

INFORME FINAL

Dra. Chinwe Christy Isitua

**Producción, Control de Calidad y Evaluación Pre-clínica de una
Formula Nutricional de *Moringa oleífera* con valor medicinal**

Ciencias de la Vida

Universidad Técnica de Machala

14/04/2014 - 13/04/2015

1 **Contenido**

TEMA	PAGINA
INFORME DE ACTIVIDADES	2
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	13
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
RESULTADOS OBTENIDOS	19
PAPER INDEXADO O ARTICULO CIENTIFICO PUBLICADO	19
1.- CONTRIBUCIÓN AL PLAN DEL BUEN VIVIR	44
2.- DESCRIPCION DE PRODUCTOS ALCANZADOS	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
LIMITACIONES	52
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS	55

INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

INTRODUCCIÓN

Tema y los objetivos

Mi proyecto de investigación titulado "**Producción, Control de Calidad y evaluación preclínica de un Fórmula Nutricional de *Moringa oleífera* con valor medicinal**" se basa en la importancia de desarrollar una herramienta asequible, accesible y saludable para la gestión y control de la malnutrición, el suministro de alimentos y otras enfermedades de importancia para la salud pública en el Ecuador; mediante la expansión en el campo de la investigación de plantas medicinales cultivadas en Ecuador especialmente *Moringa oleífera*, para evaluar sus características y potencialidades (farmacognóstico, farmacológica, toxicológica y antimicrobiano) para desarrollar una fórmula a base de hierbas que se puede utilizar como un suplemento nutricional. Los estudios han demostrado que el consumo de alimentos sanos y nutrientes de las plantas y productos vegetales (nutracéuticos) ayuda en el mantenimiento del alto nivel de inmunidad y por lo tanto pueden ayudar a reducir o prevenir enfermedades e infecciones.

Objetivo General

"Desarrollar de una fórmula nutricional de la planta *Moringa oleífera* con valor medicinal".

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos se agruparon siguiendo las áreas de la Matriz de Planificación de los Investigadores del Programa Prometeo

1 Investigación

1.1. Objetivos específicos

Evaluar científicamente varias plantas medicinales; especialmente *Moringa oleifera* en relación con el desarrollo de una fórmula nutricional saludable.

1.1.1. Analizar los componentes fitoquímicos

1.1.2. Analizar los agentes antimicrobianos

1.1.3. Analizar la composición nutricional proximal

1.1.4. Preparar la fórmula nutricional

1.1.5. Realizar control de calidad de la fórmula

1.1.6. Evaluar la toxicidad de la fórmula utilizando modelos animales

1.1.7. Evaluar los diversos índices que se refiere a la toxicología

1.1.8. Realizarlos estudios de inmunomodulación

1.1.9. Evaluar la histopatología de los principales órganos de los animales expuestos a la fórmula.

2. Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad (dirigida a estudiantes y profesores de la institución)

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Dictar talleres de enseñanza aprendizaje a estudiantes, docentes e investigadores del área acerca de los métodos microbiológicos relacionados con la etnomedicina (investigación sobre plantas medicinales), utilizando procedimientos estandarizados.

2.1.2. Voy a trabajar en colaboración con investigadores de UTMACH para crear una línea de investigación importante y duradera en el desarrollo de investigaciones sobre plantas medicinales.

3 Asesoría en la elaboración de políticas públicas (No Aplica)

4 Docencia a impartir (dirigida a estudiantes)

4.1. Objetivos específicos

4.1.1. Cursos teórico-prácticos a los estudiantes de pregrado de Microbiología y toxicología, tanto en el laboratorio como en el aula de la UTMACH.

5 Asesoría y diseño de programas de postgrado (No Aplica)

6 Gestión de recursos nacionales e internacionales (No Aplica)

7 Relacionamento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional

7.1. Objetivos específicos

7.1.1. Lograr una vinculación con Instituto Nacional de Investigaciones de Salud Pública y el Ministerio de Educación para el desarrollo de proyectos relacionados con las formulas nutricionales a partir de plantas medicinales.

7.1.2. Colaborar con la firma de convenio interinstitucional entre la Universidad Técnica de Machala y otra universidad del país que está trabajando con líneas de investigación similares.

7.1.3. Realizar acuerdos de cooperación con productores de plantas medicinales e investigadores del área agrícola.

7.1.4. Se hará promoción para el desarrollo de jornadas locales Científicas y reuniones con otras instituciones para generar intercambio de conocimientos entre entidades relacionadas con el estudio y desarrollo de fórmulas nutricionales a partir de plantas medicinales.

Hipótesis y breve justificación

Hipótesis: La planta *Moringa oleifera* cultivada en Ecuador tiene las características y potencialidades para ser utilizado como un suplemento medicinal y nutricional.

La desnutrición causa una gran cantidad de sufrimiento humano y está asociado a más de la mitad de todas las muertes de niños en todo el mundo. La malnutrición afecta gravemente el desarrollo socioeconómico de una nación, porque una fuerza laboral con capacidades atrofiadas tanto mental como física tiene reducida su capacidad de trabajo. La interacción de la pobreza, la mala salud y la mala nutrición tienen un efecto multiplicador sobre el bienestar general de la población y contribuye significativamente en que la población mantenga la tendencia a la pobreza y la inseguridad nutricional.

Por lo tanto, realizar investigaciones en plantas para producir formulas nutricionales juega un papel importante para que la población pueda obtener una nutrición asequible, accesible y saludable para la elevación del buen vivir de la población, siendo esta la razón para esta investigación.

Descripción breve de lo que se hizo

El objetivo principal de esta investigación, que fue el desarrollo de una fórmula nutricional con valor medicinal de la planta *Moringa oleífera* cultivada en Ecuador fue alcanzado y los resultados obtenidos a partir de algunos de los análisis realizados ha llevado a la elaboración y publicación de un artículo científico en una indexada revista de Pelagia Investigación Biblioteca ISSN: 2249 - 7412 (Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 5 (2): 8-16), mientras que se están desarrollando otros artículos / procesada para su publicación en revistas indexadas. Además, los resultados de esta investigación fueron presentados en dos conferencias internacionales (tercera Cumbre Internacional de Toxicología y Farmacología Aplicada, Chicago, EE.UU. 2014 y Natural Descubrimiento del producto y de la Conferencia de Desarrollo, San Diego, CA, EE.UU. 2015); seis proyectos de investigación (tesis de pregrado) se desarrollaron a partir de esta investigación, etc.

Los resultados de esta investigación ha proporcionado información científica valiosa para validar el uso de la planta *oleífera M.* como un suplemento nutricional con valor medicinal debido a los ingredientes activos (metabolitos secundarios y nutrientes esenciales) fueron identificados a partir de diferentes partes de la planta; Se establecieron sus potencialidades biológicas como antitumoral y agentes antimicrobianos, su inocuidad y aptitud para el consumo humano, y los efectos fisiológicos generales de la fórmula (té de hierbas) desarrollados a partir de la hoja de Moringa en combinación con otros productos vegetales fueron establecidos utilizando ratas Wistar.

Además, en el contexto de esta investigación, entrenamientos científicos se les dio a los estudiantes y algunos profesionales. Análisis fitoquímico y proximal (utilizando diferentes técnicas disponibles, por ejemplo, espectrofotometría y Kjeldahl) requerida en el campo de

la medicina a base de hierbas y el desarrollo de nutraceuticos se llevó a cabo. Se realizaron actividades biológicas tales como antibacteriano, antifúngico, antioxidante, la citotoxicidad contra las larvas de *Artemia salina*, toxicidad oral aguda e inmunológica potencial ("desafío microbiana") en ratas Wistar. Y la calidad microbiana de los procesados de la planta de piezas, y los extractos se llevaron a cabo.

Hasta el momento, de los problemas indicados anteriormente, seis proyectos de investigación que constituyen las tesis de grado de seis estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de UTMACH están en la fase final de acabado bajo mi dirección académica y continua y el asesoramiento científico.

MARCO TEÓRICO

El logro de una buena salud es perdurable persecución del hombre desde su creación y ha tratado de lograr este objetivo utilizando diferentes herramientas, experiencia y tecnología. En cada etapa de este esfuerzo, gran dependencia se ha colocado en la rica flora y fauna del mundo como fuentes de materias primas. Las plantas han sido útiles para el hombre como alimento, refugio y medicinas (Burkill, 1985). Las hojas verdes de las plantas son tan extremadamente beneficioso para la salud. Además de usar las hojas verdes como la comida, hojas verdes específicos son excelentes medicinas naturales. Las hojas generalmente son muy limpieza, la curación, calmante, y revitalizando así como nutritiva. Un jugo de hoja verde es, de hecho, un excelente suplemento nutricional. Tales jugos menudos se utilizan en terapias naturales, incluyendo el tratamiento del cáncer. Y trabajan! Como Hipócrates el padre de la medicina, dijo "Que la comida sea tu medicina y la medicina sea tu alimento" (Sofowora, 1993; Idu, 2009). Hoy en día, la explotación de nuestros recursos naturales con el fin de lograr una buena salud está intensificando tan buena salud sigue siendo difícil de alcanzar.

Históricamente, selección farmacológica de los compuestos de origen natural o sintético ha sido la fuente de innumerables agentes terapéuticos. Una selección al azar como herramienta en el descubrimiento de nuevas moléculas biológicamente activas ha sido la más productiva

en la zona de los antibióticos (Newman *et al.*, 2000). Incluso ahora, contrariamente a la creencia común, los medicamentos de plantas superiores siguen ocupando un área importante en la medicina moderna como plantas medicinales representan una rica fuente de agentes antimicrobianos y las raíces, tallos, hojas, flores, frutos y órganos vegetales modificados están siendo utilizados para este propósito.

En los últimos años, han sido muy explotados los productos químicos de origen natural, provenientes del reino vegetal, animal y de microorganismos. Sin embargo, los productos originados de las plantas, pueden ser considerados como una fuente considerable de información para el descubrimiento de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina. Un gran número de compañías de investigación, sectores académicos e industrial, aprovechan ciertos indicios suministrados por ciertos grupos étnicos para descubrir y establecer el potencial terapéutico de los denominados fármacos naturales, los cuales son sustancias orgánicas en su mayoría complejas, que a través de procesos biotecnológicos y la automatización de las pruebas farmacológicas, son aisladas y transformadas, si es necesario, para combatir enfermedades.

Muchos de los progresos en la química de los productos naturales orgánicos de origen vegetal, se han alcanzado gracias a la instrumentación y métodos empleados. Muchas familias de plantas distribuidas en zonas tropicales son ricas en metabolitos secundarios confiriéndole una importante actividad biológica, esto ha incrementado en las últimas décadas, las investigaciones acerca de las plantas con propiedades farmacológicas. El fraccionamiento puede, en el mejor de los casos, permitir el aislamiento y posterior identificación de este tipo de compuestos (metabolitos secundarios) con posible actividad biológica, que después pueden servir como drogas de origen natural o como prototipos para la síntesis de sustancias terapéuticamente útiles.

Las plantas producen una sorprendente diversidad de metabolitos secundarios, tales como los alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos, esteroides y glicósidos, los cuales son recursos invaluable, tanto nutracéuticos como farmacéuticos. Los metabolitos secundarios son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, su producción está restringida a determinados géneros de plantas, familias e incluso a algunas especies.

La producción farmacéutica en Ecuador a partir de plantas de uso medicinal es escasa, según reportes existentes en la literatura. Los fitomedicamentos producidos son vendidos sin un control de calidad adecuado y sin condiciones adecuadas para la población, ya que es probable que no cumplan con las exigencias de normas internacionales, constituyendo un riesgo para la población. Esta situación también hace que los productos naturales nacionales no compitan con los elaborados por la industria farmacéutica foránea, aun cuando el país dispone de una gran biodiversidad de plantas medicinales que pueden constituir materias primas para la elaboración de fitomedicamentos con fines comerciales.

Desde hace mucho tiempo la FAO (Food and Agriculture Organization) reconoce la importancia de las plantas medicinales no solo por su valor para el tratamiento de las enfermedades en las poblaciones rurales, sino también por su repercusión como actividad económica, pudiendo incluso generar beneficios a través de la exportación. La FAO recomienda una recolección sostenible de la materia prima vegetal para la obtención de fitofármacos, para asegurar que los recursos sigan estando disponibles y con atención a la conservación de la biodiversidad de las plantas medicinales existentes en Ecuador (FAO, 1983).

