

## Calidad nutrimental y nutracéutica de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura\*

### Nutraceutical and nutritional quality of moringa leaf from trees of different height

Salvador Horacio Guzmán-Maldonado<sup>1§</sup>, Alfredo Zamarripa-Colmenares y Lesly Guadalupe Hernández-Duran<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biotecnología. Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel Allende Celaya, km 6.5, Guanajuato. C. P. 38110. México. Tel: 01 461 611 5323. Ext. 183. <sup>2</sup>Programa de Bioenergéticos-Campo Experimental Izapa Chiapas. (zamarripa.alfredo@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Division de Ciencias de la Salud e Ingeniería, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, Av. Juan Paplo II s/n, Celaya, Guanajuato, México. (lamaiki811@hotmail.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: guzman.horacio@inifap.gob.mx.

#### Resumen

Recientemente la moringa se ha introdujo en Guanajuato; sin embargo, los árboles no crecen en forma uniforme, hay diferencias de hasta 225 cm. El objetivo fue evaluar la calidad nutrimental y nutracéutica de la hoja de árboles de diferente tamaño. Las hojas se cosecharon en abril de 2013 en la huerta recién introducida por el INIFAP en Celaya, Guanajuato. Se determinó la calidad nutrimental por su composición química y contenido de calcio y hierro y la calidad funcional por el contenido de vitamina C, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. El contenido de proteína de las hojas de los árboles de 100 cm fue mayor (24.7%) que el de los árboles de 25 (21.1%) y 250 cm (22.3%), y menor al de la muestra comercial de Oaxaca (29.3%). Cien gramos de hoja de los árboles de 25, 100 y 250 cm pueden contribuir con el 107, 91.7 y 74%, del requerimiento diario de vitamina C. La hoja de la moringa de los árboles es mejor fuente de calcio y hierro, vitamina C, fenoles, taninos que las muestras comerciales. Lo mismo se aplica para la capacidad antioxidante. La hoja de la moringa presenta mejores propiedades nutracéuticas que el perejil, orégano, tomillo y epazote. Estos resultados demuestran la falta de uniformidad al preparar las mezclas comerciales y que el manejo apropiado puede lograr mejorar la calidad

#### Abstract

Moringa has been recently introduced in Guanajuato; however, the trees do not grow evenly, there are differences of up to 225 cm. The objective was to evaluate the nutritional and nutraceutical quality of leaf from trees of different sizes. The leaves were harvested in April 2013 in the newly-introduced garden by INIFAP in Celaya, Guanajuato. Nutritional quality for its chemical composition and content of calcium and iron and functional quality for vitamin C content, phenolic compounds and antioxidant capacity were determined. The protein content of the leaves from trees of 100 cm was higher (24.7%) than trees of 25 (21.1%) and 250 cm (22.3%), and lower than the commercial sample from Oaxaca (29.3%). One hundred grams of leaf from trees of 25, 100 and 250 cm can contribute with 107, 91.7 and 74% of the daily requirement of vitamin C. Moringa leaf of the tree is a better source of calcium and iron, vitamin C, phenols, tannins than the commercial samples. The same applies for antioxidant capacity. Moringa leaf has better nutraceutical properties than parsley, oregano, thyme and epazote. These results show the lack of uniformity in preparing commercial mixtures and appropriate management can achieve better quality of moringa leaf for commercial purposes. This is the first report on the quality of leaf from Mexican materials of moringa.

\* Recibido: junio de 2014  
Aceptado: noviembre de 2014

de la hoja de moringa para propósitos comerciales. Este es el primer reporte de la calidad de la hoja de materiales mexicanos de moringa.

**Palabras clave:** antioxidante, calidad de la hoja, compuestos fenólicos, moringa, nutrimental.

## Introducción

El árbol de moringa (*Moringa oleifera*) es originario del sur de los Himalayas y el noroeste de la India y pertenece a la familia de las *Moringaceas*. Esta especie crece en zonas tropicales por debajo de los 500 msnm; sin embargo, puede adaptarse a las condiciones edafo-climáticas por arriba de los 1 500 msnm en ausencia de heladas (Olson y Fahey, 2011). Se cree que la especie fue introducida a México por los marineros filipinos que llegaban al puerto de Acapulco y que de ahí se extendió hasta su actual distribución por toda la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California (Olson y Fahey, 2011). La planta es muy versátil pudiéndose aprovechar todas sus partes. Por ejemplo, las semillas se han utilizado en la medicina tradicional, como floculante para purificar agua o para la producción de aceite (Rashid *et al.*, 2008; Del Toro, 2011). Las vainas son utilizadas como alimento y fertilizante y también se le atribuyen propiedades medicinales al igual que las flores, hojas, corteza y raíces (Fahey, 2005).

La hoja de la moringa ha sido utilizada para consumo humano y animal por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales. Se ha demostrado de aumenta el rendimiento de carne en animales y puede combatir la desnutrición de poblaciones infantiles y maternas desprotegidas (Fahey, 2005; Anwar *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2011). También se ha reportado que la hoja tienen un efecto antiparasitario y curativo en animales (Anwar *et al.*, 2007). Sin embargo, la variación considerable en las propiedades nutrimentales de la moringa es considerable y depende de factores genéticos, medio ambiente y métodos de cultivo (Brisibe *et al.*, 2009).

En los últimos años la hoja seca de la moringa se ha vuelto muy popular en México y otros países particularmente para preparar infusiones (tés) a los que se les atribuyen propiedades anti escleróticas (Chumarka *et al.*, 2008), antioxidante (Verma *et al.*, 2009) y para bajar de peso (dicho popular). A la hoja de la moringa y los té se le atribuyen otras propiedades benéficas como antimicrobiana, antibacteriana,

**Keywords:** antioxidant, leaf quality, moringa, nutritional, phenolic compound.

## Introduction

Moringa tree (*Moringa oleifera*) is native frp, southern and northwestern Himalayas of India and belongs to the family of *Moringaceas*. This species grows in tropical areas below 500 masl; however, it can adapt to edapho-climatic conditions above 1 500 masl in the absence of frost (Olson and Fahey, 2011). It is believed that the species was introduced to Mexico by Filipino sailors who came to Acapulco and from there it spread to its current distribution throughout the Pacific coast, from southern Sonora to Chiapas, including the southern peninsula of Baja California (Olson and Fahey, 2011). The plant is very versatile since all its parts can be used. For example, the seeds have been used in traditional medicine as flocculent to purify water or for the production of oil (Rashid *et al.*, 2008; Del Toro, 2011). The pods are used as food and fertilizer and is also attributed medicinal properties like flowers, leaves, bark and roots (Fahey, 2005).

Moringa leaf has been used for human and animal consumption for its high content of protein, vitamins and minerals. It has been shown to increase the yield of meat in animals and can fight infant and maternal malnutrition in unprotected populations (Fahey, 2005; Anwar *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2011). It has also been reported that leaf has an anti-parasitic and curative effect in animals (Anwar *et al.*, 2007). However, considerable variation in nutritional properties of Moringa is considerable and depends on genetic factors, environment and culture methods (Brisibe *et al.*, 2009).

In recent years dried leaf of Moringa has become very popular in Mexico and other countries, particularly to prepare infusions (teas) to which are attributed anti sclerotic (Chumarka *et al.*, 2008), antioxidant (Verma *et al.*, 2009) and weight loss (people said) properties. To moringa leaf and teas are attributed other beneficial properties as antimicrobial, antibacterial, antiviral, antiparasitic, anti-cancer, anti-anemic, anti-diabetic and anti-diuretic, among other characteristics (Fahey, 2005).

Cultivation of moringa leaf was introduced by the National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) in the state of Guanajuato in 2012. However, it was observed

antiviral, antiparasitaria, contra el cáncer, anti anémica, antidiabética y antiurética, entre otras características (Fahey, 2005).

