



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE
UN EXTRACTO DE HOJA DE *Moringa oleifera***

Por:

Ing. Chávez Macías Jesús Alejandra

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Diciembre de 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Alejandra Chávez Macías, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



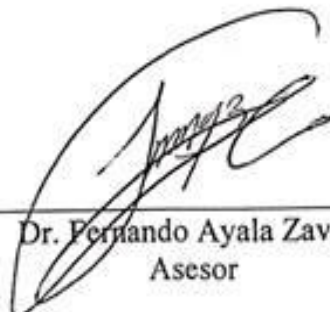
Dr. Alberto González León
Director de Tesis



Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Asesor



Dra. Verónica Mata Haro
Asesor



Dr. Fernando Ayala Zavala
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

DEDICATORIA

A todos ustedes:

Ing. Salvador Chávez Gómez

Sra. María Gpe Macías Martínez

C.P. Adriana Gpe Chávez Macías

Lic. Patricia María Chávez Macías

Ing. Salvador Alfonso Chávez Macías

Ing. Lucas Manuel Chávez Macías

Natalia Campos Chávez

Ricardo Campos Chávez

Oscar Martínez Chávez

Para mi hermosa familia dedico este trabajo, ya que formaron parte fundamental desde un inicio de este gran proyecto de vida y siempre estuvieron presentes en cada paso que di. Esto es para ustedes.

“No necesariamente un hogar funciona de la misma manera que los demás. Si lo comparásemos con una pieza musical ejecutada por el marido y la mujer, cada familia interpretará una melodía única y original. Podríamos afirmar que tanto la paz como la consistencia de una sociedad existen cuando se oye una bellísima pieza musical distinta según el hogar que la interprete.”

Daisaku Ikeda

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), le agradezco el apoyo económico y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por el acceso a sus instalaciones y la oportunidad brindada para formar parte del programa de Maestría en Ciencias.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)** por permitirme continuar con los estudios de posgrado en la misma área y por la disposición de cada uno de los integrantes de la misma, así como las críticas y consejos en cada uno de los seminarios que fueron de gran ayuda para el crecimiento personal y la mejoría del trabajo experimental. Gracias.

Agradezco a la **Dra. Ana María Mendoza Wilson**, ya que sin ella nada de esto pudo ser posible, por la oportunidad de conocer CIAD en una estancia de verano científico y contagiarme su entusiasmo y pasión por la ciencia. Gracias.

Asimismo, al **Dr. Alberto González León**, por la confianza y la aventura de aceptarme para formar parte de su equipo de trabajo sin conocer el mío. Agradezco su paciencia, consejos y conocimientos compartidos que me brindó durante todo el trayecto de la maestría, que no fue nada fácil pero siempre estuvo ahí para apoyarme con la mejor disposición y por la amistad brindada. Muchas gracias.

A la **Dra. Gloria Yépiz Plascencia** por el apoyo como coordinadora y docente de CIAD en todo momento. Gracias.

A **Tania Carvallo Ruiz**, una pieza elemental en el trabajo y un gran apoyo tanto moral como técnico. Resolviendo dudas, apoyando siempre con su actitud positiva para afrontar las trabas que surgieron con la famosa moringa que nos dio varios dolores de cabeza, pero al final, se logró un bonito trabajo en conjunto, y una bonita amistad.

A los miembros del comité: **Dra. Rosalba Troncoso**, **Dra. Vero Mata** y el **Dr. Fernando Ayala** gracias por aceptar formar parte de este proyecto, las atenciones que tuvieron en estos dos años y cuatro meses, los consejos y por la amistad que se formó.

Agradezco a **Cuquis**, quien se ganó mi admiración y respeto aunque no formó parte formal como miembro de mi comité de tesis, sin embargo siempre estuvo con la mejor disposición para apoyar en la parte técnica del HPLC-MS hasta largas horas del día, compartiendo conocimientos y tips del masas. Muchas gracias, otra pieza clave en este proyecto.

A cada persona que forma parte del laboratorio de Inocuidad ya que no era una carga ir a trabajar, al contrario, el ambiente de trabajo es de los mejores que he conocido con personas excepcionales y extrañaré trabajar en un lugar tan acogedor como el lab con **Elsa**, **Tania**, **Paty**, **Adriana**, **Dr. Reginaldo**, **Dr. Alberto** y sobre todo a los integrantes del laboratorio de microbiología: **Pedro**, **Daniela**, **Lucía** y **Dulce**, ya que sin ustedes no hubiera sido igual, gracias por los pasteles, alitas, caldos de pollo,

tamales y de más comidas que me salvaron de varias jeje, así como la amistad que encontré en cada uno de ustedes. Gracias.