Muchos de los usos de las plantas medicinales para tratar enfermedades provienen de los conocimientos tradicionales o saberes ancestrales. La necesidad de la validación y protección de ese conocimiento cobra relevancia por su papel estratégico en la conservación y uso sostenible de la biodiversidad. La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también su relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tienen un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 2000).

El uso de plantas medicinales reduce los riesgos de un gran número de enfermedades crónicas debido a sus propiedades antioxidantes y la modulación del daño oxidativo por contener metabolitos tales como vitaminas, poli fenoles y carotenoides (Cemeli *et al.*, 2009). Existe una gran cantidad de estudios que sugieren que una mayor ingesta de dichos compuestos secundarios, está asociada con una menor incidencia de mortalidad por

enfermedades crónicas que incluyen, además, la hipertensión arterial, la aterosclerosis y la diabetes mellitus (Avello y Cisternas, 2010).

Ecuador por ser un país multicultural y poseer una elevada biodiversidad, es un sitio estratégico para los intereses de la industria farmacéutica, puesto que su mayor riqueza está reflejada en el saber ancestral relacionado al mundo vegetal (Ríos *et al.*, 2008). En el país existen alrededor de 432 especies medicinales, 273 se expenden en las hierbe rías de los mercados y 255 son silvestres, 92 se comparten entre las de mercado y silvestres. Las especies de las hierbe rías tratan 77 enfermedades y las silvestres 74, entre las enfermedades más comunes en los dos casos están la inflamación estomacal, problemas de la circulación, afecciones nerviosas, resfrío, entre otras. Entre las especies de las hierbe rías, 178 son nativas, 83 introducidas y 12 endémicas, mientras que de las silvestres 199 son nativas, 43 introducidas y 13 endémicas (Cerón, 2006).

La extracción de los principios activos en plantas medicinales está basada en la polaridad de las moléculas y de acuerdo a esa propiedad se han desarrollado técnicas analíticas de separación, que facilitan la obtención de perfiles químicos detallados, lo que a su vez favorece el aislamiento e identificación de moléculas bioactivas con mayor rapidez y precisión. Dentro de éstas, destacan la cromatografía de capa fina o delgada (CCF ó CCD); High Performance Liquid Chromatography o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), Ultra High Performance Liquid Chromatography o cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC), cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de gases (CG) con acoplamiento a espectrómetros de masas (EM); y la resonancia magnética nuclear (RMN), todas en orden creciente de complejidad. Los resultados del uso de esas técnicas han aportado informaciones valiosas de metabolitos activos que se han usado para contrarrestar la resistencia bacteriana, enfermedades devastadoras como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la malaria (paludismo) y la diabetes, que en conjunto representan las tasas de mortalidad más altas del mundo (Villa-Ruano *et al.*, 2011).

Organización Mundial de la Salud define la medicina tradicional como la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias

indígenas de distintas culturas que, pudiendo explicarse o no, utilizados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2008). Varias partes de la planta, ya sea utilizado solo o en combinación con otros se han utilizado con eficacia para el tratamiento de enfermedades virulentas tales como la artritis, el asma, el cáncer, el cólera, la diabetes, hernia, la hipertensión, las hemorroides, edema y la fiebre tifoidea (Adebisi, 1999; y Faleyimu Oluwalana, 2008). Por lo tanto, el interés va en aumento por el investigador y los usuarios en el uso de plantas médicamente tanto para usos tradicionales y como potencial nueva fuente de fármacos y nutracéuticos para el tratamiento de seres humanos y animales.

Alimentos y nutrientes juegan un papel importante en la salud de una entidad biológica. Una de tales funciones es en el mantenimiento de alto nivel de inmunidad. Los estudios han demostrado que las enfermedades y la infección siempre vienen después de bajar de la inmunidad del huésped (Ibeh, 2005; Isitua y Ibeh, 2011). Por lo tanto, si la inmunidad del huésped podría ser mantenida a nivel de pico por alimentos saludables y nutrientes, será posible reducir o prevenir las enfermedades e infecciones. Y un instrumento que podría lograr esto podría convertirse en una herramienta útil de intervención en el ciclo de infección y enfermedades humanas.

Moringa oleífera que pertenece a la familia Moringaceae se cultiva con éxito en Ecuador y en todo el cinturón tropical. Las diferentes partes de esta planta se utilizan en los sistemas indígenas de medicina para la prevención y el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas tales como: la desnutrición, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, las condiciones obstétricas, dolores reumáticos y articulares, infecciones microbianas, entre otros; y también se come como alimento (Farjana *et al.*, 2003). El M. oleífera planta posee un perfil nutricional impresionante y numerosas cualidades terapéuticas. Contiene cientos de fitoquímicos, compuestos nutricionales que van desde vitaminas y minerales a los ácidos grasos omega y todos los aminoácidos esenciales (Fahey, 2005).

Este estudio tiene como objetivo la explotación de las plantas como uno de esos instrumentos que pueden funcionar como una herramienta de intervención para el control de la enfermedad. Y para lograr este objetivo, una formulación té de hierbas con propiedades

nutricionales y medicinales se produce a partir de hojas de *Moringa oleifera* en combinación con otras plantas y productos vegetales (hojas de Stevia, jugo de limón y las cáscaras de fruta, zumo de fruta de naranja y cáscaras de piña y jugo de frutas y cáscaras). El farmacognóstico, farmacológica, proximal, propiedades antimicrobianas y fisiológicas de la fórmula té herbal desarrollado y se determinó establecido para tener los ingredientes y las propiedades necesarias para funcionar como una herramienta de intervención útil para la desnutrición, infección y control de la enfermedad humana.

El resultado de esta investigación ha proporcionado contribuciones útiles a la validación de uso medicinal de esta planta en Ecuador, proporcionando información científica suficiente que pueden apoyar y abogar por el uso de esta especie vegetal estudiados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre los antecedentes de este proyecto de investigación, se podría indicar:

- El Artículo 350 de la Constitución de la República del Ecuador, el cual señala que el Sistema de Educación Superior tiene como finalidad la formación académica y profesional con visión científica y humanista: la investigación científica y tecnológica; la innovación, promoción, desarrollo y difusión de los saberes y las culturas: la construcción de soluciones para los problemas del país, en relación con los objetivos del régimen de desarrollo.

- El Artículo 13 de la LOES la cual cita - Funciones del Sistema de Educación Superior.- Son funciones del Sistema de Educación Superior:

a) Garantizar el derecho a la educación superior mediante la docencia, la investigación y su vinculación con la sociedad, y asegurar crecientes niveles de calidad. Excelencia académica y pertinencia.

Adicionalmente, uno de los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir (Obj. 3) del gobierno de Ecuador es “Mejorar la vida de la población”. Entre sus políticas y metas considera “Fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando la medicina ancestral y alternativa al sistema Nacional de salud”. En sintonía con estas políticas, en la Planta Piloto

de Farmacia se vienen desarrollando algunos proyectos para generar fitofármacos a partir de recursos naturales autóctonos.

Con este proyecto de investigación, se planteó la necesidad de validar científicamente el empleo de las plantas medicinales *Moringa oleifera* que se usan y cultivan en Ecuador, mediante un estudio amplio de sus propiedades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, citotóxica y pre-clínica), así como la caracterización química de sus principios bioactivos e incentivar la producción de fitomedicamentos seguros y eficaces a partir de estas drogas vegetales cultivadas en el país.

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales como parte de la terapéutica, sin embargo, las tendencias actuales precisan fusionar el uso tradicional o empírico con la evidencia científica (Avello y Cisternas, 2010). La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros seguridad y eficacia (Mosihuzzaman y Choudhary, 2008). Ello resulta aún más importante en los medicamentos a base de plantas medicinales, en los que la problemática es mucho más compleja que en los fármacos de síntesis.

Los metabolitos secundarios son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009), por lo que es importante identificar los metabolitos secundarios presentes en plantas medicinales *Moringa oleifera* en esta investigación, para confirmar sus potencialidades químicas y farmacológicas. Además, es importante hacer un estudio de evaluación de la seguridad para validar adicionalmente el uso de esta planta.

Por lo indicado anteriormente, resulta de suma importancia realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos a las plantas medicinales para corroborar sus potencialidades y garantizar una explotación racional y sustentable. En vista de que no existen reportes en la literatura, sobre información científica suficiente de las plantas medicinales en estudio cultivadas en Ecuador, que garantice el uso seguro de las mismas, se hace necesario evaluar la química,

mediante las técnicas mencionadas previamente (Wu *et al.*, 2013), y actividad biológica de esas especies vegetales.

DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La cobertura que tuvo esta Propuesta de Trabajo, fue la siguiente:

Con esta investigación, se pretendía conocer los ingredientes activos de la planta *Moringa oleifera* cultivada en la Unidad Académica de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador, ya que el contenido es muy importante evaluar como plantas medicinales y nutricionales. En gran medida, la cantidad de los ingredientes activos depende en gran medida de las condiciones ambientales o entorno en el que la planta ha crecido. Así, la identificación y cuantificación de los principios activos, permiten su uso con fines farmacológicos y nutricionales.

La investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Investigación de, Microbiología y Planta Piloto de Farmacia la Unidad académica de Ciencias Químicas y de la Salud, en el Cultivo de *Moringa oleifera* de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala Planta; laboratorios de la Escuela Superior Politécnica del Litoral Laboratorio PROTAL- ESPOL Guayaquil y Ministerio de Economía y Competitividad de España (En colaboración con la doctora María José Sánchez-Muros Lozano, compañera de prometeo en UTMACH). Las frutas utilizadas fueron comprados en la ciudad de Machala y otras áreas pertenecientes a la provincia de El Oro.

Las fases de la investigación realizada, fueron las siguientes: recolección de los ejemplares y secado (Mayo-Junio 2014), obtención de los extractos orgánicos (Junio -Julio 2014), pruebas químicas o análisis fitoquímico preliminar, physico-quimico y amino ácidos (Julio - Agosto 2014), analizar los actividad antimicrobianos, control de calidad, citotoxicidad (Agosto-Diciembre 2014), recolección mas de los ejemplares de planta para formulación de Tea(diciembre 2014-enero 2015), Te formulación con frutas, calificación de té, y análisis proximal, antimicrobianos, physico-quimico, antioxidante, calcio y magnesio, vitamina; evaluar de toxicidad y inmunológicos con ratas Wistar(enero 2015 - Marzo 2015) analizar

los sangre para bioquímico y hematológico parámetros, evaluar histopatológico de y redacción del informe final (Marzo-Abril 2015).

Los sujetos que participaron en la realización de este estudio fueron algunos estudiantes de las carreras de Bioquímica , estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia que realizan sus Trabajos de Titulación bajo mi tutoría, algunos Docentes y Profesionales de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, mi contraparte técnico Dra. Carmita Jaramillo Jaramillo ADMINISTRADOR TECNICO DE LABORATORIO PLANTA PILOTO DE FARMACIA mi persona.

A continuación, se presentan las variables que se consideraron para la Investigación, siguiendo las cuatro secciones a desarrollar según la Matriz de Planificación:

Investigación: Datos experimentales obtenidos en los análisis químicos y biológicos realizados a las semillas, flores, fruto verdes, raíz, tallo, hojas de las plantas y té formulación en estudio, una vez que fueron procesadas y obtenidos los extractos respectivos. Artículo publicado. Número de artículos proceso de redacción. Número de proyectos de Investigación asesorados.

Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad: Sesiones de clases personalizadas a estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia, en el Laboratorio. Sesiones de tutorías personalizadas a estudiantes tesistas. Cursos en tópicos del área de investigación de plantas medicinal.

Docencia a impartir: Cursos en microbiología de plantas medicinal. Sesiones de trabajo dirigidas a la producción del anteproyecto de Tesis de Titulación. Número de proyectos de Titulación de tesistas del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia. Participar en asesorías y dirección de trabajos de investigación para el concurso Galardones 2014.

Relacionamiento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional: Actividades de Investigación orientadas hacia la búsqueda de Acuerdos de Cooperación entre Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL)/UTMACH. Participación en redes de conocimiento, específicamente en una Red de Investigación en Biotecnología y post-grado

(Universidad de Quevedo). Difusión de trabajos en congresos internacionales. Producción de Proyecto con otras instituciones universitarias y de investigación.