El cultivo de la hoja de la moringa fue introducido por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el estado de Guanajuato en 2012. Sin embargo, se ha observado que el crecimiento de los árboles no es uniforme, presentando un rango muy amplio en su altura. Este comportamiento no se observa en los trópicos donde las condiciones climáticas son óptimas y los árboles presentan un crecimiento y en consecuencia, un estado fenológico, uniforme. Dado que las hojas de estos árboles se cosechan para ser procesadas y comercializadas en el mismo estado fenológico, la calidad nutrimental y nutracéutica debe ser uniforme y de calidad aceptable. Por el contrario, la hoja del estado de Guanajuato se cosecha de árboles que van de 25 y 250 cm de alto. La mezcla de hojas proveniente de árboles en estados fenológicos tan opuestos pudiera afectar la calidad de los productos a ofrecer al consumidor.

Se desconoce si la composición nutrimental y nutracéutica se ve afectada cuando se mezclan hojas de árboles con diferente estado fenológico. Esta información permitiría conocer la calidad de los productos de la moringa provenientes de Guanajuato que se ofrecen al consumidor. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tamaño del árbol sobre la calidad nutrimental y nutracéutica de la hoja de moringa. Los resultados podrán ser utilizados por los programas de mejoramiento de la especie así como los productores de hoja de moringa que tengan la intención de introducir el cultivo fuera de las zonas tropicales.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Los árboles de la huerta localizada en Celaya, Guanajuato, se separaron por su altura en tres grupos: 25, 100 y 250 cm. Por otro lado, la huerta se dividió en seis áreas para abarcar todo el plantío. En cada una de las seis áreas se cosecho hoja por separado de acuerdo a la altura de los árboles. La hoja fue cosechada en el mes de abril de 2013 a primera hora de la mañana. Inmediatamente después de la cosecha la hoja se trasladó al laboratorio para secarse a la sombra hasta una humedad de 5% y se almacenó a -20 °C hasta

that the growth of the trees is not uniform, presenting a wide range in height. This behavior is not observed in the tropics where climatic conditions are optimal and the trees present a uniform growth and consequently a growth stage. Since the leaves of these trees are harvested to be processed and marketed in the same growth stage, the nutritional and nutraceutical quality should be uniform and of acceptable quality. On the contrary, the leaf from the state of Guanajuato is harvested of trees ranging from 25 to 250 cm high. The mixture of leaves from trees in growth stages are so opposed that may affect the quality of products offered to consumers.

It is unknown whether nutritional and nutraceutical composition is affected when tree leaves are mixed with different growth stages. This information would allow knowing the quality of moringa products from Guanajuato offered to consumers. The aim of this study was to evaluate the effect of tree size on nutritional and nutraceutical quality of moringa leaf. The results may be used by breeding programs of the species as well as moringa leaf producers who intend to introduce the crop outside the tropics.

## Materials and methods

### Biological material

The orchard trees located in Celaya, Guanajuato, were separated by their height in three groups: 25, 100 and 250 cm. On the other hand, the orchard was divided into six areas to cover the plantation. In each of the six areas leaf was harvested separately according to the height of the trees. The leaf was harvested in the month of April 2013 early in the morning. Immediately after harvesting the leaf was transported to the laboratory to be dried under shade to a moisture content of 5% and stored at -20 °C until analysis. After drying, the leaves were thoroughly mixed separately according to height of the trees having a total of six replicates (n= 6). For comparative purposes six samples of a batch of leaves previously prepared by the managers of the orchard that will be identified as MPH (sample prepared in the orchard). This batch of moringa leaves was prepared with harvested leaves from indiscriminately different tree size, including leaves from previous harvest that did not make it to the market. Also a commercial sample from the tropical south of Oaxaca was acquired.

su análisis. Después de secarse, las hojas se mezclaron perfectamente por separado según la altura de los árboles haciendo un total de seis repeticiones ( $n=6$ ). Con fines comparativos se tomaron seis muestras de un lote de hojas previamente preparadas por los encargados de la huerta que será identificada como MPH (muestra preparada en la huerta). Este lote de hojas de moringa se preparó con hojas cosechadas indiscriminadamente de diferente tamaño de árbol, inclusive de hojas de cosechas anteriores que no salieron al mercado. También se adquirió una muestra comercial proveniente de la zona tropical del sur de Oaxaca.

### Calidad nutrimental

El contenido de nitrógeno (ref. 960.52), extracto etéreo (ref. 920.85) y ceniza (ref. 923.03) fue determinado con métodos aprobados por la AOAC (2000). La fibra dietaria fue determinado por el método de Prosky *et al.* (1988). El porcentaje restante se consideró que representaba a los carbohidratos. El factor de conversión de nitrógeno a proteína total fue de 6.25 ( $N \times 6.25$ ). El hierro y calcio se determinaron después de someter la hoja de moringa a una digestión con  $\text{HClO}_4/\text{HNO}_3$ , con un equipo de emisión atómica (3000SC, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

### Calidad funcional

#### Vitamina C

La vitamina C fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con el procedimiento descrito por Corral-Aguayo *et al.* (2008). Brevemente, a una muestra de hoja (1 g) se le añadieron 10 mL de una solución de extracción (ácido cítrico 0.1 M y 0.05% de EDTA a pH 2.35-2.4), se agitó, centrifugó (5000 rpm, 10 min) y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se tomaron 1.5 ml del extracto y se le adicionó 0.5 ml de 1, 2-fenilendiamina preparada en metanol/agua (5:95 v/v) y se incubó por 37 min en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, la muestra se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectó al equipo de HPLC. Se utilizó una columna SB-C-18 marca Zorbax (150 X 4.6 mm) y cetrimida (5 mM) (hexadecyltrimethylammonium bromide) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM (metanol/agua, 1:9, v/v, pH 4.6) como fase móvil. El flujo fue de 1.5 ml/min. El ácido ascórbico fue monitoreado a 261 nm y el dehidroascórbico a 348. Para la determinación se realizaron curvas de calibración para cada uno de los estándares. El contenido de vitamina C se reporta como la

### Nutritional quality

Nitrogen content (ref. 960.52), ether extract (ref. 920.85) and ash (ref. 923.03) was determined with approved methods by the AOAC (2000). Dietary fiber was determined by the method of Prosky *et al.* (1988). The remained percentage was considered to represent carbohydrates. The conversion factor of nitrogen to total protein was 6.25 ( $N \times 6.25$ ). Iron and calcium were determined after subjecting the moringa leaf to digestion with  $\text{HClO}_4/\text{HNO}_3$ , with an equipment of atomic emission (3000SC, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

### Functional quality

#### Vitamin C

Vitamin C was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the procedure described by Corral-Aguayo *et al.* (2008). Briefly, to a leaf sample (1 g) were added 10 ml of an extraction solution (citric acid 0.1 M and EDTA 0.05% at pH 2.35-2.4), stirred, centrifuged (5 000 rpm, 10 min) and the supernatant was recovered. Subsequently 1.5 ml of the extract was taken and added 0.5 ml of 1, 2-phenylenediamine prepared in methanol/water (5:95 v/v) and incubated for 37 min in the dark. After this time, the sample was filtered through a nylon membrane 0.45  $\mu\text{m}$  and injected to the HPLC equipment. A column SB-C-18 Zorbax (150 X 4.6 mm) and cetrimide (5 mM) (hexadecyltrimethylammonium bromide) and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM (methanol/water, 1:9, v/v, pH 4.6) as mobile phase were used. The flow was 1.5 ml/min. Ascorbic acid was monitored at 261 nm and dehydroascorbic to 348. For the determination, calibration curves for each of the standards were made. Vitamin C content is reported as the amount of ascorbic acid and dehydro ascorbic in mg/100 g of dry sample; comparing with the retention time and spectrum of commercial standards (Sigma).