A mis compañeros de la maestría les agradezco las críticas en los seminarios ya que sirvieron para mejorar el trabajo. En especial a **Karla Saborit, Oney Román, Thalía Bernal, Glenda Alcántar y Luisana Guirado** por la amistad que nació dentro de CIAD y que espero perdure después de este ciclo concluido, deseándoles siempre lo mejor a cada una de ustedes. Gracias.

Anna González y Monserrath Félix, no formaron parte de mi generación de maestría, pero sí de esa generación de amistades durante estos dos años. Muchas gracias por los consejos, ayuda en bioquímica, molecular, inmuno etc., facilitando bases de datos, pero sobre todo... esos cafesito de “ciencia” jeje. En fin, mi futuro comité de tesis doctoral jaja (tú también Oney, no se me olvida pero voy por partes) gracias, las estimo mucho y espero que esta amistad perdure.

A **Rosa Isela Vázquez Lizárraga**, equipo, gracias por tu ejemplo y los consejos que me sirvieron para continuar cuando todo parecía irse abajo, por ese apoyo espiritual incondicional que siempre me entregas.

A mi compañero de vida **Herman Alonso López Aguirre**, quien fue la persona que aguantó más y el que se veía más afectado con las crisis de presentación de tesis, exámenes, proyectos, etc. Gracias mori por formar parte de este camino a mi lado, en las buenas y en las peores.

A **Soka Gakkai de Hermosillo y de Los Mochis**, gracias por el crecimiento espiritual y valor humano que forjé durante estos años con la práctica, que fueron fundamentales para ganar confianza en mí misma y no dejarme derrotar pese a las circunstancias.

Y por último pero no menos importante, a mis queridos roomies, desde **Nilda Flores, Fernando Cuevas, Javier Vázquez (pancho), Wendy Lizárraga y Jonathan Díaz (el vaquero)**. Gracias por soportarme en momentos de crisis (estrés) antes de un seminario y después jaja, y por los momentos de relax, eso también se agradece bastante, la presión se siente menos cuando se vive en un hogar con armonía y apoyo en las buenas y malas. Gracias roomies y... laven los platos! Jaja

Gracias de nuevo a cada uno de ustedes por enriquecer mi propia vida.

“Un corazón lleno de gratitud es hermoso. Tener la grandeza de apreciar a las personas con quienes hemos venido relacionándonos, enriquece y embellece nuestra propia vida.”

Daisaku Ikeda

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Cuadros	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Enfermedades Crónico Degenerativas y los Tratamientos Convencionales	3
2.2. Diabetes Mellitus Tipo 2	3
2.3. Hipertensión Arterial	4
2.4 Farmacología en Diabetes e Hipertensión	4
2.5. Relación de los Fármacos con la Activación de Receptores Celulares de Importancia Biológica	7
2.6. Fuentes Naturales como Alternativa a Enfermedades Crónico Degenerativas	8
2.7. Árbol de <i>Moringa oleifera</i>	8
2.7.1. Potencial Terapéutico	10
2.7.2. Composición Química	11
2.7.3. Compuestos Organoazufrados	13
2.7.4. Glucosinolatos	13
2.7.5. Isotiocianatos	14
2.7.6. Carbamatos y Tiocarbamatos	15
2.8. Cultivo en México	15
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo General	18
4.2. Objetivos Específicos	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20

CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Página
5.1 Materia Prima	20
5.2. Extracción Acuosa	20
5.3 Extracción Metanólica	20
5.4. Preparación de Estándares de Identificación (fármacos)	21
5.5. Preparación de Estándar Fitol	21
5.6. Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)	21
5.7. Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Fluorescencia (HPLC-FL)	22
5.8. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de Masas (HPLC-MS)	22
5.9. Identificación Por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Índice de Refracción	23
5.10. Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (GC-MS)	23
5.11. Diseño de Experimentos	23
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. Cromatografía Líquida de Alta resolución con Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)	24
6.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC-FL)	35
6.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrómetro de Masas (HPLC-MS)	39
6.4. Cromatografía de Gases acoplada a Masas GC-MS	51
VII. CONCLUSIONES	55
VIII. CONSIDERACIONES ADICIONALES	56
IX. RECOMENDACIONES	57
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de Metformina.	5
2. Estructura química de Candesartán.	6
3. Estructura química de Hidroclorotiazida.	6
4. <i>Moringa oleifera</i> , floración y fruto.	9
5. Estructura del glucosinolato de <i>Moringa oleifera</i> , donde R ₁₋₃ puede ser un OH o un grupo acetilo.	12
6. Estructura de un isotiocianato de <i>Moringa oleifera</i> , donde R ₁₋₃ puede ser un OH o un grupo acetilo.	13
7. Cromatograma de la extracción acuosa a 260 nm.	25
8. Cromatograma de la extracción metanólica a 260 nm.	26
9. Cromatograma de Índice de Refracción para el extracto acuoso.	27
10. Cromatograma de Índice de Refracción para el extracto metanólico.	28
11. Cromatograma por HPLC-DAD de los estándares puros: hidroclorotiazida (Tr: 2.86), candesartán (Tr: 3.06) y metformina (5.80).	31
12. Cromatograma (HPLC-DAD) de la extracción acuosa de la hoja de MO fortificada con hidroclorotiazida [50 ppm] a 260 nm.	32
13. Espectros de absorción por HPLC-DAD (Tr: 2.8 min) del estándar hidroclorotiazida muestra y control.	34
14. Cromatograma (HPLC-DAD) del extracto acuoso de hojas de Moringa a 260 nm.	36
15. Reacciones de derivatización post-columna de carbamatos.	37
16. Cromatograma (HPLC-FL) acoplado a un detector de fluorescencia del extracto acuoso de MO.	38
17. <i>O</i> -metil, 4- [(2',3',4',-tri- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnosiloxi)bencil] carbamato.	41
18. <i>O</i> -metil, 4-[(4'- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnosiloxi)bencil] carbamato.	41
19. 4-[(α -L-ramnosiloxi)bencil] tiocarbamato.	41
20. Estructura química de candesartán cilexetilo 610 [m/z].	42
21. Fragmento 497 + Na [m/z].	42
22. Fragmento 497 [m/z].	43
23. Fragmento 473 [m/z].	43

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

Figura	Página
24. Fragmento 372 [m/z].	44
25. Fragmento 291 [m/z].	44
26. Espectro de UV-Vis del extracto acuoso a 30 °C, obtenido con el HPLC-UV-Vis acoplado a MS.	47
27. Cromatograma generado por la cuenta o intensidad de iones totales (verde) y cromatograma de UV-Vis (azul).	48
28. Masas moleculares del extracto acuoso en Tr. 2.6 min.	49
29. Masas moleculares del extracto acuoso en Tr. 4.3 min.	50
30. Patrón de fragmentación de la molécula de Fitol	52
31. Cromatograma de Fitol y su estructura por GC-MS.	52
32. Curva estándar de Fitol.	53

LISTA DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Composición química de <i>Moringa oleifera</i> .	12
2. Tiempos de retención de estándares puros.	30
3. Comparación de espectros de absorción por la pureza de cada compuesto.	33

RESUMEN

El aumento de enfermedades crónicas degenerativas significa un gran peso al bolsillo del paciente por los costos de estos medicamentos. Aunado a lo anterior, algunos pacientes desarrollan resistencia al uso continuo de medicamentos. Por lo que se ha incrementado la búsqueda de alternativas naturales para desarrollar nuevos medicamentos o conocer el mecanismo y las dosificaciones de estos elementos alternativos o tradicionales, para su uso adecuado. La *Moringa oleifera* es un árbol medicinal al que se le han atribuido efectos benéficos contra la hipertensión arterial, diabetes y el cáncer, principalmente. Es por ello, la necesidad de investigar e identificar compuestos específicos y poder definir su mecanismo de acción. Se utilizaron dos solventes de extracción (agua y metanol) y el uso de herramientas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución con los detectores: de arreglo de diodos (HPLC-DAD), de fluorescencia (HPLC-FL), índice de refracción (HPLC-IR) y espectrometría de masas (HPLC-MS), y la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS). Se utilizaron tres fármacos como estándares de identificación; metformina (hipoglucemiante), hidroclorotiazida (diurético) y candesartán (antihipertensivo), los más utilizados en el tratamiento de diabetes e hipertensión. Con HPLC-DAD se utilizó una mezcla de metanol:acetonitrilo:buffer de acetato de amonio pH 2 [75:22:3] como fase móvil isocrática, y para HPLC-MS se utilizó la fase de ácido fórmico 0.1% acuoso. Se identificaron compuestos con estructura muy similar a los estándares presentes en la hoja de moringa y carbamatos (compuestos reportados como hipotensores). Por GC-MS se logró identificar y cuantificar al fitol en ambas extracciones. Cabe resaltar la gran importancia biológica del Fitol, ya que debido a su estructura similar a los ácidos grasos, es capaz de activar receptores nucleares proliferadores de peroxisomas PPAR- α específicamente, regulando la hiperglicemia y dislipidemia. Por lo anterior, *Moringa oleifera* tiene potencial como planta medicinal hipotensora e hipoglucemiante, sin embargo se requieren estudios para determinar su actividad biológica. .