JUSTIFICACIÓN

La importancia y relevancia que tiene la propuesta de trabajo que se ha realizado, son las siguientes:

Los fitomedicamentos son un valor agregado a la producción de plantas medicinales y ya tienen un posicionamiento en el conjunto de productos terapéuticos de los laboratorios tradicionales, lo cual indica que los principios activos de plantas medicinales están siendo utilizados en el tratamiento de diversas patologías, tanto con fines preventivos como curativos. Las plantas medicinales usadas correctamente proveen alternativas para prevenir y tratar numerosas condiciones de salud de forma efectiva y segura.

La información obtenida de este estudio es de importancia para fundamentar y respaldar investigaciones dirigidas a la búsqueda de drogas vegetales de calidad, seguras y eficaces que pueden ser utilizadas en la elaboración de fitofármacos seguros y eficaces, específicamente a partir de *M. oleífera*, entre otras especies analizadas.

Esta investigación se justifica con el Art. 32 sección 7 SALUD, del Plan Nacional del Buen Vivir, que textualmente dice: “Derecho a la Salud” y se ajusta a la norma 3 que plantea: “Mejorar la calidad de vida de la población”, ya que esta investigación se propone contribuir al mejoramiento de la salud humana.

Con este proyecto se dio cumplimiento a lo estipulado por la Ley Orgánica de Educación superior (LOES) en su artículo 8 literal c) que plantea “Contribuir al conocimiento, preservación y enriquecimiento de los saberes ancestrales y de la cultura nacional, y en el artículo 387; Objetivo 2, Política 2,6 que describe textualmente “Promover la investigación y el conocimiento científico, la revalorización de conocimientos y saberes ancestrales, y la innovación tecnológica”.

Adicionalmente, la presente propuesta de investigación incluyó la participación de varios estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, contribuyendo en parte a su desarrollo, cumpliendo así con el artículo 350 de la ley anteriormente mencionada, ya que de esta manera se contribuyó al proceso de aprendizaje teórico-experimental y se favoreció la formación académica y profesional con visión científica y humanística de los estudiantes, en especial de los seis estudiantes asesorados por mi persona en la realización de sus Trabajos de Titulación.

El desarrollo de este proyecto que contemplo el análisis fitoquímico e proximal, actividad biológica, té de hierbas nutricional formulado y de estudio pre-clínica de las especies *M. oleífera*, permitió evaluar la presencia de metabolitos bio-activos y su poder antimicrobiano, antioxidante y cito-tóxico, así como el control de calidad microbiológico de dichas materias primas; toxicidad e inmunológico con ratas Wistar. Los resultados del proyecto tributan al campo Salud y podrán ser aplicados como alternativas terapéuticas para la población. Además, este proyecto contribuyó al desarrollo de la investigación y la docencia en la Unidad Académica, al permitir la formación y superación de estudiantes y profesionales con habilidades teóricas y prácticas en el área de la farmacognosia, fotoquímica, microbiología y toxicología. Se logró la realización de seis tesis de pre-grado o trabajos de titulación, la obtención de publicaciones de impacto internacional, la participación en eventos internacionales (tercera Cumbre Internacional de Toxicología y Farmacología Aplicada, Chicago, EE.UU. 2014 y Natural Descubrimiento del producto y de la Conferencia de Desarrollo, San Diego, CA, EE.UU. 2015), entre otros resultados importantes.

OBJETIVO GENERAL

Objetivo General

"Desarrollar de una formula nutricional de la planta *Moringa oleífera* con valor medicinal".

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos se agruparon siguiendo las áreas de la Matriz de Planificación de los Investigadores del Programa Prometeo

1 Investigación

1.1. Objetivos específicos

Evaluar científicamente varias plantas medicinales; especialmente *Moringa oleifera* en relación con el desarrollo de una fórmula nutricional saludable.

1.1.1. Analizar los componentes fitoquímicos

1.1.2. Analizar los agentes antimicrobianos

1.1.3. Analizar la composición nutricional proximal

1.1.4. Preparar la fórmula nutricional

1.1.5. Realizar control de calidad de la fórmula

1.1.6. Evaluar la toxicidad de la fórmula utilizando modelos animales

1.1.7. Evaluar los diversos índices que se refiere a la toxicología

1.1.8. Realizarlos estudios de inmunomodulación

1.1.9. Evaluar la histopatología de los principales órganos de los animales expuestos a la fórmula.

2. Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad (dirigida a estudiantes y profesores de la institución)

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Dictar cursos y talleres a investigadores del área acerca de los métodos microbiológicos relacionados con la etnomedicina (investigación sobre plantas medicinales), utilizando procedimientos estandarizados.

2.1.2. Voy a trabajar en colaboración con investigadores de UTMACH para crear una línea de investigación importante y duradera en el desarrollo de investigaciones sobre plantas medicinales.

3 Asesoría en la elaboración de políticas públicas (No Aplica)

4 Docencia a impartir (dirigida a estudiantes)

4.1. Objetivos específicos

4.1.1. Cursos teórico-prácticos a los estudiantes de pregrado de Microbiología y toxicología, tanto en el laboratorio como en el aula de la UTMACH.

5 Asesoría y diseño de programas de postgrado (No Aplica)

6 Gestión de recursos nacionales e internacionales (No Aplica)

7 Relacionamento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional

7.1. Objetivos específicos

7.1.1. Lograr una vinculación con Instituto Nacional de Investigaciones de Salud Pública y el Ministerio de Educación para el desarrollo de proyectos relacionados con las formulas nutricionales a partir de plantas medicinales.

7.1.2. Realizar un convenio interinstitucional entre la Universidad Técnica de Machala y otras universidades del país que estén trabajando con líneas de investigación similares.

7.1.3. Realizar acuerdos de cooperación con productores de plantas medicinales e investigadores del área agrícola.

7.1.4. Se hará promoción para el desarrollo de jornadas locales Científicas y reuniones con otras instituciones para generar intercambio de conocimientos entre entidades relacionadas con el estudio y desarrollo de fórmulas nutricionales a partir de plantas medicinales.

RESULTADOS OBTENIDOS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

Artículos Científicos indexados:

1. Propiedades fitoquímicos y nutricionales de polvo de hoja seca de *Moringa oleífera* Lam. de Machala provincia de El Oro del Ecuador (Ingles: Phytochemical and nutritional properties of dried leaf powder of *Moringa oleifera* Lam. from Machala El Oro Province of

Ecuador); publicado en Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 5 (2): 8-16 (<http://www.pelagiaresearchlibrary.com>).

2. La actividad antimicrobiana y la citotoxicidad de la hoja, tallo y raíz de *Moringa oleífera* Lam. planta de Ecuador (Ingles: Antimicrobial activity and cytotoxicity of the leaf, stem and root of *Moringa oleífera* Lam. plant from Ecuador) (en proceso de redacción); será presentado al Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (<http://www.springer.com>) .

3. Antibacterianos y cito tóxicos potenciales de la flor y la vaina verde de *Moringa oleífera* Lam. planta que crece en la Universidad Técnica de Machala Ecuador (Ingles: Antibacterial and cytotoxic potentials of the flower and green pod of *Moringa oleífera* Lam. plant grown in Universidad Tecnica de Machala Ecuador) (en proceso de redacción); será enviado a Elsevier Journal of Biomedicine and Pharmacotherapy (<http://www.journals.elsevier.com>).

4. Estudios comparativos sobre los componentes fitoquímicos y proximal de la hoja, tallo y la raíz de la planta *Moringa oleífera* crecido en Machala Ecuador (Ingles: Comparative studies on the phytochemical and proximal constituents in the leaf, stem and root of *Moringa oleífera* plant grown in Machala Ecuador) (en proceso de redacción); la intención de enviarlo a Journal of Ethnopharmacology (<http://www.journals.elsevier.com/locate/jethpharm>).

2 TITLE: PHYTOCHEMICAL AND NUTRITIONAL PROPERTIES OF DRIED LEAF POWDER OF *Moringa oleífera* Lam. FROM MACHALA EL ORO PROVINCE OF ECUADOR

*CHINWE CHRISTY ISITUA,^{1, 3} MARIA JOSE SANCHEZ-MUROS LOZANO,² CARMITA JARAMILLO JARAMILLO¹ AND FAUSTO DUTAN¹

¹ Planta Piloto de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Tecnica de Machala, Avd. Panamericana km 5,5 via Pasaje Machala, Ecuador.

² Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Tecnica de Machala, Avd. Panamericana km 5,5 via Pasaje Machala, Ecuador.

³ Department of Biological Sciences, College of Sciences, Afe Babalola University, Ado-Ekiti, KM 8.5 Afe Babalola Way, P.M.B. 5454, Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria.

[E-mail *christyking@yahoo.com](mailto:christyking@yahoo.com), isituacc@abuad.edu.ng

Tel: +593987103687, +2348023372109.

ABSTRACT

Moringa oleifera commonly called Moringa, is a valuable tree whose fruits, roots and leaves have been advocated for traditional, medicinal and industrial uses. The phytochemical and nutritional properties of the dried leaf powder of *M. oleifera* used as nutraceuticals, dietary supplements, functional foods or a source of vegetable in meal preparation were investigated in this study to scientifically provide an empirical evidence for its use and benefits. Using standard phytochemical screening procedures the phytochemicals identified were tannins, saponins, alkaloids, flavonoids, cardiac glycosides and reducing sugars. The physico-chemical analysis using standard official methods and gas chromatography revealed the following nutrients; proteins (24.31 %), carbohydrate (55.97 %), ashes (11.50 %), crude fiber (10.28 %), total fat (9.22 %), moisture (6.12 %), caloric value (404.10 Kcal/100g) and saturated fatty acids (3.77 %), unsaturated fatty acids (5.45 %), monounsaturated fatty acids (0.87 %), polyunsaturated fatty acids (4.58 %) and Trans fatty acid (0.00 %) for fatty acid profile. Using acid hydrolysis and ion-exchange chromatography, the amino acid analysis report showed the presence of essential and semi essential amino acids in varying amounts with a total of 27.16 nmol at 570nm and proline was 1.432 nmol at 440nm. These findings have far reaching nutritional importance in the healthcare system of this country and will help to address undernutrition in a cost effective manner. Thus, the use of *M. oleifera* leaves as nutrients should be encouraged and sustained in this and other countries.

Keywords: *Moringa oleifera* Lam., Phytochemical, Nutritional, Leaf powder, Ecuador.

INTRODUCTION

The use of plants in traditional medical practice has a long drawn history, and remains the mainstay of primary health care in most of the third world. Traditional medicines are used by about 60% of the world population in both developing and developed countries where modern medicines are predominantly used (Mythilypriya *et al.*, 2007). An estimated 60-80% Africa's and Latin America's population depends solely on herbal remedies for its primary health care needs. In diversity, plants are thought to be between 250,000 to 400,000 species spread across all continents from the Antarctic to the Arctic. They thrive in all environments from the flooded planes to the deserts, and from those who live on the seas and oceans to others that thrive on fresh water and ponds (Adesuyi *et al.*, 2012). For classification and easy identification, plants were divided into different taxonomical groups known as kingdoms; these were further streamlined into phylum, class, order, family, genus and species. Within the family of the Moringaceae is found a miracle plant called *Moringa oleifera*.

M. oleifera in English is known as Drumstick tree, Horseradish tree and Ben tree; in Spanish it is called Moringa, Ben and Ángela, in Hindi it is known as Saguna and Sainjna and its common name is Moringa (Mishra, 2011). It is a small, fast growing, evergreen or deciduous tree with a soft and light wood indigenous to South Asia, mainly Himalaya's foothills, India (Ganatra *et al.*, 2012). It has been grown and naturalized in other countries like Pakistan, Afghanistan, Sri Lanka, Bangladesh, Arabian Peninsula, East and West Africa, throughout the West Indies and Southern Florida, in Central and South America from Mexico to Peru as well as in Paraguay and Brazil (Gupta, 2010); cultivated for human food, medicine, dye, textiles, fodder, water purification or clarification, etc. All its parts (leaves, roots, seeds, flowers, bark, stem-bark, green pods) have much impressive range of medicinal uses with higher nutritional value. The leaves mainly contain various glycosides of thiocarbamate and isocyanide class; pterygospermin, moringyne, niaziridin, 4 – (α – L – rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate, 4 – (α – L – rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate, etc. are few of them which are isolated and therapeutically proved by scientific studies (Fahey, 2005).