### Total soluble phenols

The Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) was used to determine total soluble phenols. The crude extract was obtained by adding 50 mg of leaf, 20 ml of methanol (30%) in deionized water. Subsequently the sample was stirred for 10 min at 8000 rpm; after this time, centrifuged for 10 min (5 000 rpm) and the supernatant was recovered. An aliquot of 125  $\mu\text{L}$  of the crude extract was taken and added 500  $\mu\text{L}$  of deionized water and stirred a few seconds (3000 rpm). After

suma del ácido ascórbico y el dehidro ascórbico en mg/100 g de muestra seca. Comparando con el tiempo de retención y el espectro de estándares comerciales (SIGMA).

### Fenoles solubles totales

Para la determinación de los fenoles solubles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). El extracto crudo se obtuvo añadiendo a 50 mg de hoja 20 ml de metanol (30%) en agua desionizada. Posteriormente la muestra se agitó por 10 minutos a 8 000 rpm; transcurrido este tiempo, se centrifugó por 10 min (5 000 rpm) y el sobrenadante se recuperó. Se tomó una alícuota de 125  $\mu$ L del extracto crudo y se le adicionaron 500  $\mu$ L de agua desionizada y se volvió a agitar unos segundo (3 000 rpm). Posteriormente se le añadieron 125  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. La muestra se dejó reposar en la obscuridad por 6 min y luego se le agregaron 1.25 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7% en agua) y 1 ml de agua desionizada. La muestra se volvió a brevemente y se dejó reposar en la obscuridad durante 90 min. Después del reposo, se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6405, UV/Vis). Junto con la muestra se preparó un blanco con la misma cantidad de reactivo, pero sin el extracto crudo y el reactivo de Folin. Las lecturas de las muestras se compararon con una curva estándar de ácido gálico y se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra seca (mg EAG/100 g, bs).

### Taninos condensados

Estos compuestos fueron determinados con el método de la vainillina a partir de un extracto crudo obtenido a partir de 1 g de hoja seca a la cual se le añadieron 10 ml de metanol absoluto (Deshpande y Cheryan 1985). La muestra se agitó (8 000 rpm, 20 min), se adicionó 1 g de carbón activado, se centrifugó (5 000 rpm, 10 min) y se recuperó el sobrenadante. Los taninos condensados se determinaron en 1 ml del extracto crudo al que se le adicionaron 5 ml de reactivo de vainillina recién preparado (vainillina 1% en metanol y ácido clorhídrico 8% en metanol 1:1). Se dejó reposar en baño María durante 20 min a 30 °C. Inmediatamente después se leyó la absorbancia de la muestra a 500 nm en un espectrofotómetro. Al mismo tiempo se preparó un factor de corrección con 1 ml del extracto crudo al que se le añadieron 5 ml de ácido clorhídrico (4%) en metanol en lugar del reactivo de vainillina. Los taninos condensados se cuantificaron comparando las lecturas con una curva estándar de catequina y se reportaron como mg equivalentes de catequina (mg EC)/100 g de muestra seca.

was added 125  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent. The sample was left to stand in the dark for 6 min and then added 1.25 ml of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7% in water) and 1 ml of deionized water. The sample was stirred briefly and allowed to stand in the dark for 90 min. After standing, the absorbance at 750 nm in a spectrophotometer (JENWAY 6405, UV / Vis) was read. Along with the sample a reference with the same amount of reagent was prepared, but without the crude extract and the Folin reagent. Sample readings were compared to a standard curve of gallic acid and reported as milligrams of gallic acid equivalents per 100 grams of dry sample (mg EAG / 100 g, bs).

### Condensed tannins

These compounds were determined by the method of vanillin from a crude extract obtained from 1 g of dry leaf to which was added 10 ml of absolute methanol (Deshpande and Cheryan 1985). The sample was stirred (8 000 rpm, 20 min), 1 g of activated charcoal was added, and centrifuged (5 000 rpm, 10 min) and supernatant was recovered. Condensed tannins were determined in 1 ml of the crude extract to which added 5 ml of freshly prepared vanillin reagent (vanillin 1% in methanol and hydrochloric acid 8% in methanol 1:1); allowed to stand in a water bath for 20 min at 30 °C. Immediately after the sample absorbance at 500 nm was read in a spectrophotometer. At the same time a correction factor with 1 ml of the crude extract to which was added 5 ml of hydrochloric acid (4%) in methanol instead of vanillin reagent was prepared. Condensed tannins were quantified by comparing the readings with a catechin standard curve and reported as mg catechin equivalents (mg CE) / 100 g of dry sample.

### Simple phenolics compounds

HPLC analysis of phenolic compounds was performed with a reverse phase separation that took place in a Zorbax octadecylsilane (ODS)-C18 (particle size 5  $\mu$ m, 15 cm \* 4.6 mm i.d.) column. In addition to the column was also used a Zorbax ODS-C18 pre column. The mobile phase conditions were identical to those used by Ramamurthy *et al.* (1992): the mobile phase was given at 1.5 ml  $\text{min}^{-1}$  and consisted of: solvent A: acetic acid/water (2:98 v/v) and solvent B: acetic acid/acetonitrile/water (2:30:68 v/v). During analysis, the solvent gradient was programmed from 10 to 100% of B in A in 30 minutes. The UV detector was programmed at 280 nm and the injection volume was 20  $\mu$ L. All solvents used were filtered through membrane 0.45  $\mu$ m. The various



## Compuestos fenólicos simples

El análisis de HPLC de los compuestos fenólicos se efectuó con una separación en fase reversa que se llevó a cabo en una columna Zorbax octadecilsilano (ODS)-C18 (tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , 15 cm \* 4.6 mm i.d.). Además de la columna se usó también una precolumna Zorbax ODS-C18. Las condiciones de la fase móvil fueron idénticas a las empleadas por Ramamurthy *et al.* (1992): la fase móvil corrió a 1.5 ml  $\text{min}^{-1}$  y consistió en: solvente A: ácido acético/agua (2:98 v/v) y solvente B: ácido acético /acetonitrilo/agua (2:30:68 v/v). Durante el análisis, el gradiente del solvente fue programado de 10 a 100% de B en A en 30 minutos. El detector UV se programó a 280 nm y el volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ . Todos los solventes utilizados fueron filtrados a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ . Los distintos ácidos fenólicos se cuantificaron de acuerdo a sus equivalentes en comparación con el tiempo de retención y espectros de absorción de estándares de compuestos fenólicos comerciales (SIGMA) y se reportaron como mg/100 g de muestra seca.

## Capacidad antioxidante

ORAC. El extracto crudo (EC) para determinar la capacidad antioxidante contra radicales de oxígeno se obtuvo con 50 mg de muestra seca a la que se le adicionaron 5 ml de acetona:agua (1:1 v/v). La muestra se sonicó por 10 min, se agitar, centrifugó (5 000 rpm, 10 min) y se recuperó el sobrenadante (EC) que se almacenó en frasco ámbar a 4 °C. Para estandarizar al EC, se diluyeron 15  $\mu\text{L}$  del mismo con 1985  $\mu\text{L}$  de una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (71 mL de fosfato de sodio monobásico 0.2 M, 304 mL de fosfato de sodio bibásico 0.2 M, aforados a 900 ml, pH 7.4) (extracto crudo diluido, ECD). Se comprobó que la capacidad antioxidante del ECD decayera en un lapso de tiempo menor a un estándar de Trolox a 40  $\mu\text{M}$  y en un tiempo mayor a un estándar de Trolox a 10  $\mu\text{M}$  (Ou *et al.*, 2001). Cuando no se lograron estas condiciones, se modificó la proporción del EC y la SAF. Para determinar la capacidad antioxidante del ECD, se tomaron 1.5 ml de una solución de fluoresceína (7.7  $\mu\text{L}$  de solución madre de fluoresceína 0.5315 mM en 50 ml de la SAF) y se colocaron en una celda de cuarzo.

En la misma celda se agregaron 0.75 ml del ECD. La celda se colocó en baño María por 5 min a 37 °C; a continuación se agregaron 0.75 ml de solución de AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) HCL); 0.415 g de AAPH en 10 ml de la SAF) recién preparado y se agitó perfectamente. Se tomó la primera lectura en el fluorómetro ( $\lambda_{\text{excitación}}=493$  y  $\lambda_{\text{emisión}}=$

phenolic acids were quantified according to its equivalent in comparison to retention time and absorption spectra of standards of commercial phenolics compounds (SIGMA) and are reported as mg/100 g of dry sample.