Palabras clave: *Moringa oleifera*, fitol, HPLC-DAD, GC-MS, metformina, hidroclorotiazida, candesartán

ABSTRACT

The increase of chronic diseases due to the metabolic syndrome, diet, and style of life is becoming economic burden of health plans. New research is looking for phytochemicals of commodities popularly known to possess medicinal properties. *Moringa oleifera* is not only good source of basic nutrients but reported, by traditional medicine to ameliorate diseases such type 2 diabetes and hypertension, ailments of the metabolic syndrome. However, it is necessary to investigate and identify the specific compounds and their physiologic role that ameliorate these symptoms. This work is aiming to identify compounds from leaves using chromatography methods, HPLC-DAD, HPLC-FL, HPLC-MS and GC-MS and. Two different solvents of extraction were use, water and methanol, the separated compound were characterized using three standards of identification, metformin (hypoglycemic), hydrochlorothiazide (diuretic) and candesartan (hypotensive), a well-known drugs to treat diabetes type 2 and hypertension. An isocratic mobile phase was used for separation by HPLC-MS, methanol:acetonitrile:buffer acetate of ammonium pH 2 [75:22:3], identifying compounds with similar chemical structures than the standards and by HPLC-FL, were identified carbamates, compounds with hypotensive activity reported. Another tool was use GC-MS showed that the main compound was phytol, a well-documented compound that activate the nuclear receptors PPAR- α , specific that regulate hyperglycemia and dyslipidemia. Due to the above, *Moringa oleifera* could be an efficient alternative to ameliorate diseases such hypertension and type 2 diabetes. However it needs studies about biological activity with adequate models.

Keywords: *Moringa oleifera*, phytol, HPLC-DAD, GC-MS, metformin, hydrochlorothiazide, candesartan.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina ortodoxa ha basados sus tratamientos en compuestos sintéticos para controlar diversas enfermedades crónicas, entre las más destacadas están la diabetes tipo 2 y la hipertensión. Dentro de los medicamentos más utilizados para tratar la diabetes e hipertensión se encuentran la metformina (hipoglucemiante), candesartán (hipotensor), tiazolidinedionas como la hidroclorotiazida (diurético). Dichos compuestos comparten grupos funcionales azufrados, nitrogenados y aromáticos en sus estructuras. Estos fármacos han sido muy estudiados en cuanto a su mecanismo y dosis de acuerdo a la Guía de Práctica Clínica (GPC, 2014).

Debido al incremento de estas enfermedades crónico degenerativas, han surgido alternativas naturales para su tratamiento y prevención (OMS, 2005). El interés emerge por la identificación de los compuestos bioactivos que se encuentran en las fuentes naturales; aunado a esto, son necesarios estudios a profundidad para conocer el mecanismo de acción y definición de la dosificación adecuada. La planta de *Moringa oleifera* (MO), se ha reportado como una planta medicinal, muy popular por sus propiedades nutricionales, alto contenido de proteína y minerales (Fahey, 2005; Anwar *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2011). Al consumo de diferentes tejidos de esta planta se le han atribuido algunos efectos benéficos a la salud, tales como: regulador de la presión arterial, hipoglucemiante, anticancerígeno, regulador hormonal, antireumático, principalmente (Faizi *et al.*, 1995; Guevara *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2012). Aunque no se conocen los compuestos que proporcionan dichos efectos, se considera que los compuestos azufrados presentes en el género de las *brassicas* como los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis; los isotiocianatos, pueden ser responsables de esta acción. Algunos glucosinolatos e isotiocianatos, como 4(α -L-ramnopiranosiloxi)bencil glucosinolato, (4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato y 4(α -L-ramnopiranosiloxi)bencil isotiocianato, se les han atribuido el efecto hipotensor en MO (Guevara *et al.*, 1999; Anwar *et al.*, 2007). Sin embargo, existe controversia sobre si estos compuestos poseen esta actividad al consumir hoja de MO, ya que estudios revelan que estos compuestos no están presentes en las hojas