Traditionally, it is used to treat many diseases throughout the world (mainly in Thai) and many of them are scientifically proved, which mainly include; antihypertensive, antiasthmatic, diuretic, anticancer, antibiotic, antiulcer, analgesic, CNS- depressant, antiepileptic, anti-inflammatory, anthelmintic, antiurolithiatic and many more (Isitua and Ibeh, 2013). Recently, workshops are going on highlighting the importance of *M. oleifera* leaves in Africa and other developing nations, as it is used to overcome malnutrition especially in infants and nursing mothers. Three non-governmental organizations in particular – Tree for Life, Church World Service and Educational Concerns for Hunger Organization have advocated Moringa as natural nutrition for the tropics (Ganatra *et al.*, 2012).

Proximate and nutrient analyses of edible plants and vegetables play a crucial role in assessing their nutritional significance (Pandey *et al.*, 2006). As various medicinal plant species are also used as food along with their medicinal benefits, evaluating their nutritional significance can help to understand the worth of these plant species (Pandey *et al.*, 2006). For as herbal drug's standardization is concerned, WHO also emphasize on the need and importance of determining proximate and micronutrients composition of the herbal plants. Such herbal formulations must pass through standardization processes (Niranjan and Kanaki, 2008). Medicinal plants play a significant role in providing primary health care services to rural people and are used by about 80% of the marginal communities around the world (Prajapati and Prajapati, 2002; Latif *et al.*, 2003; Shinwari *et al.*, 2006). Each medicinal plant species has its own nutrient composition besides having pharmacologically important phytochemicals. These nutrients are essential for the physiological functions of human body. Such nutrients and biochemical like carbohydrates, fats and proteins play an important role in satisfying human needs for energy and life processes (Novak and Haslberger, 2000). Fortunately, chemical composition diversity in plants also includes many compounds that are beneficial to humans: vitamins, nutrients, antioxidants, anticarcinogens, and many other compounds with medicinal value (Novak and Haslberger, 2000).

In the ancient days of human existence, by instinct, intuition, or trial and error, man was able to identify various plants used to combat various ailments. In fact, it is the knowledge

derived from the active components of these plant extracts that guided man to synthesize and use modern drugs in health care delivery. Presently, there has been a renewed interest in the study of medicinal plants such that much percentage of pharmaceutical preparations is based on natural products from plants. Over the years, our people have passed down knowledge of the types and applications of medicinal plants from generation to generation, often orally. The compilation of useful drugs derived from medicinal plant is impressive; these include; heart drugs, analgesics, anesthetics, antibiotics, anti-cancer and anti-parasitic compounds, anti-inflammatory drugs, oral contraceptive hormones, as well as laxative diuretics (Morris, 2004).

Plants generally contain chemical compounds (such as saponins, tannins, oxalates, phytates, trypsin inhibitors and cyanogenic glycosides) known as secondary metabolites, which are biologically active (Soetan and Oyewole, 2009). Secondary metabolites may be applied in nutrition and as pharmacologically-active agents (Soetan and Oyewole, 2009). Plants are also known to have high amounts of essential nutrients, vitamins, minerals, fatty acids and fiber (Gafar and Itodo, 2011). In Ecuador, as in many Latin American countries, malnutrition is a serious health problem and although infant mortality has decreased, the survivors manifest lasting repercussions throughout life time (Fernandez and Ortiz, 2013). The cultivation and awareness of the numerous benefits of *Moringa oleifera* is springing up in the Republic of Ecuador and there arise the need to produce herbal formulations from Moringa cultivated in Ecuador to scale up nutrition – addressing undernutrition in a cost effective manner. Based on this, there is little or no report on the phytochemical and nutritional composition of Moringa cultivated in Ecuador. Hence the aim of this work was to determine the nutrient composition of the dried leaf powder of this plant in order to scientifically provide an empirical evidence for its use and benefits to man.

MATERIALS AND METHODS

Source of plant material

The leaves of *Moringa oleifera* used for this study were collected from the matured tree in an orchard within the plantation of Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Tecnica de Machala, Ecuador.

After collection, the leaves were removed from the branches, sorted out to separate the bad ones from the good ones, washed properly with sterile water and spread on clean mesh trays for drying. The leaves were shade dried for a period of 7 – 10 days for proper drying in the Pharmacy Pilot Plant Laboratory, Faculty of Chemical Sciences and Health, Universidad Tecnica de Machala, Ecuador. Upon drying, the leaves were pulverized under aseptic conditions using a grinder (Lab. Mill serial No. 56969, Type AR 400 Erweka® Apparatebau GmbH Heusenstamm Germany) into fine powdery form, sieved and stored in dry airtight glass jar for phytochemical and nutritional analyses.

Extraction of plant material

The powdered plant material (100 g) was macerated in 98 % methanol (500 ml) in a glass jar for 72 hours and was shaken intermittently throughout the period. Another portion of the powdered plant material (100 g) was macerated in distilled water (500 ml) for 24 hours and was shaken intermittently. The aqueous filtrate was evaporated to dryness in a hot air oven set at 40°C to obtain a brownish residue. The methanol extract was concentrated using a water bath to evaporate the extracting solvent (methanol) and later transferred to hot air oven set at 40°C to evaporate any trace of the solvent to obtain a greenish brown residue. The extracts obtained were stored in the refrigerator at 4°C until when required for phytochemical analysis.

Phytochemical screening

The aqueous and methanol extracts were separately screened for the presence of bioactive constituents using standard phytochemical techniques as described by Trease and Evans (1996) and Williamson *et al.* (1996).

Nutritional property analyses

The Moringa leaf powder sample was conserved in a fresh and dry atmosphere (climatic zone IV) with climatic test conditions of temperature $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ and relative humidity $55\% \pm 15\%$ prior to analysis in the laboratory.

a) Proximate analysis

Determination of proximate composition was carried out in accordance with Association of Official Analytical Chemists (AOAC) methods (1990). The proximate analysis is a conventional system of analysis that gives the quantitative as well as qualitative idea of nutrients present in a particular food sample. Individual nutrients such as amino acids, fatty acids, monosaccharide etc. are not considered. The gross components considered are moisture content, ash content, protein, fat, crude fiber, carbohydrate, as well as caloric value calculated from values of carbohydrate, fat and protein (Pearson, 1976; Onyeike and Osuji, 2003). All the methods used in estimating the chemical composition of the plant samples were standard methods of AOAC (1990) except where otherwise stated.

Carbohydrate content was estimated by subtracting the values obtained for fat and protein from organic matter. The percentage of organic matter was calculated by subtracting the percentage of ash from one hundred (100) (Onwuka, 2005). The caloric value of the sample was calculated using “Atwater factor” by multiplying the value of the crude protein, lipid and carbohydrate by 4, 9, 4 respectively and taking the sum of the product (Onwuka, 2005).

b) Estimation of fatty acids

Fatty acid profile of the Moringa leaf powder was determined using gas chromatography in accordance with the methods outlined by AOAC (1990). The investigated fatty acids include: saturated, unsaturated, monosaturated, polysaturated and Trans fatty acids.

c) Amino acid analysis

Quantitative amino acid analysis of protein in *Moringa oleifera* leaf powder was determined using acid hydrolysis and ion exchange chromatography (Biochrom 30) technique. Sample hydrolysates were prepared in accordance with the standard procedures of USP/ EP/ JP (Japanese Pharmacopoeia, 2007). Briefly, appropriate acid hydrolysis of the protein in the leaf powder sample (1.5 mg) was done and 3% injected into the apparatus for amino acid

analysis. The amino acid standard used was norleucine. Free amino acids were separated by ion-exchange chromatography followed by postcolumn derivatization with ninhydrin. The postcolumn reaction between ninhydrin and amino acid eluted from the column was monitored at a wavelengths of 570 nm and 440 nm, and the chromatogram obtained was used for the determination of the amino acid composition.

RESULTS

The data obtained in the course of the experiments are shown in the tables and figures below and the discussion of these result are also given.

Pharmacologically active principles identified in *M. oleifera* leaf powder from Ecuador include; alkaloids, flavonoids, saponins, reducing sugars, tannins and glycosides with water showing a better extraction spectrum than methanol (Table 1). This finding is on a par with results of other researchers (Manjari *et al.*, 2007 and Isitua, 2013). These phytochemicals contribute significantly to protection against infection and degenerative diseases.

The macro nutrients and amino acids with their various compositions identified in this study are shown in Tables 2 and 3 and Figures 1 and 2 respectively. The moisture content (6.12 %), crude protein content (24.31 %), ash content (11.50 %), crude fiber (10.28), total carbohydrate (55.97 %), fat content (9.22 %) and caloric value (404.10 kcal/100g) of the present study were in good agreement with those obtained from Ghana (Oduro *et al.*, 2008), India (Joshi and Mehta, 2010), China and Rwanda (Mukunzi, *et al.*, 2011) and Burkina Faso (Yameogo *et al.*, 2011), but, was at variance with the values obtained from Nigeria (Isitua, 2013). The 17 amino acids and their compositions identified in this study, is in agreement with the results of several studies conducted in this regard on *Moringa oleifera* leaves, but with little variations (Moyo *et al.*, 2011; Mensah *et al.*, 2012; Isitua, 2013). These variations in the nutritional composition of Moringa leaf powder could be as a result of differences in agro-climatic conditions, age of the trees and possibly due to different stages of maturity of leaves. The highest amount of amino acids was glycine, which had a value of 3.63 % and the

least content was cysteine with 0.19 %. The Moringa leaf powder were found to contain 5.45 % unsaturated fatty acids and 3.77 % of saturated fatty acids with no Trans fatty acids.

Table 1: Phytochemical constituents in extracts of *M. oleifera* leaf and their health benefits

Constituents	Aqueous extract	Methanol extract	Health Benefits
Tannins	++	+	Bactericidal, anti-inflammatory and anti-parasitic.
Saponins cholesterol	+	+	Antioxidant, anticancer, reduction & immune support.
Alkaloids	+++	+	Treatment of malaria, diabetes, cancer, cardiac dysfunction & pain.
Flavonoids inflammatory,	+	+	Antitumoral, anti-antibacterial & antioxidants.
Glycosides	++	+	Treatment of congestive heart failure & cardiac arrhythmia.
Reducing sugars	+	-	Provide energy for proper body function.

*Key: +++, *Highly present*; ++, *Moderately present*; +, *Slightly present*; -, *Not present*

Table 2: Nutritional composition of *M. oleifera* leaf powder

Parameters	Values (Per 100g powder)
Moisture (g)	6.12
Protein (g)	24.31
Crude fiber (g)	10.28
Ash (g)	11.50
Fat (g)	9.22
Total Carbohydrate (g)	55.97
Calories (Kcal)	404.10

**Values are mean of duplicate determinations*

Table 3: Fatty acid profile of *M. oleifera* leaf powder

Parameters	Values (Per 100g powder)
Saturated fatty acids	3.77
Unsaturated fatty acids	5.45
Monounsaturated fatty acids	0.87
Polyunsaturated fatty acids	4.58
Trans fatty acids	0.00