## Antioxidant capacity

ORAC. The crude extract (EC) to determine the antioxidant capacity against oxygen radicals was obtained with 50 mg of dried sample to which were added 5 ml of acetone: water (1:1 v/v). The sample was sonicated for 10 min, stirred, centrifuged (5000 rpm, 10 min) and the supernatant (EC) was recovered which was stored in amber bottle at 4 °C. To standardize the EC, 15  $\mu\text{l}$  of the same diluted with 1985  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer solution (SAF) (71 mL of monobasic sodium phosphate 0.2 M, 304 mL of dibasic sodium phosphate 0.2 M, gauged at 900 ml, pH 7.4) (diluted crude extract, ECD). It was found that the antioxidant capacity of ECD decayed in a time span of less than a standard of Trolox at 40  $\mu\text{M}$  and in a higher time to a standard of Trolox at 10  $\mu\text{M}$  (Ou *et al.*, 2001). When these conditions were not achieved, the proportion of EC and SAF was modified. To determine the antioxidant capacity of ECD, 1.5 ml from a fluorescein solution were taken (7.7  $\mu\text{L}$  of stock fluorescein solution 0.5315 mM in 50 ml of SAF) and placed in a quartz cell.

In the same cell 0.75 ml of ECD were added. The cell was placed in a water bath for 5 min at 37 °C; then 0.75 ml of AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) HCL) were added; 0.415 g of AAPH in 10 ml of SAF) recently prepared and stirred. The first reading in the fluorometer ( $\lambda_{\text{excitación}}=493$  and  $\lambda_{\text{emisión}}=515$ ) and the sample was returned to the water bath. The sample was kept on reading every minute until the reading value corresponded to 10% of initial value. The reference was red in the same way but without the study sample. The antioxidant capacity is quantified by comparing with a calibration curve of Trolox and the results were expressed in micro moles of Trolox equivalents per gram of dry sample ( $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) according to the following formulas:

$$ABC = 0.5 + \sum (f_0/f_0 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots f_i/f_0)$$

$$ANBC = ABC \text{ sample} - ABC \text{ referre}$$

$$ORAC = \frac{[(ANBC - 0.938) * FD] * VE * (100 - H)}{0.271 * Pi * 100}$$

Where: ABC= area under the curve; ANBC = Net area under the curve;  $f_0$ = fluorescence at time 0;  $f_i$ = fluorescence at time i; ORAC= antioxidant capacity; FD= dilution factor; VE= volume of extraction; H = humidity; Pi = initial weight of the sample.

515) y la muestra se regresó al baño María. La muestra se continuó leyendo cada minuto hasta que el valor de la lectura correspondió a 10% del valor inicial. Se corrió un blanco de la misma forma pero sin la muestra problema. Se cuantifico la capacidad antioxidante comparando con una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron en micro moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca ( $\mu\text{mol ET/g, bs}$ ) de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{ABC} = 0.5 + \sum (f_0/f_0 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots f_i/f_0)$$

$$\text{ANBC} = \text{ABC muestra} - \text{ABC banco}$$

$$\text{ORAC} = \frac{[(\text{ANBC} - 0.938) * \text{FD}] * \text{VE} * (100 - \text{H})}{0.271 * \text{Pi} * 100}$$

Donde: ABC= área bajo la curva; ANBC= área neta bajo la curva,  $f_0$ = fluorescencia al tiempo 0;  $f_i$ = fluorescencia al tiempo i; ORAC= capacidad antioxidante; FD= factor de dilución; VE= volumen de extracción; H= humedad; Pi= peso inicial de la muestra.

TEAC. Para la obtención del extracto crudo (EC) para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox, se pesaron 20 mg de hoja molida, se adicionaron 5 mL de acetona:agua (1:1 v/v), se sonicó por 10 min y se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min. El sobrenadante (EC) se recuperó y almacenó en un frasco ámbar. El radical ABTS<sup>+</sup> se preparó disolviendo 0.0038 g de ABTS en 1 ml de persulfato de potasio 2.45 Mm en agua desionizada. Ésta solución se preparó 12 h antes de ser usada y se almacenó a 4° C en frasco ámbar. Para determinar la capacidad antioxidante, se tomaron 0.15 ml de la solución del radical ABTS<sup>+</sup> y se diluyo con 14 ml de solución amortiguadora de fosfato (8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 1 litro de agua destilada, pH 7.4), con una absorbancia de 0.7 a 734 nm. Por otro lado, a 990  $\mu\text{L}$  de la solución del radical ABTS<sup>+</sup> se le midió la absorbancia (ABS) ( $t=0_M$ ) e inmediatamente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del EC y se tomó la lectura a los seis min a 734 nm ( $t=6_M$ ). Se corrió un blanco bajo las mismas condiciones pero sin el EC y se midió la ABS al tiempo 0 ( $t=0_S$ ) y a los 6 min ( $t=6_S$ ). La capacidad antioxidante de las muestras se calculó comparando con una curva de Trolox y se reportó como  $\mu\text{mol ET/g, bs}$  con base en las siguientes fórmulas (Van den Berg *et al.*, 1999):

Absorbancia neta (AN) = (ABS a  $t=0_M$  - ABS a  $t=6_M$ ) - (ABS a  $t=0_S$  - ABS a  $t=6_S$ )

$$\text{TEAC} = \frac{[(\text{AN} - 0.02014) * \text{FD}] * \text{VE} * (100 - \text{H})}{0.00023 * \text{Pi} * 100}$$

TEAC. To obtain the crude extract (EC) for determining the equivalent antioxidant capacity to Trolox, 20 mg of ground leaf were weighed, then added 5 mL of acetone: water (1: 1 v/v), sonicated for 10 min and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant (EC) was recovered and stored in an amber bottle. The radical ABTS<sup>+</sup> was prepared by dissolving 0.0038 g of ABTS in 1 ml of potassium persulphate 2.45 mM in deionised water. This solution was prepared 12 h before being used and stored at 4 °C in amber bottle. To determine the antioxidant capacity, 0.15 ml of the solution from the radical ABTS<sup>+</sup> and diluted with 14 ml of phosphate buffer (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 liter of distilled water, pH 7.4), with an absorbance of 0.7 at 734 nm. On the other hand, at 990  $\mu\text{L}$  of the solution of radical ABTS<sup>+</sup> was measured the absorbance (ABS) ( $t=0_M$ ) and immediately added 100  $\mu\text{L}$  of EC, and took a reading after six minutes at 734 nm ( $t=6_M$ ). A reference is run under the same conditions but without the EC and measured ABS at time 0 ( $t=0_S$ ) and at 6 min ( $t=6_S$ ). The antioxidant capacity of the samples was calculated by comparing with Trolox curve and reported as  $\mu\text{mol ET/g, bs}$  based on the following formulas (Van den Berg *et al.*, 1999):

Net absorbance (AN) = (ABS a  $t=0_M$  - ABS a  $t=6_M$ ) - (ABS a  $t=0_S$  - ABS a  $t=6_S$ )

$$\text{TEAC} = \frac{[(\text{AN} - 0.02014) * \text{FD}] * \text{VE} * (100 - \text{H})}{0.00023 * \text{Pi} * 100}$$

### Statistical analysis

The data of all tests was the result from the average of six replicates ( $n=6$ ). Analysis of variance (ANOVA) and comparisons mean tests (Tukey) with a significance level of  $p < 0.05$  were obtained using SAS for Windows version 9.1.