(Bennett *et al.*, 2003; Amaglo *et al.*, 2010). Por esta razón, son necesarios más estudios para la identificación de los compuestos activos de MO y el uso de modelos celulares biológicos adecuados, para definir su mecanismo de acción y dosificación. En el presente estudio se utilizaron técnicas analíticas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución utilizando diferentes detectores: Arreglo de Diodos (HPLC-DAD), Fluorescencia (HPLC-FL), Espectrometría de Masa (HPLC-MS) e Índice de Refracción (HPLC-IR). Se seleccionaron como primera instancia, los fármacos más comunes y utilizados en los tratamientos de la Hipertensión y Diabetes tipo 2, como son el Candesartán, Hidroclorotiazida y Metformina, respectivamente, los cuales se usaron como estándares de identificación con el objetivo de buscar moléculas con estructuras químicas similares en la hoja de MO.

II. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades Crónico Degenerativas y los Tratamientos Convencionales

Las enfermedades crónico degenerativas representan uno de los principales problemas del sector salud, de acuerdo a la OMS (2005). Estas se definen desde su horizonte sintomático y aparición de la enfermedad que ocurren en más de seis meses; su evolución suele acompañar al paciente el resto de su vida. Estas enfermedades pueden afectar a cualquier órgano o tejido del cuerpo humano, sin embargo, algunos de ellos destacan por su alta frecuencia y por los daños que producen.

En Sonora, las enfermedades isquémicas del corazón, los tumores malignos, la diabetes mellitus y las enfermedades cerebrovasculares son las principales causas de muerte de la población y representan el 47.9% de las defunciones totales, según registros del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2013). Recientemente se ha observado la presencia de este tipo de enfermedades crónicas en jóvenes entre 20 y 40 años (Sandoval, 2010).

2.2. Diabetes Mellitus Tipo II

La diabetes mellitus tipo 2 (DT-2) es un tipo de desorden metabólico crónico y multifacético que se caracteriza por altos contenidos de glucosa en sangre, como consecuencia de una alteración en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, todo esto mediado por la acción de insulina, insuficiencia en la secreción de insulina, resistencia o ambas. Los daños asociados son disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La DT-2 puede presentar síntomas característicos como sed, poliuria, visión borrosa, hambre y fatiga. En una forma más grave, presenta cetoacidosis, y en ausencia de un tratamiento eficiente, la muerte. Además se incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Alberti y Zimmet, 1998). En México, de acuerdo a la Federación Mexicana de Diabetes en 2012,

existen 6.4 millones de personas con DT-2 y el 47 % a su vez padece de hipertensión arterial (HTA). La DT-2 y HTA arterial son las principales causas de muertes en México de acuerdo al INEGI (2013), afectando a personas mayores de 60 años. Sin embargo, este tipo de patologías se está presentando en poblaciones más jóvenes, representando una gran problemática.

2.3. Hipertensión Arterial

Es un síndrome caracterizado por elevación de la presión arterial, considerado como uno de los mayores problemas de salud pública. Representa un factor de riesgo para el desarrollo futuro de enfermedad vascular (SEDENA, 2012) y está definida por una presión arterial sistólica de 140 mm Hg o superior y presión arterial diastólica de 90 mm Hg o superior. Las enfermedades vasculares más comunes son del tipo cerebrovascular, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardiaca o renal. En México, actualmente alrededor del 31% de la población se ve afectada por hipertensión arterial en adultos mayores. Sin embargo, el recibir tratamiento farmacológico no garantiza el control de la presión arterial, ya que solamente la mitad de la población que recibe tratamiento entra en el rango establecido por la Norma Oficial Mexicana y estándares internacionales como el Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-7) y la American Heart Association (Campos-Nonato *et al.*, 2013). No obstante, la elevación de la presión arterial también afecta a jóvenes mexicanos (1 de cada 3 ó 4) aumentando el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular de un 13.9% hasta un 58.1% y reflejarse posteriormente como morbilidad temprana (Salcedo-Rocha *et al.*, 2010).

2.4 Farmacología en Diabetes e Hipertensión

Los tratamientos actuales para la hipertensión y diabetes se basan en fármacos sintéticos de costo elevado. Dentro de los fármacos más destacados se encuentran las tiazidas que son utilizadas como antihipertensivos y diuréticos, en donde destacan la furosemida, hidroclorotiazida, espirolactona, amilorida, candesartán, losartán y amlodipino. También se encuentran los antidiabéticos como la metformina y tiazolidinedionas, destacando la rosiglitazona. Estos compuestos sintéticos

comparten grupos aromáticos, azufrados y nitrogenados en su estructura. Cada uno exhibe un mecanismo de acción diferente, en algunos casos no elucidados por completo.