**Values are mean of duplicate determinations*

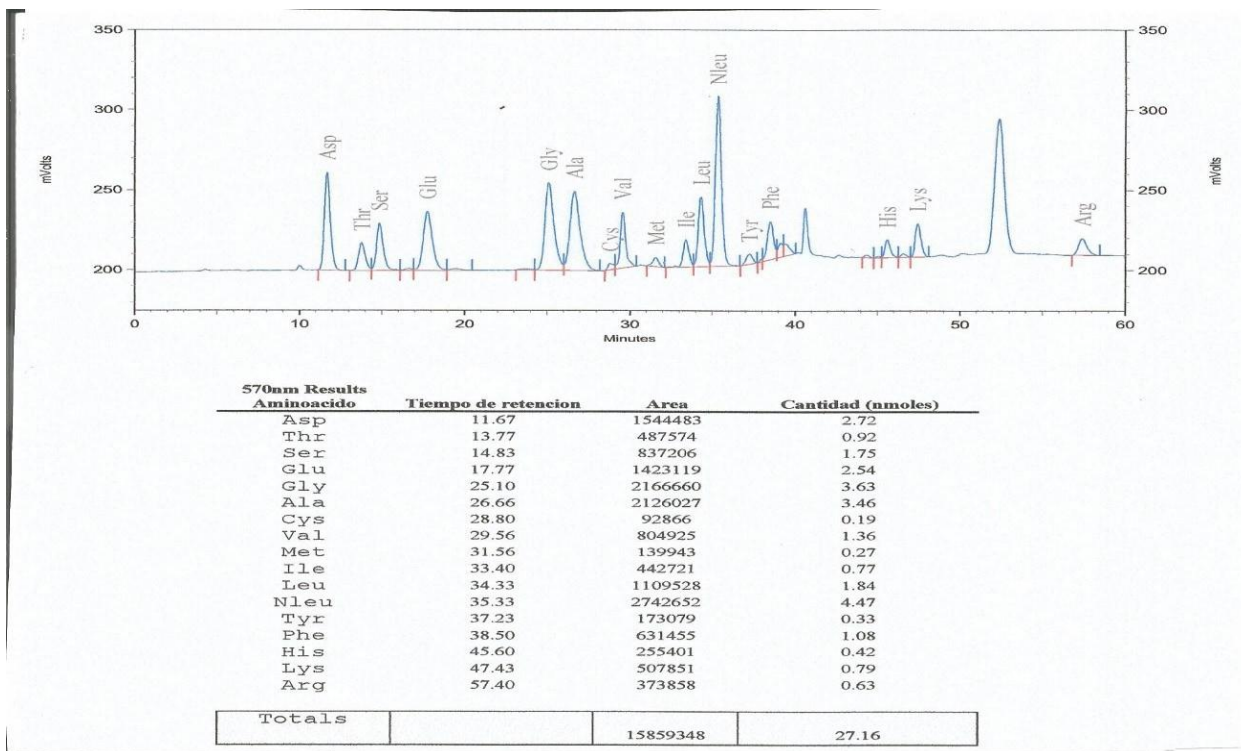


Figure 1: Ion-exchange chromatogram and composition of amino acids in *M. oleifera* leaf powder at 570 nm

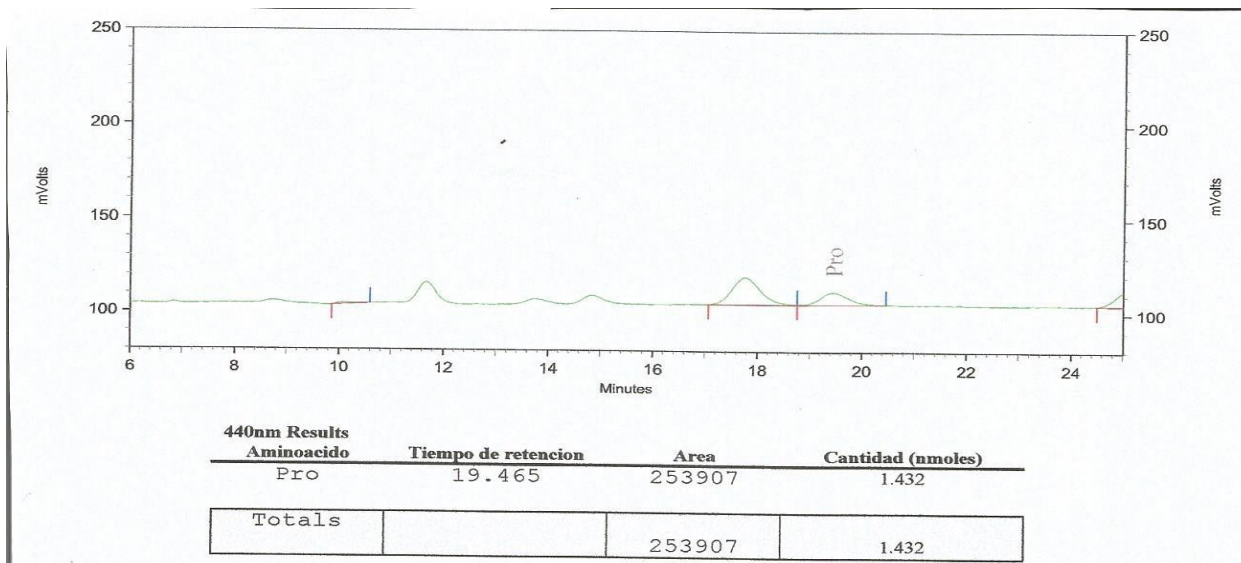


Figure 2: Ion-exchange chromatogram and composition of amino acids in *M. oleifera* leaf powder at 440 nm

DISCUSSION

The study showed that Moringa leaves contain nutritious compounds. Noteworthy is the crude protein (CP) content of 24.31 % observed in this study, although lower than sunflower seed cake's CP of 35.88% which is mostly used as protein concentrate (Mapiye *et al.*, 2010). This makes the Moringa leaves to be a good potential source of supplementary protein in animal diets. Other studies have reported variable protein contents ranging between 16, 22.42, 23.27, 27.4 and 40% (Gidamis *et al.*, 2003; Sarwatt *et al.*, 2004; Nouala *et al.*, 2006; Reyes-Sanchez *et al.*, 2006; Oduro *et al.*, 2008; Sanchez-Machado *et al.*, 2009; Isitua, 2013). This level of crude protein content is of particular nutritional significance as it may meet animal's protein and energy requirements and boost the immune system against diseases (Kyriazakis and Houdijk, 2006; Brisibe *et al.*, 2009). General growing ruminants like goats require 16% CP (Luginbuhl and Poore, 1998). The CP supplied by Moringa is above the protein of goats making it ideal for use as a protein supplement. Moringa is reported to have high quality protein which is easily digested and that is influenced by the quality of its amino acids (Foidl *et al.*, 2001). In this study, the dried Moringa leaves contained 17 amino acids, which slightly differ from the findings of Foidl *et al.* (2001), Sanchez- Machado *et al.* (2009) and Moyo *et al.* (2011) who reported 18, 16 and 19 amino acids respectively. Out of the 17 amino acids observed, 09 were classified as essential amino acids, namely; threonine, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, histidine and lysine. Glycine had the highest value of 3.63 %, which differed with Moyo *et al.* (2011) who reported the value of 1.53 %. In their work, Moyo *et al.* (2011) reported alanine having the highest value of 3.033 %, which is lower than that of our findings (3.46 %). Cysteine had the least values followed by methionine, which is commonly deficient in green leaves. Methionine and cysteine are powerful antioxidants that help in the detoxification of harmful compounds and protect the body from radiation (Brisibe *et al.*, 2009). The variations in the amino acid composition could be influenced by protein quality and the origin of the plant (cultivated or

wild). This may indicate that the Moringa was grown in fertile soils. Amino acids are organic compounds that combine to form proteins; as such, they influence the quantity and quality of protein. Amino acids are classified as essential and non-essential, which vary according to animal species and their production system (Swanepoel *et al.*, 2010). Rumen microbes synthesize the essential amino acids from other amino acids or from nitrogen containing substances. The efficiency of rumen microbial growth and activity in the rumen is enhanced by the presence of adequate amino acids, peptides and most macro and micro minerals (Swanepoel *et al.*, 2010). Each amino acid has a specific function in the animal's body. In general, amino acids are required for the production of enzymes, immunoglobulins, hormones, growth and repair of body tissues and form the structure of red blood cells (Brisibe *et al.*, 2009). In addition, they contribute to the formation of glucose, acting as a buffer when other precursors are in short supply (Swanepoel *et al.*, 2010). Amino acids also affect the function of other nutrients in the animal's body such as presence of lysine, which ensures adequate calcium absorption and aids in the antibody production.

The dry leaves could serve as a protein supplementary source in animal and human diets. This protein content is of particular nutritional significance since it has been suggested that amino acids supplementation is important in meeting a substantial proportion of an animal's protein and energy requirements (Brisibe *et al.*, 2009). Diets rich in amino acids help to boost the immune system against gastro intestinal parasites infestations (Kyriazakis and Houdijk, 2006). Proteins are also essential for continuous replenishment of the endogenous protein that is lost due to infections with gastro-intestinal helminthes (Coop and Holmes, 1996). Fat provides very good sources of energy and aids in transport of fat soluble vitamins, insulates and protects internal tissues and contributes to important cell processes (Jones *et al.*, 1985, Pamela *et al.*, 2005). Moreso, it is good to add fat to most of our diets, because many body functions depend on lipids.

As observed in this study, Moringa contains more dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) than the saturated fatty acids (SFA). A higher content of PUFA and lower amount of SFA is desirable (Hoffman and Wilklund, 2006), as such, its inclusion in the diet is recommended as it prevents the occurrence of diseases thereby promoting good health.

PUFA are important for human and animal health. They are of interest because they are precursors of long chain *n*-3 PUFA in the eicosanoids biosynthesis, which are viewed as important bioregulators of many cellular processes (Khotimchenko, 2005). They are linked to the development and functionality of the immune system. Consumers have preference of food low in saturated fatty acids (SFA) because they are associated with an increased risk of cardio-vascular diseases and some cancers (Griffin, 2008; Alfaia *et al.*, 2009). Human nutritionists urge consumers to increase intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA), particularly the *n*-3 PUFA at the expense of *n*-6 PUFA (Hoffman and Wiklund, 2006; Alfaia *et al.*, 2009). The quantity and composition of fatty acids in the animals' body are related to the presence of some of their precursors in the diet, since some of the fatty acids are absorbed in the body unchanged (Wood *et al.*, 2003).

The low moisture content of the leaf powder is an attribute to a very high shelf life. Hence, long storage of the leaf powder would not lead to spoilage due to microbial attack and this supports the practice of storage in dry form by users. Also, moisture content is among the most vital and mostly used measurement in the processing, preservation and storage of food (Onwuka, 2005). Ash in food contributes the residue remaining after all the moisture has been removed as well as the organic materials (fat, protein, carbohydrates, vitamins, organic acid etc.) have been incinerated at a temperature of about 500 °C (Onwuka, 2005). Thus, the ash content of the dried leaf powder is taken to be a measure of the mineral content of the original food. The crude fiber level (10.28%) obtained in this study is considered appropriate, because it aids absorption of glucose and fat. Crude fiber is made up largely of cellulose together with a little lignin which is indigestible in human. Although crude fibre enhances digestibility, its presence in high level can cause intestinal irritation, lower digestibility and decreased nutrient usage (Jimoh and Oladiji, 2005).

The dried *Moringa oleifera* leaf powder is a rich source of carbohydrate with great caloric value that can contribute to the caloric requirement of the body. Carbohydrates provide the body with a source of fuel and energy that is required to carry out daily activities and exercise. Our bodies need a constant supply of energy to function properly and a lack of

carbohydrates in the diet can cause tiredness or fatigue, poor mental function and lack of endurance and stamina. Carbohydrates are also important for the correct working of our brain, heart and nervous, digestive and immune systems. They are an essential part of a healthy diet and should make up 50% of our daily calorie intake. Thus, majority should come from complex carbohydrates, preferably the wholemeal varieties, as well as a large intake of fruits and vegetables.

Looking at all the properties of the Moringa leaves, this probably explains the traditional use of the plant as an herbal tonic in India, because of its high levels of readily available essential nutrients and mineral resources, which may be required for the maintenance of electrical potential of nervous tissues and cell membranes. It can as well be used for the treatment of blood related disorders that is necessary for the improvement of the overall well-being of the body (Khalafalla *et al.*, 2010). The nutritional variations observed among the studies could be attributed to the genetic background of the plant, in terms of ecotype and cultivar, environmental factors that include the soil and climate (Sanchez-Machado *et al.*, 2009). In addition, the cultivation method used encompasses the frequency of harvesting and age of the plant or leaves. Mode of conservation between collection and analysis (drying, refrigeration, freezing) might influence the leaves' nutritional composition (Barminas *et al.*, 1998; Broin, 2006). The data derived from phytochemical and nutrient characterization of Moringa are clear indications that the plant leaves are rich in healthy bioactive compounds and nutrients; and has potential to be used as medicine, feed and or food additive with multiple purposes. These include serving as a protein, fatty acid, mineral and vitamin resource for animal and human feed formulations. High nutritional content found in the dried leaves are important nutritional indicators of the usefulness of the plant as a likely feed resource. Drying the leaves assists to concentrate the nutrients, facilitate conservation and consumption, as such, it can be used during the time when feed is scarce or can be transported to areas where it is not cultivated. It is suggested that Moringa should be consumed in the powder form. Moringa has been reported to possess some medicinal properties (Fahey, 2005); its inclusion in the diets could function as curative and therapeutic therapy. As such, it can be used to improve health and nutrition.