## Results and discussion

Chemical composition. Protein content of moringa leaves analyzed here is lower than that reported for samples from Pakistan (27.1%) (Dhakar *et al.*, 2011), Africa (30.3%) (Moyo *et al.*, 2011) and Nicaragua (25.1%) (Makkar and Becker, 1996); while oil content was the same as reported by Makkar and Becker (1996) (5.4%) but less than reported by Dhakar *et al.* (2011) (2.3%) and fiber of materials analyzed here was higher than samples from Pakistan (19.2%) (Dhakar *et al.*, 2011) and Africa (25.8%) (Moyo *et*

## Análisis estadístico

Los datos de todas las pruebas fue el resultado de la media de seis repeticiones ( $n=6$ ). Se obtuvieron los análisis de varianza (Anova) y las pruebas de comparaciones de medias (Tukey) con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , utilizando el programa SAS para Windows versión 9.1.

## Resultados y discusión

Composición química. El contenido de proteína de las hojas de moringa aquí analizadas es menor al reportado para muestras de Pakistan (27.1%) (Dhakar *et al.*, 2011), África (30.3%) (Moyo *et al.*, 2011) y Nicaragua (25.1%) (Makkary y Becker, 1996). Mientras que el contenido de aceite fue igual al reportado por Makkary y Becker (1996) (5.4%) pero menor al reportado por Dhakar *et al.* (2011) (2.3%) y la fibra de los materiales aquí analizados fue mayor a muestras de Pakistan (19.2%) (Dhakar *et al.*, 2011) y de África (25.8%) (Moyo *et al.*, 2011). Por otro lado, el contenido de proteína de las hojas de los árboles con una altura de 100 cm fue mayor en comparación con el contenido de las hojas de los árboles de 25 y 250 cm, pero menor al de la muestra comercial proveniente de Oaxaca (Cuadro 1). Este comportamiento no se observó en el contenido de fibra dietaria, extracto etéreo y ceniza que se incrementa con la altura del árbol. La muestra previamente preparada en la huerta MPH (ver materiales y métodos) presentó un menor contenido de todos los componentes químicos analizados. Estos resultados demuestran la falta de uniformidad al preparar las mezclas en la huerta. También sugiere que con un manejo cuidadoso se pueden tener lotes de mejor calidad para su comercialización.

*al.*, 2011); furthermore, protein content of the leaves of the tree with a height of 100 cm was higher compared with the content of the leaves of the trees of 25 and 250 cm, but less than that of the commercial sample from Oaxaca (Table 1). This behavior was not observed in the content of dietary fiber, crude fat and ash which increases with the height of the tree. The sample previously prepared in the orchard MPH (see materials and methods) showed a lower content of all chemicals tested. These results demonstrate the lack of uniformity when preparing the mixtures in the orchard. It also suggests that with careful management there can be lots of better quality for marketing.

Regarding to protein and fiber content of the commercial sample (MC), its content was higher compared to the other samples. Based on these results and the differences in chemical composition of Moringa leaf from other countries, there is apparently an effect of location on protein and fiber. However, the results here reported do not allow us to conclude the latter. It would be desirable to conduct a study on this matter for the improvement of the specie. On the other hand, however the differences in nutritional composition of moringa leaves reported in this study, any sample contains on average 9.4 times more protein and fiber than spinach (2.86 and 2.2%, respectively), cabbage (1.28 and 2.5%, respectively), chard (1.8 and 1.6%, respectively) and artichoke (3.27 and 5.4%, respectively) (USDA, 2007).

It is important to note the high oil content of moringa leaf compared with other edible leaves like chard, spinach and artichoke that is no greater than 0.5% (USDA, 2007). It is desirable to determine the fatty acid profile of Mexican materials analyzed here to determine the contribution of omega

### Cuadro 1. Composición química de la hoja de moringa proveniente de árboles de diferente tamaño.

Table 1. Chemical composition of moringa leaf from trees of different sizes.

Altura del árbol (cm)	Proteína	Fibra dietaria	Extracto etéreo	Ceniza	Carbohidratos
25	21.1 ± 1.22 c	25.8 ± 0.13 c	5.5 ± 0.36 b	12.3 ± 0.49 b	35.3 ± 0.71 b
100	24.7 ± 1.35 b	27.5 ± 0.8 b	5.6 ± 0.97 b	12.9 ± 0.29 b	29.3 ± 0.8 c
250	22.3 ± 0.94 c	30.6 ± 0.71 a	7.4 ± 0.14 a	13.8 ± 0.07 a	26.9 ± 0.42 d
MPH <sup>1</sup>	21.0 ± 0.24 d	23.9 ± 0.35 d	3.2 ± 0.29 c	11.7 ± 0.34 c	40.2 ± 0.63 a
MC <sup>2</sup>	29.3 ± 0.13 a	29.4 ± 0.51 a	3.5 ± 0.31 c	8.5 ± 0.05 d	27.7 ± 0.86 d

<sup>1</sup>MPH= mezcla que preparan en la huerta <sup>2</sup>MC = muestra comercial. Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ , Tukey).

Con respecto al contenido de proteína y fibra de la muestra comercial (MC), su contenido fue mayor en comparación con el resto de las muestras. Con base en estos resultados y las

fatty acids, especially since it has been reported that the oil from moringa leaf is rich in  $\alpha$ -linolenic acid (44.6%) which has a significant positive effect on health (Moyo *et al.*, 2011).



diferencias en la composición química en la hoja de moringa de otros países, aparentemente hay un efecto de la localidad sobre la proteína y la fibra. Sin embargo, los resultados aquí reportados no permiten concluir lo anterior. Sería deseable llevar a cabo un estudio al respecto para el mejoramiento de la especie. Por otro lado, no obstante las diferencias en la composición nutrimental de las hojas de moringa reportadas en este trabajo, cualquiera de las muestras contiene en promedio 9.4 veces más proteína y fibra que la espinaca (2.86 y 2.2%, respectivamente), col (1.28 y 2.5%, respectivamente), acelga (1.8 y 1.6%, respectivamente) y alcachofa (3.27 y 5.4%, respectivamente) (USDA, 2007).

Es importante resaltar el alto contenido de aceite de la hoja de la moringa en comparación con otras hojas comestibles como la acelga, espinaca y alcachofa que no es mayor a 0.5% (USDA, 2007). Es deseable determinar el perfil de ácidos grasos de los materiales Mexicanos aquí analizados para conocer el aporte de ácidos grasos omega, sobre todo porque se ha reportado que el aceite de la hoja de la moringa es rico en ácido  $\alpha$ -linolenico (44.6%) el cual tiene un efecto positivo importante sobre la salud (Moyo *et al.*, 2011).

Contenido de minerales. El contenido de calcio encontrado en las hojas de la moringa cosechadas en los árboles con las tres alturas diferentes y en la muestra MH fue mayor al reportado para hoja de moringa de Ghana (166-2200 de calcio mg/100 g bs (de Saint Sauveur y Broin, 2010); mientras que la hoja del árbol de 100 cm fue mayor en el contenido de hierro que muestras de Ghana (18-23 mg/100 g, bs). Por otro lado, el contenido de calcio y hierro en las hojas de los árboles de 100 cm de altura fue mayor que en el resto de las muestras (Cuadro 2). Lo cual confirma que puede producirse lotes de alta calidad nutrimental que pueden ser ofertadas por estas características.

Para el calcio y hierro, se volvió a observar el mismo comportamiento ya discutido en la composición proximal, es decir, la hoja de la muestra MPH presentó el menor contenido de estos minerales en comparación con la hoja proveniente de los árboles de 25, 100 y 250 cm, lo que demuestra una menor calidad de este producto (Cuadro 2). Por otro lado, en general, todas las muestras producidas en Guanajuato presentan más del doble del contenido de calcio en comparación con la muestra proveniente de Oaxaca. Con respecto al contenido de hierro de las hojas de los árboles de 100 y 250 cm, estas presentan hasta 2.6 más hierro que las hojas provenientes de Oaxaca. Estas diferencias podrían atribuirse al contenido de calcio, hierro y otros minerales presentes en el suelo donde se

Mineral content. Calcium content found in the leaves of the moringa harvested from trees with three different heights and in the MPH sample was higher than that reported for moringa leaf Ghana (166-2200 calcium mg/100 g bs. de Saint Sauveur and Broin, 2010); whereas the leaf of tree at 100 cm was higher in iron content than samples from Ghana (18-23 mg/100 g, bs) Furthermore, the content of calcium and iron in the leaves of trees at 100 cm was higher than in the other samples (Table 2). This confirms that batches with high nutritional quality that can be offered by these characteristics.

