, A., V. Boligon y M. Janovik. 2012. Antioxidant potential, total phenolic and flavonoid contents from the stem bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. *Asian Journal of Biological Sciences* 5(5):1-5.
12. Forster, N., C. Ulrichs, M. Schreiner, N. Arndt, R. Schmidt y I. Mewis. 2015. Ecotype variability in growth and secondary metabolite profile in *Moringa oleifera*: Impact of sulfur and water availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 2852-2861.
13. García, D.E., M.G. Medina, C. Domínguez, A. Baldizán, J. Humbría y L. Cova. 2006. Evaluación química de especies no leguminosas con potencial forrajero en el estado Trujillo, Venezuela. *Zootecnia Tropical* 24(4): 401-415.
14. Granados-Sánchez, D., P. Ruíz-Puga y H. Barrera-Escorcia. 2008. Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(1): 51-63.
15. Guzmán-Maldonado, S., A. Zamarripa-Colmenares y L.G. Hernández-Duran. 2015. Calidad nutrimental y nutraceútica de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(2): 317-330.
16. Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids* 44: 327-340.
17. Iqbal, S. y M.I. Bhangar. 2006. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 544-551
18. Iturbe-Ormaetxe, I., P.R. Escuredo, C. Arrese-Igor, y M. Becana. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology* 116(1): 173-181.
19. Jansen, M.A., V. Gaba y B.M. Greenberg. 1998. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3: 131-135.
20. Karabourniotis, G. y C. Fasseas. 1996. The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany* 74: 347-351.
21. Leone, A., A. Spada, A. Battezzati, A. Schiraldi, J. Aristil y S. Bertoli. 2015. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 12791-12835.
22. Macel, M., M. Bruinsma, S.M. Dijkstra, T. Ooijendijk, H.M. Niemeyer y P.G. Klinkhamer. 2005. Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1493-1508.
23. Macheix, J., A. Fleuriet y J. Billot. 1990. *Fruit phenolics*. CRC Press. Boca Raton, FL.
24. Madukwe, E, J. Ezeugwu y P. Eme. 2013. Nutrient composition and sensory evaluation of dry *Moringa oleifera* aqueous extract. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 13(3): 100-102.
25. Martínez-Valverde, I., M.J. Periago y G. Ros. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(1): 5-18.
26. Mukunzi, D., J. Atindana, Z. Xiaoming, A. Gahungu, E. Karangwa y G. Mukamurezi. 2011. Comparison of volatile profile of *Moringa oleifera* leaves from Rwanda and China using HS-SPME. *Asian Network for Scientific Information* 10(7): 602-608.
27. Olson, M. y J. Fahey. 2011. *Moringa oleifera*: Un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(4): 1071-1082.
28. Olson, M.E. 2002. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae. *Systematic Botany* 27: 55-73.
29. Olufunke, A. 2012. Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in

- South-Western Nigeria. *Malaysian Journal of Microbiology* 8(2): 59-67.
30. Ozawa, T., T.H. Lilley y E. Haslan. 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* 26: 2937-2942.
31. Padayachee, B. y H. Baijnath. 2012. An overview of the medicinal importance of Moringaceae. *Review Journal of Medicinal Plants Research* 6(48): 5831-5839.
32. Pérez, A., T. Sánchez, N. Armengol y F. Reyes. 2010. Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*. 33(4): 1-16.
33. Sánchez-Peña, Y., G. Martínez-Ávila, S. Sinagawa-García y J. Vázquez-Rodríguez. 2013. *Moringa oleifera*; Importancia, funcionalidad y estudios involucrados. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 5(9): 25-30.
34. Sepúlveda, G., H. Porta Ducoing y M. Rocha Sosa. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3): 355-363.
35. Shamsa, F., H. Monsef, R. Ghamooshi y M. Verdian-Rizi. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 32: 17-20.
36. Shih, M.C., C.M. Chang y M.L. Tsai. 2011. Effect of different parts (Leaf, Stem and Stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 6077-6088.
37. Singh, B., R. Singh, D. Prakash, R. Dhakarey, G. Upadhyay y H. Singh. 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology* 47(6): 1109-1116.
38. Sosa, T., N. Chaves, J.C. Alías, J.C. Escudero, F. Henao y C. Gutiérrez-Merino. 2004. Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 30: 1087-1101.
39. Stewart-Ibarra, A. y R. Lowe. 2013. Climate and non-climate drivers of dengue epidemics in southern coastal Ecuador. *The American Journal of Tropical medicine and Hygiene* 88(5): 971-981.
40. Tattini, M., E. Gravano, P. Pinelli, N. Mulinacci y A. Romani. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148: 69-77.
41. Valares-Masa, C., T. Sosa-Díaz, J. Alías-Gallego y N. Chaves-Lobón. 2016. Quantitative variation of flavonoids and diterpenes in leaves and stems of *Cistus ladanifer* L. at different ages. *Molecules* 21: 275-288.
42. Velásquez, A. 2004. Extracción de taninos presentes en el banano verde. *Revista Lasallista de Investigación* 1(2): 17-22.
43. WHO (World Health Organization). 2011. *Quality Control Methods for Herbal Materials*. WHO Press. Geneva, Switzerland. 173 p.