CONCLUSION

This study can be considered as the first information on the nutritional and phytochemical composition of *Moringa oleifera* leaves from Ecuador. It indicates that the studied dry leaf powder is an excellent source of nutrients required for human existence in combating nutritional deficiencies like kwashiorkor, cardiovascular diseases amongst others. Its fiber content provides bulk in the diet and can help to enhance gastrointestinal function, prevents constipation and may reduce cholesterol content. The phytochemical content makes the leaf pharmacologically active and may serve as supplements for food, as they have potentials to improve the health status of its users. Therefore, *M. oleifera* dry leaf powder can be a cost effective, suitable functional ingredients for improving nutraceuticals, nutritional and organoleptic properties of food; its use in diets should be encouraged and sustained in Ecuador and other countries.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank specially “Prometeo Project” of the Secretariat of Higher Education Science Technology and Innovation (SENESCYT) Republic of Ecuador, for funding this research.

REFERENCES

- Adesuyi, A.O., Elumm, I.K., Adaramola, F.B. and Nwokocha, A.G.M. (2012). Nutritional and phytochemical screening of *Garcinia kola*. *Advanced Journal of Food Science and Technology*, 4 (1): 9-14.
- Alfaia, C.P.M., Alves, S.P., Martins, S.I.V., Costa, A.S.H., Fontes, C.M.G.A., Lemos, J.P.C., Bessa, J.B. and Prates, J.A.M. (2009). Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. *Food Chemistry*, 114: 939–946.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2010). *Official Methods of Analysis*. 18th Edn., Washington, DC. 3: 920-925.

Barminas, J.T., Charles, M. and Emmanuel, D. (1998). Mineral composition of non-conventional leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 53: 29-36.

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 Chemistry*, 115: 1240-1246.

Broin, M. (2006). The nutrient value of *Moringa oleifera* Lam. leaves: What can we learn from figure? 2006 Moringa news workshop. http://www.moringanews.org/doc/GB?Posters?Broin_poster.pdf. accessed 18/05/2010.

Coop, R.L. and Holmes, P.H. (1996). Nutrition and Parasite Interaction. *International Journal of Parasitology*, 26(8-9): 951-962.

Fahey, J.W. (2005). *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional therapeutic and prophylactic properties, Part I, *Tree Life Journal*, 1 (5): 5-15.

Fernandez, A. and Ortiz, M. (2013). Evaluacion nutricional y su impacto en el coeficiente intelectual en escolares Ecuatorianos de 5 al 12 anos de edad. *Investigacion y Desarrollo Universidad Tecnica de Ambato*, 1: 19-25.

Foidl, N., Makkar, H.P.S. and Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: "The Miracle Tree/The Multiple Attributes of Moringa" (Ed. Lowell J. Fuglie). CTA. USA.

Gafar, M. K. and Itodo, A.U. (2011). Proximate and mineral composition of hairy indigo leaves. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10 (3): 2007-2018.

Ganatra, T.H., Joshi, U.H., Bhalodia, P.N., Desai, T.R. and Tirgar, P.R. (2012). A panoramic view on pharmacognostic, pharmacological, nutritional, therapeutic and prophylactic values of *Moringa oleifera* Lam. *International Research Journal of Pharmacy*, 3 (6): 1-7.

Gidamis, A.B., Panga, J.T., Sarwatt, S.V., Chove, B.E. and Shayo, N.B. (2003). Nutrients and anti-nutrient contents in raw and cooked leaves and mature pods of *Moringa oleifera*, Lam. *Ecology Food and Nutrition*, 42: 399-411.

Griffin, B.A. (2008). How relevant is the ratio of dietary n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids to cardiovascular disease risk? Evidence from the OPTILIP study. *Current Opinion Lipidol.*, 19: 57-62.

Gupta, R.K. (2010). "*Medicinal & Aromatic Plants*". CBS publishers & distributors. 151-152.

Hoffman, L.C. and Wiklund, E. (2006). Game and venison-meat for the modern consumers. *Meat Science*, 74: 197-208.

Isitua, C.C. and Ibeh, I.N. (2013). Toxicological assessment of aqueous extract of *Moringa oleifera* and *Caulis bambusae* leaves in rabbits. *Journal of Clinical Toxicology*, S12: 003.doi: 10. 4172/2161-0495. S12-003.

Isitua, C.C. (2013). Evaluation of the antimicrobial and physiological properties of *Moringa oleifera* Lam. leaf as herbal food supplement. *Ph.D. Research Dissertation* University of Benin, Nigeria, 223pp.

Japanese Pharmacopoeia (2007). *General Notices of Japanese Pharmacopoeia and Other Standard*. 15th Edn., MHLW Ministerial Notification. No. 65: 1655-1662.

Jimoh, F.O. and Oladiji, A.T. (2005). Preliminary studies on *Pilostigma thonningii* seeds: Proximate analysis, mineral composition and phytochemical screening. *African Journal of Biotechnology*, 4 (12): 1439-1442.

Jones, M. M., Johnson, D. O., Netlerville, J. T., Wood, J. I. and Joesten, M. D. (1985). *Chemistry and Society*. 5th Edn., Saunders College Publishers U. S. A., 521- 577.

Joshi, P. and Mehta, D. (2010). Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. *Metabolomics*, 1: 5-9.

Khalafalla, M.M., Abdellatef, E., Dafalla, H.M., Nassrallah, A.A., Aboul-Enein, K.M., Lightfoot, D.A., El-Deeb, F.E. and El-Shemy, H.A. (2010). Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 9(49): 8467-8471.

Khotimchenko, S.V. (2005). Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*. *Chemical and Natural Compounds*, 41(3): 285-288.

Kyriazakis, I. and Houdijk, J.G. (2006). Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research*, 62: 79-82.

Luginbuhl, J.M. and Poore, M.H. (1998). Nutrition of meat goats. http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/animal/meatgoat/MGNutri.htm. accessed 02/07/2010.

Latif, A., Ahmad, H., Begum, S., Adnan, M., Hassian, S. and Waseem, M. (2003). Medicinal and other economic plants as substitute to forest logging in Miandam and

Sulatanr valleys, Swat. *Proceedings of international workshop on conservation and sustainable use of medicinal and aromatic plants in Pakistan*. WWF Pak., 101-105.

Manjari, M., Piyush M. and Agarwal, A.C. (2007). Pharmacognostical and phytochemical investigation of antidiabetic activity of *Moringa oleifera* Lam. leaf. *The Indian Pharmacist*, 6 (59): 70-72.

Mapiye, C., Chimonyo, M., Dzama, K., Muchenje, V. and Strydom, P.E. (2010). Meat quality of Nguni steers supplemented with *Acacia karroo* leaf meal. *Meat Science*, 84(4): 621-627.

Mensah, J.K., Ikhajiagbe, B., Edema, N.E. and Emokhor, J. (2012). Phytochemical, nutritional and antibacterial properties of dried leaf powder of *Moringa oleifera* (Lam) from Edo Central Province, Nigeria. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2 (1): 107-112.

Mishra, G. (2011). "Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: An overview". *Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre*, 3(2): 141-164.

Morris, R. N. (2004). *Plant for a Future*, Charitable Publishers Ltd., England, 20 – 25.

Moyo, B., Masika, P.J., Hugo, A. and Muchenje V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60): 12925-12933.

Mukunzi, D., Nsor-Atindana, J., Xiaoming, Z., Gahungu, A., Karangwa, E., Mukamurezi, G., Al-Domi, H., Princewill-Ogbonna, I.L., Ogbonna, P.C. and Arief, N.J. (2011). Comparison of volatile profile of *Moringa oleifera* leaves from Rwanda and China using HS-SPME. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 602-608.

Mythilypriya, R., Shanthi, P. and Sachdanandam, P. (2007). Oral acute and subacute toxicity studies with Kalpaamruthaa, a modified indigenous preparation on rats. *Journal of Health Sciences*, 53 (4): 351-358.

Niranjan, R. M, Kanaki S. **2008**. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. 349-369.

Nouala, F.S., Akinbamijo, O.O., Adewumi, A., Hoffman, E., Muetzel, S. and Becker, K. (2006). The influence of *Moringa oleifera* leaves as substitute to conventional concentrate on the *in vitro* gas production and digestibility of groundnut hay. *Livestock Research and Rural Development*, Vol. 18.

Novak, W. K, Haslberger, A. G., **2000**. *Food Chemistry and Toxicology*, 38: 473-483.

Oduro, I., Ellis, W.O. and Owusu, D. (2008). Nutritional potential of two leafy vegetables: *Moringa oleifera* and *Ipomoea batatas* leaves. *Science Research Essays*, 3(2): 57-60.

Onwuka, G.I. (2005). *Food Analysis and Instrumentation; Theory and Practice*. Naphthalic prints, Surulere, Lagos, Nigeria. 219- 230.

Onyeike, E.N. and Osuji, J.O. (2003). *Research Techniques in Biology and Chemical Sciences*. Springfield Publishers Ltd. Owerri, Nigeria. 403pp.

Pamela, C.C., Richard, A.H. and Denise, R.F. (2005). *Lippincotts Illustrated Reviews Biochemistry* 3rd Edn., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 335- 388.

Pandey, M., Abidi, A.B., Singh, S. and Singh, R.P. (2006). Nutritional evaluation of leafy vegetable. *Paratha Journal of Human Ecology*, 19 (2): 155-156.

Prajapati, N.D. and Prajapati, T. (2002). Sustainable cultivation of medicinal plants; multitier agriculture system- A new concept URL www.technopreneur.net/times/technology.

Pearson, D. (1976). *The Chemical Analysis of Foods*. 17th Edn., Churchill Livingstone, London. 3-4.

Reyes Sanchez, N., Spordly, E. and Ledin, I. (2006). Effects of feeding different levels of foliage from *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, 101(1-3): 24-31.

Sanchez-Machado, D.I., Nunez-Gastelum, J.A., Reyes-Moreno, C., Ramirez- Wong, B. and Lopez-Cervantes, J. (2009). Nutritional Quality of edible Parts of *Moringa oleifera*. *Food Analytical Method*, DOI 10.1007/s1261- 009-9106-Z.

Sarwatt, S.V., Milang'ha, M.S., Lekule, F.P. and Madalla, N. (2004). *Moringa oleifera* and cottonseed cake as supplements for smallholder dairy cows fed Napier grass. *Lives Res Rural Development*, Vol. 16.

Shinwari, Z. K., Rehman, M., Watanabe, T. and Yoshikawa (2006). *A Pictorial Guide to Medicinal Plants of Pakistan*. Kohat University of Science and Technology. Pakistan

Soetan, K.O. and Oyewole, O.E. (2009). *African Journal of Food Science*. 3(9): 223-232.

Swanepoel, N., Robinson, P.H. and Erasmus, L.T. (2010). Amino acids needs of lactating dairy cows: Impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Animal Feed Science Technology*, 157(1-2): 79-94.

Trease, G.E. and Evans, W.C. (1996). *A Textbook of Pharmacognosy*. 14th Edn. Bailliere Tindall Ltd., London, 60-75.

Williamson, E. M., David, T. O. and Fred, J. E. (1996). *Pharmacological Methods in Phototherapy Research*. Vol. 1: Wiley and Sons.

Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R. and Enser, M. (2003). Effect of acids on meat quality: A review. *Meat Science*, 66: 21–32.

Yameogo, C.W., Bengaly, M.D., Savadogo, A., Nikiema, P.A. and Traore, S.A. (2011). Determination of chemical composition and nutritional values of *Moringa oleifera* leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 264-268.

TITLE: Antimicrobial activity and cytotoxicity of the leaf, stem and root of *Moringa oleifera* Lam. plant from Ecuador.

*CHINWE CHRISTY ISITUA,^{1,3} CARMITA JARAMILLO JARAMILLO¹ AND DIANA SANMARTIN GALVAN², HAYDELBA D'ARMAS^{1,4}

¹ Planta Piloto de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Avd. Panamericana km 5,5 via Pasaje Machala, Ecuador.

² Laboratorio Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Avd. Panamericana km 5,5 via Pasaje Machala, Ecuador.

³ Department of Biological Sciences, College of Sciences, Afe Babalola University, Ado-Ekiti, KM 8.5 Afe Babalola Way, P.M.B. 5454, Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria.