For calcium and iron, it was observed again the same behavior as discussed in the proximate composition; i.e. MPH leaf sample had the lowest content of these minerals in comparison to leaves from trees at 25, 100 and 250 cm, which shows a lower quality of this product (Table 2). Furthermore, in general, all the samples produced in Guanajuato have more than twice the calcium content compared to the sample from Oaxaca. Regarding the iron content of leaves from the trees at 100 and 250 cm, these have up to 2.6 more iron than leaves from Oaxaca. These differences could be attributed to calcium, iron and other minerals content in the soil where the moringa is grown in Guanajuato; however, there is no information regarding the content of minerals in soil where moringa is grown in this study. However, it has been reported that calcium and iron among other minerals, thus various soil conditions affect the accumulation of calcium, iron and zinc (Frossad *et al.*, 2000).

## Cuadro 2. Contenido de calcio y hierro (mg/100 g, bs) en la hoja de moringa de diferente altura y una muestra comercial de Oaxaca.

Table 2. Content of calcium and iron (mg/100 g, bs) in moringa leaf of different height and a commercial sample from Oaxaca.

Altura del árbol (cm)	Calcio	Hierro
25	2791 ± 23 c	17.6 ± 1.57 c
100	4630 ± 63 a	32.1 ± 1.3 a
250	3446 ± 72 b	21.5 ± 0.95 b
MPH <sup>1</sup>	2289 ± 53 d	15.2 ± 1.27 d
MC <sup>2</sup>	1384 ± 27 e	12.46 ± 0.06 e

<sup>1</sup>MPH= mezcla que preparan en la huerta <sup>2</sup>MC= muestra comercial. Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ , Tukey).

From the point of view of nutrition, calcium content of 25 g of the leaf tree at 100 cm covers the daily requirement of these mineral which is 1 000 mg (Anderson and Allen, 1999). However, it is known that calcium can also inhibit the

cultiva la moringa en Guanajuato; sin embargo, no se tienen información sobre el contenido de minerales para el suelo donde está sembrada la moringa utilizada en este estudio. No obstante, se ha reportado que el calcio y hierro entre otros minerales, así como diversas condiciones del suelo afectan la acumulación de calcio, hierro y zinc (Frossad *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista de la nutrición, el contenido de calcio en 25 g de hoja del árbol de 100 cm cubre el requerimiento diario de este mineral que es de 1 000 mg (Anderson y Allen, 1999). Sin embargo, se sabe que el calcio puede llegar a inhibir la biodisponibilidad del hierro cuando está presente en dosis de hasta 300 mg (Hurrell y Egli, 2010); los niveles de calcio presentes en 100 g de hoja de moringa pueden inhibir hasta en un 83% de la biodisponibilidad del hierro, no obstante este alto nivel de inhibición, 100 g de la hoja proveniente del árbol de 100 cm de altura podría cubrir 33% del requerimiento diario de hierro que es de 15 mg (Anderson y Allen, 1999), contemplada la inhibición por el alto contenido de calcio. Esto es de suma importancia para adultos o niños que viven en áreas rurales y cuya dieta está basada principalmente en plantas y productos derivados de estas, que los pone en riesgo de padecer deficiencias en su crecimiento y desarrollo.

**Vitamina C.** El ácido L-dehidroascórbico presenta actividad biológica y puede ser convertido fácilmente a ácido L-ascórbico por los humanos, la suma de ácido ascórbico y L-dehidroascórbico se toma como el contenido de vitamina C (Corral-Aguayo *et al.*, 2008). El contenido de ácido ascórbico y dehidroascórbico disminuye en las hojas de los árboles conforme aumenta la altura (Cuadro 3). Sin embargo, en todos los casos el contenido de vitamina C (ascórbico + dehidroascórbico) fue mayor en la hoja de los árboles de 25, 100 y 250 cm en comparación con la muestra MPH y la MC. Se sabe que la vitamina C es muy sensible a la temperatura por lo que es muy probable que el manejo controlado de la hoja de los árboles de diferente altura que se tuvo en preparación de este trabajo (cosechada por la mañana y traída inmediatamente al laboratorio para secarse a la sombra) haya contribuido a evitar la pérdida de esta vitamina. Por el contrario, los datos sugieren que el secado o el manejo de la hoja pos cosecha de las muestras MPH y MC no fue adecuado presentándose pedidas importantes en esta vitamina.

El contenido de vitamina C reportado en este trabajo fue menor al reportado para hoja de Ghana (120 mg/100 g) (de Saint Sauveur y Broin, 2010); este comportamiento se deba muy probablemente a la diferencia en el sitio de

bioavailability of iron when present in doses up to 300 mg (Hurrell and Egli, 2010); the levels of calcium in 100 g of moringa leaf can inhibit up to 83% of the bioavailability of iron, however this high level of inhibition, 100 g of the leaf tree at 100 cm could cover 33% of the daily requirement of iron that is 15 mg (Anderson and Allen, 1999), considered the inhibition by high calcium content. This is critical for adults or children living in rural areas and whose diet is based mainly on plants and products derived from these, which puts them at risk for deficiencies in their growth and development.

**Vitamin C.** L-dehydro ascorbic acid shows biological activity and can be easily converted to L-ascorbic acid by humans, the amount of ascorbic acid and L-dehydro ascorbic is taken as the content of vitamin C (Corral-Aguayo *et al.*, 2008). The content of ascorbic acid and dehydro ascorbic decreased in the leaves of trees as height increases (Table 3). However, in all cases the content of vitamin C (ascorbic acid + dehydro ascorbic) was higher in leaf trees at 25, 100 and 250 cm compared to the sample of MPH and MC. It is known that vitamin C is very sensitive to temperature and it is very likely that controlled management of leaf trees of different height that were in preparation for this work (harvested in the morning and immediately brought to the laboratory for drying under shade) has helped to prevent the loss of this vitamin. On the contrary, the data suggest that drying or post-harvest leaf management of MPH and MC samples was not adequate, having important losses in this vitamin.

**Cuadro 3. Contenido de vitamina C (ascórbico + dehidroascórbico) (mg/100 g, bs) de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura.**

**Table 3. Content of vitamin C (ascorbic acid + dehydro ascorbic) (mg/100 g, bs) of moringa leaf from trees of different heights.**

Altura del árbol (cm)	Ácido Ascórbico	Ácido dehidroascórbico	Vitamina C
25	24.7 ± 0.07 a	39.8 ± 0.5 a	64.5
100	19.9 ± 0.02 b	35.1 ± 1.2 b	55
250	11.9 ± 0.91 d	32.5 ± 1.4 b	44.4
MH <sup>1</sup>	18.9 ± 0.32 c	ND <sup>2</sup>	18.9
MC <sup>3</sup>	11.1 ± 0.02 d	ND	11.1

<sup>1</sup>MH= mezcla preparada en la huerta; <sup>2</sup>ND=no detectado; <sup>3</sup>MC=muestra comercial de Oaxaca. Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ , Tukey).

The content of vitamin C reported in this study was lower than reported for leaf from Ghana (120 mg/100 g) (de Saint Sauveur and Broin, 2010); this behavior is most likely due

siembra, los ecotipos analizados y el manejo poscosecha. Nutricionalmente hablando, el requerimiento mínimo recomendado de vitamina C para un adulto es de 60 mg (Padh, 1994); por lo tanto, 100 g de hoja proveniente de los árboles de 25, 100 y 250 cm pueden contribuir con el 107, 91.7 y 74%, respectivamente, del requerimiento diario de esta vitamina. Además, se ha reportado que la vitamina C incrementa la biodisponibilidad del hierro siendo antagónico al efecto inhibitorio que el calcio, polifenoles y ácido fítico tienen sobre el hierro (Hurrell y Egli, 2010). A pesar de que no se ha definido la cantidad de vitamina C que debe estar presente para anular este efecto, el alto contenido de vitamina C en la hoja de la moringa es importante en la nutrición y puede contribuir a mantener una buena salud.