⁴ Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumana, Venezuela

[E-mail *christykings@yahoo.com](mailto:*christykings@yahoo.com), isituacc@abuar.edu.ng

[E-mail: carmitagjj@hotmail.com](mailto:carmitagjj@hotmail.com), cjaramillo@utmachala.edu.ec

[E-mail: dmsg_25@hotmail.com](mailto:dmsg_25@hotmail.com)

[E-mail: htrinidad86@hotmail.com](mailto:htrinidad86@hotmail.com)

ABSTRACT

Medicinal plants are natural resources yielding valuable herbal products which are often used in the treatment of various ailments. Aqueous and methanol extracts from leaf, stem and root of *Moringa oleifera* Lam. were screened for their antibacterial activities while chloroform extracts from this plant parts were screened for brine shrimp lethality bioassay. The extracts were tested for their *in vitro* growth inhibitory effects against three pathogenic bacteria- *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* using the agar dilution and agar well diffusion methods. Mortality of the brine shrimp naupli (*Artemia salina*) was assessed by lethality bioassay and the mean lethal concentration (LC₅₀) values were obtained by probit analysis. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the aqueous and methanol extracts against the pathogenic bacteria were 25 mg/mL (leaf and root), 50 mg/mL (stem) and 12.5 mg/mL (leaf, stem and root) respectively. The methanol extracts produced zones of inhibition that were comparable to those produced by ciprofloxacin (20 mg). The LC₅₀ values of leaf, stem and root were found to be 16.43, 33.43 and 34.88 µg/mL respectively. The experimental results revealed that the leaf is more cytotoxic and showed highest activity against the three bacteria. Findings suggest that the different plant extracts possess potent growth inhibitory and cytotoxic potentials which validates their use in the treatment of microbial infections and as anti-tumor agent in ethnomedicine.

Keywords: *Moringa oleifera*, Cytotoxicity, Antimicrobial, Ethnomedicine.

TITLE: Antibacterial and Cytotoxic Potentials of the Flower and Green pod of *Moringa oleifera* Lam. plant grown in Ecuador.

*CHINWE CHRISTY ISITUA,^{1,3} CARMITA JARAMILLO JARAMILLO¹ AND DIANA SANMARTIN GALVAN², HAYDELBA D'ARMAS^{1,4}

¹ Planta Piloto de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Avd. Panamericana km 5,5 via Pasaje Machala, Ecuador.

² Laboratorio Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Avd. Panamericana km 5,5 via Pasaje Machala, Ecuador.

³ Department of Biological Sciences, College of Sciences, Afe Babalola University, Ado-Ekiti, KM 8.5 Afe Babalola Way, P.M.B. 5454, Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria.

4 Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumana, Venezuela

[E-mail *christykings@yahoo.com](mailto:christykings@yahoo.com), isituacc@abuad.edu.ng

[E-mail: carmitagjj@hotmail.com](mailto:carmitagjj@hotmail.com), cjaramillo@utmachala.edu.ec

[E-mail: dmsg_25@hotmail.com](mailto:dmsg_25@hotmail.com)

[E-mail: htrinidad86@hotmail.com](mailto:htrinidad86@hotmail.com)

ABSTRACT

The search for plant products as antimicrobial and anti-tumor agents will continue because of the ever-present need to find new substances with better therapeutic indices than the already existing agents. Methanol extracts from flowers and green pods of *Moringa oleifera* Lam. were analyzed for their antibacterial activities and brine shrimp lethality bioassay. The extracts were tested for their *in vitro* growth inhibitory effects against three pathogenic bacteria- *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* using the agar dilution and agar well diffusion methods. Mortality of the brine shrimp naupli (*Artemia salina*) was assessed by lethality bioassay and the mean lethal concentration (LC₅₀) values were obtained using the statistical program Finney 2 (binomial, moving average, probit and logit methods). The minimum inhibitory concentrations (MIC) of both extracts against the pathogenic bacteria was 6.25 mg/mL. The methanol extracts from the flower and green pods produced zones of inhibition that were comparable to those produced by ciprofloxacin (20 mg). The LC₅₀ values of the flower and green pod were found to be 169.11 and 44.30 µg/mL respectively (logit method). The experimental results revealed that the green pod is more cytotoxic and showed highest activity against the three bacteria. Findings suggest that the plant extracts possess potent growth inhibitory and cytotoxic potentials. Therefore, they might be utilized as promising materials in the field of pharmaceuticals and nutraceuticals.

Key word: *Moringa oleifera*, antibacterial activities, cytotoxic potentials.

CONTRIBUCIÓN AL PLAN DEL BUEN VIVIR

Este proyecto de investigación se relacionó con el Objetivo No. 3 del Plan Nacional del Buen Vivir: “Mejorar la calidad de vida de la población”, específicamente en su apartado 3.4: “Fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando la medicina ancestral y alternativa al Sistema Nacional de Salud”.

La información obtenida de este trabajo de investigación constituye un aporte muy valioso y de gran importancia para la elaboración de fitofármacos y fito-nutrientes seguros y eficaces, a partir de drogas vegetales de calidad previamente estandarizadas y validadas con estudios científicos. De esta manera los resultados obtenidos fomentan la producción de fitofármacos y/o nutraceutico, con potencial de impulsar inmune, actividad farmacológica antibacteriana, anti fúngica, antioxidante y/o antitumoral demostrada en los experimentos realizados con las plantas medicinales en cuestión, cultivadas en suelo ecuatoriano.

DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS ALCANZADOS

1. INVESTIGACIÓN (VER ANEXO DIGITAL 1)

A partir de esta investigación, un artículo científico ha sido publicado en una revista indexada, mientras que tres artículos están en el proceso de la escritura y serán enviados a diversas revistas indexadas listados a continuación. Además, otros artículos serán desarrollados y publicados en su momento.

Artículos Científicos:

1. Propiedades fitoquímicos y nutricionales de polvo de hoja seca de *Moringa oleífera* Lam. de Machala provincia de El Oro del Ecuador (Ingles: Phytochemical and nutritional properties of dried leaf powder of *Moringa oleifera* Lam. from Machala El Oro Province of

Ecuador); publicado en Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 5 (2): 8-16 (<http://www.pelagiaresearchlibrary.com>).

2. La actividad antimicrobiana y la citotoxicidad de la hoja, tallo y raíz de *Moringa oleífera* Lam. planta de Ecuador (Ingles: Antimicrobial activity and cytotoxicity of the leaf, stem and root of *Moringa oleífera* Lam. plant from Ecuador) (en proceso de redacción); será presentado al Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (<http://www.springer.com>) .

3. Antibacterianos y cito tóxicos potenciales de la flor y la vaina verde de *Moringa oleífera* Lam. planta que crece en la Universidad Técnica de Machala Ecuador (Ingles: Antibacterial and cytotoxic potentials of the flower and green pod of *Moringa oleífera* Lam. plant grown in Universidad Tecnica de Machala Ecuador) (en proceso de redacción); será enviado a Elsevier Journal of Biomedicine and Pharmacotherapy (<http://www.journals.elsevier.com>).

4. Estudios comparativos sobre los componentes fitoquímicos y proximal de la hoja, tallo y la raíz de la planta *Moringa oleífera* crecido en Machala Ecuador (Ingles: Comparative studies on the phytochemical and proximal constituents in the leaf, stem and root of *Moringa oleífera* plant grown in Machala Ecuador) (en proceso de redacción); la intención de enviarlo a Journal of Ethnopharmacology (<http://www.journals.elsevier.com/locate/jethpharm>).

Publicaciones en Congresos:

Representación de UTMACH en la "tercera Cumbre Internacional de Toxicología y Farmacología Aplicada", que se celebró en Double Tree by Hilton Hotel Chicago-North Shore EE.UU. 20-22 de octubre de 2014 como investigador principal, que expone la obra (proyecto SENESCYT) titulado: "fitoquímico y las propiedades nutricionales de polvo de hoja seca de *Moringa oleífera* Lam. de la provincia de Machala El Oro del Ecuador "(El resumen del póster presentado se publica en el libro de actas del congreso, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.s1.013>).

Representación de UTMACH en el "Descubrimiento y Desarrollo de Productos Naturales en el Post era de la genómica", celebrada en el Westin Gaslamp Quarters San Diego, CA,

EE.UU. 11-14 enero de 2015, como investigador principal, que expone la obra (proyecto SENESCYT) titulado: "La actividad antibacteriana y la citotoxicidad de las diferentes partes de Moringa oleifera Lam. planta de Ecuador" (El resumen del póster presentado se publica en el libro de actas del congreso, <http://www.simbhq.org/docs/np/NP15Program.pdf>).

Además, voy a presentar algunos de mis resultados de investigación del proyecto SENESCYT en el próximo "Primer Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología UTMACH 16 y 17 de abril 2015", según el investigador principal, voy a exponer la obra titulada: "antibacteriana y potenciales cito tóxicos de la flor y la vaina verde de Moringa oleifera Lam planta. Crecido en la Universidad Técnica de Machala Ecuador”.

2. CAPACITACIÓN ACADÉMICO-CIENTÍFICA (VER ANEXO DIGITAL 2)

Transferencia de conocimientos y adiestramiento científico a algunos Investigadores, Profesores y estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad de Ciencias Químicas y de la Salud de la UTMACH, en la realización de análisis fitoquímicos necesarios en el campo de los etnomedicina, productos naturales orgánicos y producción de fitofármacos, tales como pruebas de caracterización química de grupos funcionales de compuestos químicos, métodos de extracción orgánica, cuantificación de metabolitos secundarios, pruebas antimicrobiano actividad, dilución en serie, técnicas difusión agar pocillos, normalización microbiana, método microbiana-desafío, entre otros.

Capacitación teórica y experimental en la realización de pruebas de actividad biológica o bioensayos, tales como actividad antibacteriana (preparación de medios de cultivo, metodología de montaje del ensayo y medida del efecto del extracto contra cepas de bacterias), antifúngica (preparación de medios de cultivo, metodología de montaje del ensayo y medida del efecto del extracto contra cepas de hongos) y cálculo de las unidades formadoras de colonias en la determinación de la calidad microbiana de extractos de hierbas, el funcionamiento, las funciones y usos de flujo laminar recién adquiridos y Tauttner autoclave, identificación de microorganismos y microscopía. Además, de métodos de cuantificación de metabolitos secundarios (por método espectrofotometría) y determinación

de la actividad antioxidante de los mismos, y Toxicidad oral aguda para determinar los efectos de los extractos de hierbas en ratas Wistar.

Asesorías en la elaboración y desarrollo de proyectos de investigación involucrados en los aspectos previamente mencionados, los cuales se están aún llevando a cabo bajo la dirección y asesoría académico-científica continua y de la Dra. Carmita Jaramillo contraparte técnico, y constituirán las Tesis o Trabajos de Titulación de algunos estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la UCQS-UTMACH, los mismos son:

- Análisis proximal de las hojas, tallo y raíz de la especie vegetal *Moringa oleífera*.
- Evaluación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos secundarios del tallo de la planta *Moringa oleífera* para aplicación nutricional y medicinal.
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas, raíz y tallo de la planta *Moringa oleífera*.
- Estudio fitoquímico y antiinflamatorio de la raíz de la planta *Moringa oleífera*.
- Evaluación de la toxicidad oral de hojas, tallo y raíz de la especie vegetal *Moringa oleífera* en ratas Wistar.
- Formulación y evaluación de un té de hierbas nutricionales de *Moringa oleífera* (reemplazando el proyecto aprobado: "Análisis proximal de las semillas y frutos verdes de la especie vegetal *Moringa oleífera* cultivada en la unidad académica de ciencias Agropecuarias de la UTMACH, Provincia de El Oro". Y esto se debe a la falta de disponibilidad de las semillas y frutos verdes de *Moringa* en la unidad académica de ciencias Agropecuarias).
- Consultoría dirigida a la preparación de un profesor (Johnny Pérez) en UCQS-UTMACH para el desarrollo exitoso de su PhD. propuesta de proyecto de investigación en el área de Microbiología.

3. DOCENCIA (VER ANEXO DIGITAL 3)

Docencia y la formación se le dio a los investigadores (3) y los estudiantes de cuarto año paralelo A & B que estudian Bioquímica y Farmacia (43) y los estudiantes de quinto año de Ingeniería de Alimentos (12) de la Facultad de Química y Salud UTMACH en la transferencia de conocimiento en todos los aspectos importantes de las técnicas microbiológicas para aplicar en la determinación de las actividades antimicrobianas de plantas y productos vegetales; específicamente: la difusión del disco, dilución en tubo, los métodos de difusión de agar bien, la determinación de las zonas de inhibición y sus interpretaciones, la normalización microbiana, funciones, uso y cuidado de los equipos recién adquiridos (flujo laminar y Tuttnauer autoclave automático y manual) en el laboratorio de microbiología, los medios de comunicación preparación y esterilización, la microscopía, la bioseguridad, entre otros.

-Asesoramiento de Tesis de Pregrado o Trabajos de Titulación

1. Análisis proximal de las hojas, tallo y raíz de la especie vegetal *Moringa oleífera*. Estudiante: **Jessica Fabiola Brito Carmona**.
2. Evaluación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos secundarios del tallo de la planta *Moringa oleífera* para aplicación nutricional y medicinal. Estudiante: **Gisela Katherine Fernández**.
3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas, raíz y tallo de la planta *Moringa oleífera*. Estudiante: **Jessica Karina Ramírez**.
4. Estudio fitoquímico y antiinflamatorio de la raíz de la planta *Moringa oleífera*. Estudiante: **Tania Lorena Bastidas Guerrero**.
5. Evaluación de la toxicidad oral de hojas, tallo y raíz de la especie vegetal *Moringa oleífera* en ratas Wistar. Estudiante: **Nelly Katherine Guaycha Perez**.
6. Formulación y evaluación de un té de hierbas nutricionales de *Moringa oleífera* (reemplazando el proyecto aprobado: "Análisis proximal de las semillas y frutos verdes de la especie vegetal *Moringa oleífera* cultivada en la unidad académica de ciencias Agropecuarias de la UTMACH, Provincia de El Oro". Y esto se debe a la falta de

disponibilidad de las semillas y frutos verdes de Moringa en la unidad académica de ciencias Agropecuarias). Estudiante: **Ruddy Estefanía Placencio Franco**.

4. RELACIONAMIENTO ESTRATÉGICO INTERINSTITUCIONAL A NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL

► Está en proceso la creación de una Red de Investigación en Biotecnología y post-grado, que dirige la Universidad de Quevedo, y de la cual formaremos parte, o sea la UTMACH a través de mi persona y otros prometeos vinculados a la UTMACH.

► Colaboradora del Proyecto "*Investigaciones en plantas medicinales para el desarrollo de fitofármacos y fórmulas nutricionales seguros y eficaces*", elaborado por el grupo de investigación de la Planta Piloto de Farmacia, al cual pertenezco, según la Convocatoria 2014 del Centro de Investigaciones-UTMACH.

► La participación / colaboración con otros investigadores (nacionales e internacionales) en el equipo PRfC2 ("*Programa de Resiliencia Frente al Cambio Climático- PRfC2*") y estamos en el escenario para desarrollar nuestra propuesta para la convocatoria nacional de proyectos del programa SENESCYT.

► Participó en el comité de organización de dos conferencias científico importantes que tuvo lugar en UTMACH: "*VII Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura (FIRMA, Ecuador 2014)*" de 18 a 21 nov, 2014 y vine (I Congreso de Apicultura y meliponicultura en Ecuador), Machala 21 y 22 de febrero 2015 evento científico.

► Participado y asistido a diversos talleres científicos (en UTMACH y UTEQ). Participó en el taller y la reunión celebrada en la Universidad de Cuenca, sobre el Código de Social Economía del Conocimiento y la Innovación (COESC-i) propuesta herramienta virtual de SENESCYT dando mi apoyo y contribuciones. Colaboró con investigadores y estudiantes en la Planta Piloto de Farmacia en la exitosa "*II Concurso de reconocimiento a la Investigación universitaria estudiantil, Galardones Nacionales, Convocatoria 2014*" (en

Cuenca y Guayaquil) y dio exposiciones (en proyecto SENESCYT) en las conferencias internacionales en EE.UU.

► Participó en la evaluación de dos notas conceptuales de SENESCYT: "*Purificación de Componentes del suero de quesería de las provincias de Manabí, Pichincha, Santo Domingo, Azuay, Loja, multas estafadores Napo y Tungurahua Funcionales y disminución de la contaminación ambiental*" y "*Grado de incidencia y Medidas de Control de las Principales bacterias patógenas en La Cadena Productiva de CARNICOS en la provincia de Chimborazo*".

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones y recomendaciones obtenidas del proceso de investigación siguiendo el orden de las distintas áreas de la Matriz de Planificación:

Investigación

Un té de hierbas con propiedades nutritivas y medicinales fue desarrollado y validado de Moringa oleífera y otras plantas y productos vegetales. Se llevó a cabo el completo desarrollo de las investigaciones, gracias a: la oportuna compra de una gran mayoría de materiales y reactivos necesarios, por parte de la UTMACH, SENESCYT y mi persona; la Planta Piloto de Farmacia cuenta con muchos materiales, reactivos y equipos de distintas tecnologías; y la colaboración con investigadores compañero Prometeo en UTMACH.

A partir de esta investigación, un artículo científico ha sido publicado en una revista indexada, mientras que tres artículos están en el proceso de la escritura y serán enviados a diversas revistas indexadas. Además, otros artículos serán desarrollados y publicados en su momento.

Presentación de trabajos de investigación en dos Congresos Internacionales

Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad

Se lograron la mayoría de las metas planteadas en esta propuesta de investigación, en cuanto a la capacitación a profesores y estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la UTMACH, en transferencia de conocimientos y adiestramiento científico en la realización de análisis fitoquímicos necesarios en el campo de los productos naturales orgánicos y producción de fitofármacos, así como en la realización de pruebas de actividad biológica, tales como la antibacteriana, anti fúngica, antioxidante, cito tóxico y toxicología, etc.

Tutorías personalizadas a estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia, en cuanto la elaboración de sus Proyectos de Titulación, los cuales desarrollaron bajo mi dirección y asesoría académico-científica continua, y constituirán las tesis de titulación de esos estudiantes.

Docencia a impartir

Transferencia de conocimientos sobre todos los aspectos importantes en el área de microbiología y fitofármacos, a través de un seguimiento diario del trabajo de los tesisistas y explicación continua de todos los aspectos relacionados con los tópicos de sus tesis de titulación, uso de las herramientas de la web y base datos bibliográficas, montaje de experimentos, estandarización de métodos; cálculos, gráficos y tabulación de resultados; análisis y discusión de los mismos, entre otros.

Relacionamiento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional

Cooperación y colaboración con profesionales, investigadores y profesores en las principales Fito medicina éxito, nutracéuticos, entre otros en UTMACH, UTEQ, UTPL y SENESCYT.

RECOMENDACIONES

- PPF-UTMACH debe ser apoyado para adquirir el equipo de envasado de té y materiales necesarios para el correcto envasado del té de hierbas formulado, y para realizar estudios de estabilidad, para determinar la vida útil del mismo

- Debe haber producción a gran escala de este producto; ya que esto no sólo va a generar ingresos para la universidad, sino que también contribuirá a un impacto positivo en la salud de la comunidad.
- La plantación de Moringa en Ciencias Agrícolas Facultad de UTMACH debe ser sostenible desarrollado y mejorado para el cultivo masivo y la provisión continua de todas las materias primas (Moringa) necesarios para el desarrollo de productos nutracéuticos, alimentos funcionales y bebidas en el futuro.
- Realización frecuente de talleres a los profesores, sobre redacción y crítica de artículos científicos y desarrollo de proyectos de investigación.
 - Realización de talleres dirigidos a estudiantes del ultimo ano de la carrera de Bioquímica y Farmacia, e Ingeniería de Alimentos, sobre la redacción de Proyectos de Titulación y Diseño Experimental de sus tesis de grado, y estimular a los egresados para que terminen sus Trabajos de Titulación.
 - Asignar horas de investigación a todos los docentes en su horario semanal, ya que la falta de horas asignadas a la investigación no les permite dedicarle tiempo necesario a su investigación.
 - Fomentar los convenios de cooperación interinstitucionales.

LIMITACIONES

El proyecto desarrollado en la UTMAH que está en su término, tiene continuidad, en procesos de estudio de estabilidad, producción y legalización para la comercialización del producto desarrollado, y aportar a la solución con problemas de salud, como es la desnutrición y diabetes, y dar cumplimiento al Objetivo 3. **“Mejorar la calidad de vida de la población”** del Plan Nacional del Buen vivir, pero se ve afectado porque ésta universidad

en la actualidad está suspendida la vinculación de los Becarios dentro del marco de Proyecto Prometeo de la SENESCYT.

Los docentes tienen asignado muy pocas horas de Investigación en su programación mensual, por lo que no pueden dedicarle el tiempo necesario para llevar a cabo un proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Adebisi, L.A. *Biodiversity Conservation and Ethnobotany of Selected Sacred Groves in Osun State, Nigeria*. Ph. D. Thesis, University of Ibadan. 1999, pp198.

Ávalos-García A y Pérez-Urria C. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2009, 2 (3): p 119-145.

Avello L, M. y Cisternas F, I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Med. Chile*. 2010, 138 (10): p 1288-1293.

Burkill, H.M. The useful plants of West tropical Africa. *Royal Botanical Garden Kew*. 1985, **71**: p 200-219.

Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. *Antioxidants and the Comet assay*. *Mutat Res* 2009, 681: p 51–67.

Cerón C. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. La Paz, Bolivia: Universidad de San Andrés. 2006, p 285-293.

Fahey, J.W. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal*. 2005, **1**: p 5-15.

Faleyimu, O.I. and Oluwalana, S.A. Efficacy of medicinal forest plant seeds in Ogun State, Nigeria. *Obeche Journal of Tree Club*. Department of Forest Resources Management, University of Ibadan. 2008, **26**(1): p 63-67.

Farjana, N., Zahangir, A.M., Habibur, R. and Md, E.H. *In vitro* antimicrobial activity of the compound isolated from chloroform extract of *Moringa oleifera* Lam. *Pakistan Journal of Biological Science*. 2003, **6**(22): p 1888-1890.

FAO Unasylyva-Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. *Revista Nacional de Silvicultura e industrias forestales*. 1983, Vol. 35. Rev. febrero 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/q1460s/q1460s00.htm>.

Ibeh, I. N. *General and Reproductive Toxicology*, (2nd Edn.). Ambik Press Ltd., Benin City, Nigeria. 2005, pp 297.

Idu, M. *The Plant Called Medicine*. Inaugural Lecture Series 104, University of Benin, Uniben Press, Benin City. 2009, pp 92.

Isitua, C. C. and Ibeh, I. N. Studies on the effect of an herbal food supplement on some haematological indices in rabbits. *Nigerian Journal of Life Sciences*. 2011, **1**(2): p 164-167.

Mosihuzzaman, M., Choudhary, M.I. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 2008, 80: p 2195–2230.

Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Research*. 2000, **17**: p 215-234.

Organización Mundial para la Salud (OMS). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra. 2000. Disponible en <http://archives.who.int/tbs/trm/s4930s.pdf>

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez-Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol.*, 2001, 76 (3): p 201-214

Ríos M, De La Cruz R, Mora A. Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador-saberes y prácticas. Quito-Ecuador, Ediciones Abya- Yala, 2008, p. 10.

Sofowora, A. *Medicinal Plants and Traditional Medicines in Africa*. Chichester, John Wiley and sons, New York. 1993, pp 136.

Trease, E W. *Farmacognosia*. 15th ed. España: Editorial Elsevier Limited. 2006, 9, p 41-51.

Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Lara-Zaragoza E, Franco-Monsreal E, Montserrat I, Galván-Valencia O, Ruiz-Gómez L. Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 2011, 15 (3): p 13 - 20.

WHO – World Health Organization. Report of the World Health Organization congress on traditional medicine, held in Beijing between Nov. 7-9. *Guardian Newspaper of Nov.11* 2008, p 1-4.

Wu H, Guo J, Chen S, Liu X, Zhou Y, Zhang X, Xu X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, 72: p 267– 291.

FIRMA DEL INVESTIGADOR /DOCENTE	
FIRMA CONTRAPARTE INSTITUCIONAL 1	(rúbrica y sello)
FIRMA CONTRAPARTE INSTITUCIONAL 2	(rúbrica y sello)

ANEXOS DIGITALES (1-4)