**Contenido de fenoles totales y taninos condensados.** El contenido de fenoles totales y taninos condensados en la hoja de moringa se incrementó con la altura del árbol de 2.9 a 4.7 g EAG/100 g (bs) y de 21.9 a 31.7 mg EC/100 g bs, respectivamente (Cuadro 4). El contenido de fenoles totales de la hoja de la moringa son casi el doble al reportado para perejil (*Petroselinum crispum*) (1.89 g EAG/100 g, bs) orégano (*Origanum vulgare*) (1.75 g EAG/100 g, bs) hierbabuena (*Mentha spicata*) (1.41 g EAG/100 g, bs) y albahaca (*Ocimum basilicum*) (0.56 g EAG/100 g, bs) (Rodríguez *et al.*, 2006). Este alto contenido de fenoles totales se puede explicar dado que estos metabolitos secundarios se sintetizan en las plantas básicamente como un mecanismo de protección contra patógenos y predadores (Bravo, 1999); el alto contenido de proteína, aceite y otros compuestos causan que la moringa sea particularmente susceptible al ataque de enfermedades y animales como ardillas y topos así como de hormigas.

to the difference in planting site, ecotypes analyzed and postharvest handling. Nutritionally speaking, the minimum recommended requirement of vitamin C for an adult is 60 mg (Padh, 1994); therefore, 100 g of leaf from trees at 25, 100 and 250 cm can contribute with 107, 91.7 and 74%, respectively, of the daily requirement of this vitamin. Furthermore, it has been reported that vitamin C increases the bioavailability of iron being antagonistic to the inhibitory effect that calcium, polyphenols and phytic acid have on iron (Hurrell and Egli, 2010). Despite that has not being defined the amount of vitamin C that must be present to override this effect, the high content of vitamin C in moringa leaf is important in nutrition and can help to maintain good health.

**Content of total phenols and condensed tannins.** The content of total phenolics and condensed tannins in the leaf increased with tree height from 2.9 to 4.7 g EAG/100 g (bs) and from 21.9 to 31.7 mg EC/100 g bs, respectively (Table 4). The total phenolic content of Moringa leaf are almost double than that reported for parsley (*Petroselinum crispum*) (1.89 g EAG/100 g, bs), oregano (*Origanum vulgare*) (1.75 g EAG/100 g, bs) peppermint (*Mentha spicata*) (1.41 g EAG/100 g, bs) and basil (*Ocimum basilicum*) (0.56 g EAG/100 g, bs) (Rodríguez *et al.*, 2006). This high content of total phenols can be explained because these secondary metabolites are synthesized in plants mainly as a protection mechanism against pathogens and predators (Bravo, 1999); the high content of protein, oil and other compounds cause moringa to be particularly susceptible to the attack of diseases and animals like squirrels and mole, thus as ants.

The levels of total phenols reported in this study are similar to those reported by Gupta *et al.* (1989); while the relatively low tannin content reported here is consistent with that

**Cuadro 4. Contenido de fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante (TEAC y ORAC) de hoja árbol de moringa de diferente altura y muestras comerciales.**

**Table 4. Content of total phenols, condensed tannins and antioxidant capacity (TEAC and ORAC) of moringa tree leaf of different height and commercial samples.**

Altura del árbol (cm)	Fenoles totales (g EAG <sup>1</sup> /100 g)	Taninos condensados (mg EC <sup>2</sup> /100 g)	TEAC (μmol ET <sup>3</sup> /g)	ORAC (μmol ET/g)
25	2.9 ± 0.12 d	21.9 ± 0.84 c	417.9 ± 35.3 c	462.31 ± 25.9 bc
100	3.9 ± 0.19 b	26.9 ± 0.79 b	431.0 ± 42.8 c	415.93 ± 18.9 cd
250	4.7 ± 0.39 a	31.7 ± 1.04 a	776.1 ± 46.7 a	648.82 ± 41.8 a
MPH	3.5 ± 0.21 c	21.8 ± 1.94 c	514.7 ± 23.1 b	500.02 ± 23.3 b
MC	3.3 ± 0.32 cd	6.8 ± 0.17 d	543.9 ± 20.8 b	393.1 ± 28.3 d

<sup>1</sup>EAG= equivalentes de ácido gálico; <sup>2</sup>EC= equivalentes de catequina; <sup>3</sup>ET= equivalentes de Trolox. Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Los niveles de fenoles totales reportados en este trabajo son similares a los reportados por Gupta *et al.* (1989); mientras que el relativamente bajo contenido de taninos reportados aquí concuerda con lo reportado por Gupta *et al.* (1989) y Makkar y Becker (1997). Por otro lado, las hojas de las muestras MPH y MC presentaron menor contenido de fenoles totales y taninos condensados que las hojas de los árboles de 100 y 250 cm que demuestra que bajo condiciones controladas se pueden generar lotes de hojas de mejor calidad desde el punto de vista de la salud. En este sentido, se ha demostrado que los fenoles totales en particular y los taninos condensados presentan una alta capacidad antioxidante, característica altamente deseable en alimentos nutraceuticos que pueden contribuir a mejorar la salud (Balasundram *et al.*, 2006).

**Capacidad antioxidante.** La capacidad antioxidante TEAC y ORAC presentaron una correlación altamente significativa con el contenido de fenoles totales y taninos condensados ( $r=0.9944, p<0.001$ ;  $r=0.8567, p<0.001$ , respectivamente). Lo que demuestra que los compuestos fenólicos juegan un papel importante en las propiedades benéficas de la hoja de la moringa. Estos resultados son de interés desde el punto de vista de la salud, ya que la capacidad antioxidante de un alimento está relacionada con mecanismos intracelulares antioxidantes y enzimas antioxidantes que están involucradas en la prevención de enfermedades crónicas que resultan del estrés oxidativo. En este sentido, el método de ORAC medir la capacidad de la hoja de la moringa de inhibir radicales de oxígeno altamente reactivos y los más abundantes en el cuerpo humano y por lo tanto fuente de muchos desordenes fisiológicos.

La alta capacidad antioxidante ORAC de la hoja de la moringa en comparación con la hoja del orégano (25  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) y del tomillo (222.5  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) (Mercado *et al.*, 2013) permite concluir que la hoja de la moringa presenta propiedades nutraceutica de mucho interés y puede contribuir en la prevención de enfermedades crónico degenerativas. Igualmente, la alta capacidad antioxidante TEAC, que mide la capacidad de los fenoles de donar electrones para apagar compuestos antioxidantes, en comparación con el epazote (31.5  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs), Ginkgo biloba (438.4  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs), perejil (60  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) y perejil (380  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) (Mercado *et al.*, 2013), contribuye a las propiedades benéficas de la hoja de la moringa en relación con la salud.

reported by Gupta *et al.* (1989) and Makkar and Becker (1997). On the other hand, the leaves samples of MPH and MC had lower total phenol content and condensed tannins than tree leaves at 100 and 250 cm; which shows that under controlled conditions can be generated lots of leaves with better quality from the point of view of health. In this regard, it has been shown that in particular total phenols and condensed tannins have a high antioxidant capacity, highly desirable nutraceutical characteristics that can contribute to improved health (Balasundram *et al.*, 2006).

**Antioxidant capacity.** The TEAC and ORAC antioxidant capacity showed a highly significant correlation with the content of total phenolics and condensed tannins ( $r=0.9944, p<0.001$ ;  $r=0.8567, p<0.001$ , respectively). This shows that phenolic compounds play an important role in the beneficial properties of moringa leaf. These results are of interest from the point of view of health, as the antioxidant capacity of food is related to intracellular antioxidants mechanisms and antioxidant enzymes that are involved in the prevention of chronic diseases resulting from oxidative stress. In this regard, the ORAC method to measure the ability of moringa leaf to inhibit radical of oxygen highly reactive and the most abundant in human body and therefore source of many physiological disorders.

The high antioxidant capacity ORAC of moringa leaf compared with oregano leaf (25  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) and thyme (222.5  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) (Mercado *et al.*, 2013) supports the conclusion that moringa leaf have nutraceutical properties of great interest and can contribute to prevention of chronic degenerative diseases. Similarly, the high antioxidant capacity TEAC, that measures the ability of phenols to donate electrons to quench antioxidant compounds compared to epazote (31.5  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs), Ginkgo biloba (438.4  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs), parsley (60  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) and parsley (380  $\mu\text{mol ET/g}$ , bs) (Mercado *et al.*, 2013), contributes to the beneficial properties of moringa leaf regarding to health.

It should be stressed that low nutraceutical quality of commercial sample of moringa leaf from Oaxaca, which has the lowest content of total phenols, condensed tannins and lower levels of ORAC antioxidant capacity compared to the rest of the samples.



Debe subrayarse la baja calidad nutracéutica de la muestra comercial de hoja de moringa proveniente de Oaxaca, la cual presenta los menores contenidos de fenoles totales, taninos condensados y menores niveles de capacidad antioxidante ORAC en comparación con el resto de las muestras.

## Conclusiones

Este es el primer reporte de la calidad de la hoja de moringa de material introducido a un área geográfica no especificada para su cultivo. Igualmente, existen pocos o ningún trabajo que reporte la calidad nutrimental y nutracéutica de la hoja de moringa de materiales mexicanos. Comparando con los resultados reportados para la hoja de moringa de otros países y la muestra comercial de Oaxaca, los materiales analizados en este trabajo presentan menor contenido de proteína, pero mayor contenido de fibra, hierro, calcio y compuestos fenólicos, particularmente en los árboles de 100 cm de altura. Lo que demuestra que la hoja de Guanajuato puede competir ventajosamente en el mercado.

Los lotes producidos por la huerta pueden ser de mejor calidad en sus propiedades nutrimentales y nutracéuticas si se aplican buenas prácticas de cosecha. Lo que podría darle ventajas en su comercialización.

## Literatura citada

- Anwar, F.; Muhammad, A. S. L. and Anwarul, H. G. 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res.* 21:17-25.
- Anderson, J. J. B. and Allen, J. C. 1999. Nutrition of macro elements and trace elements. In: Golberg I, (Ed.). *Functional foods: designer foods, pharmafood, nutraceuticals*. New York: Chapman & Hall. 323-54 pp.
- AOAC (The Association of Official Analytical Chemists). 2000. *Official methods*, Assoc. Off. Anal. Chem. Int. (AOAC), Arlington, VA, U.S.A., 2000.
- Balasundram, N.; Sudram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99:191-203.
- Bravo, L. 1999. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Rev.* 56:317-333.
- Brisibe, E. A.; Umoren, U. E.; Brisibe, F.; Magalhaes, P. M.; Ferreira, J. F. S.; Luthria, D.; Wu, X. and Prior, R. L. 2009. Nutritional characterization and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chem.* 115:1240-1246.

## Conclusions

This is the first report of the quality of moringa leaf from material introduced to a geographic area not specified for cultivation. Similarly, there are few or no works that report nutraceutical and nutritional quality of moringa leaf from Mexican materials. Comparing with the results reported for moringa leaf from other countries and commercial sample from Oaxaca, the materials analyzed in this work have lower protein content but higher in fiber, iron, calcium, and phenolic compounds, particularly in trees of 100 cm height. This shows that the leaf from Guanajuato can compete successfully on the market.

The lots produced by the orchard may be of better quality in their nutritional and nutraceutical properties if good harvesting practices are applied. Which may give them advantages in their marketing.

*End of the English version*



- Chumarka, P.; Khunawat, P.; Sanvarinda, Y.; Phornchirasilp, S.; Morales, N. P.; Phivthong-Ngam, L.; Ratanachamnong, P.; Srisawat, S. and Pongrapeeporn, K. S. 2008. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *J. Ethnopharmacol.* 116:439-446.
- Corral-Aguayo, R. D.; Yahia, E. M.; Carrillo-Lopez, A. and González-Aguilar, G. 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.* 56(22):10498-10504.
- de Saint Sauveur, A. and Broin, M. 2010. Growing and processing moringa leaves. *Moringanews / Moringa Association of Ghana*. www.anancy.net/documents/file/moringawebEN.p
- Del Toro, M. J. 2011. Valoración de las propiedades nutricionales de *Moringa oleifera* en el departamento de Bolívar. *Rev. Cienc.* 1:23-30.
- Deshpande, S. S. and Chetyan, M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *J. Food Sci.* 50:905-916.
- Dhakar, R. C.; Maurya, S. D.; Pooniya, B. K.; Bairwa, N. and Sanwaram, M. G. 2011. Moringa: the herbal gold to combat malnutrition. *Chron. Young Scient.* 2(3):119-125.
- Fahey, J. W. 2005. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. Part 1. *Trees life J.* <http://www.tfljournal.org/article.php/20051201124931586>.
- Frossad, E.; Bucher, M.; Macher, F.; Mozafar, A. and Rchard, H. 2000. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 80:861-879.

- Gupta, K.; Barat, G. K.; Wagle, D. S. and Chawla, H. K. L. 1989. Nutrient contents and antinutritional factors in conventional and non-conventional leafy vegetables. *Food Chem.* 31:105-116.
- Hurrell, R. and Egli, I. 2010. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am. J. Clin. Nutr.* 91(5):14615-14675.
- Makkar, H. P. S. and Becker, K. 1996. Nutritional value and whole and ethanol antinutritional components of extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Sci Technol.* 63:211-228.
- Makkar, H. P. S. and Becker, K. 1997. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *J Agric. Sci.* 128:311-322.
- Mercado, M. G.; Carrillo, R. L.; Wall, M. A.; López, D. J. y Álvarez, P. E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria.* 28(1): 36-46.
- Moyo, B.; Masika, P. J.; Hugo, A. and Muchenje, V. 2011. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Afr. J. Biotechnol.* 10(60):12925-12933.
- Olson, M. E. and Fahey, J. W. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Rev. Mex. Biod.* 82:1071-1082.
- Ou, B.; Hampsh-Woodill, M. and Prior, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorption capacity assay using fluorescein as a fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49:4619-4626.
- Padh, H. 1994. Vitamins for optimal health. *In: Golberg, I. (Ed.). Functional foods, designed foods, pharmafood, nutraceuticals.* New York: Chapman and Hall. 261-293 pp.
- Prosky, L.; Asp, N. G.; Schweizer, T. F.; DeVries, J. W. and Furda I. 1988. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 71:1017-1023.
- Ramamurthy, M. S.; Maiti, B.; Thomas, P. and Nair, M. 1992. High performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*Solanum tuberosum*) during wound healing. *J. Agric. Food Chem.* 40:569-572.
- Rashid, U.; Anwar, F.; Moser, B. R. and Knothe, G. 2008. Moringa oleifera oil: a possible source of biodiesel. *Biores. Technol.* 99:8175-8179.
- Rodríguez, J. L.; Valdés, O. y Alemán, A. 2006. Evaluación de la actividad antioxidante de cinco hierbas aromáticas. *Ciencia Tecnol. Alimentos.* 16(1):30-36.
- Singlenton, V.; Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzimol.* 152-178.
- United States Department of Agriculture (USDA) 2007. National agricultural library. National nutrient database for standard reference. Food and Nutrition Information Center. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
- Verma, A. R.; Vijayakumar M.; Mathela, C. S. and Rao, C. V. 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of Moringa oleifera leaves. *Food Chem. Toxicol.* 47:2196-2201.
- Van den Berg, R.; Haenen, G.R.M. Van den Berg, H. and Bast, A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66:511-517.