La metformina (Figura 1) es el fármaco oral universal para el tratamiento de DT-2. Su mecanismo de acción no está completamente elucidado; sin embargo, se conoce que no actúa como hipoglucemiante directamente, ya que no modifica sensiblemente las concentraciones de insulina. El mecanismo más probable es la inhibición de la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) a través de la activación de cinasas (AMPK) que produce una inhibición de la acetil-CoA carboxilasa, enzima que controla la lipogénesis. La metformina disminuye en menor proporción la glucogenólisis y aumenta la captación de glucosa en adipocitos (células productoras de grasa) humanos, sin alterar la viabilidad celular ni el consumo de oxígeno (Ahir *et al.*, 2013).

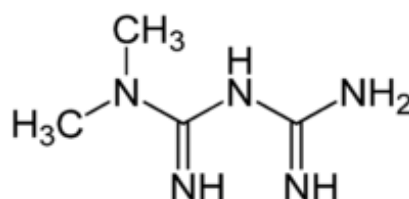


Figura 1. Estructura química de Metformina

Los efectos secundarios más frecuentes que presenta metformina son molestias gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos, flatulencia, malestar abdominal, anorexia, etc. Se pueden presentar alteraciones en el sentido del gusto, puede provocar un déficit de vitamina B₁₂ en el 7% de los pacientes, asociado a dosis altas y el tiempo prolongado de ingesta. El efecto más raro y grave es la acidosis láctica; sin embargo, no hay evidencia en estudios prospectivos de ensayos clínicos (Velázquez-Monroy *et al.*, 2002).

Por otra parte, candesartán (Figura 2) es un fármaco utilizado para regular la presión arterial mediante el bloqueo del receptor de angiotensina tipo II. Funciona como un vasodilatador en las células del epitelio, disminuyendo la presión arterial. La disfunción endotelial está asociada a las enfermedades cardiovasculares ya que pueden contribuir a la resistencia de la insulina (Kwang *et al.*, 2006).

Dentro de los efectos colaterales este tipo de medicamentos (hipotensores) no funciona por igual a cualquier paciente hipertenso. En general, es necesario encontrar el fármaco con la dosificación y combinación adecuada para cada paciente en particular. Cabe resaltar que estos son medicamentos de uso crónico tanto los hipotensores como los hipoglucemiantes, por lo cual es prácticamente para toda la vida y no son de bajo costo.

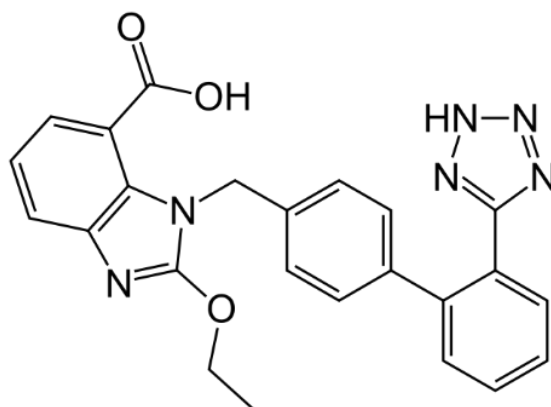


Figura 2. Estructura química de Candesartán.

Otro fármaco de importancia es la hidroclorotiazida (Figura 3), un diurético perteneciente a la familia de las tiazidas y es uno de los diuréticos más comúnmente prescrito, disponible por más de 50 años y también funciona como un antihipertensivo. Se reportan 134 millones de prescripciones de este diurético en los Estados Unidos de América (Messerli *et al.*, 2011). El mecanismo de acción se asocia con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) como un tratamiento para prevenir la retención de líquidos y de esta forma regular la presión arterial. Sin embargo, se han reportado efectos adversos, debido a su acción diurética y pérdida de electrolitos (Westendorp *et al.*, 2009).

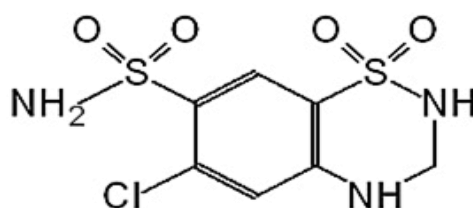


Figura 3. Estructura química de Hidroclorotiazida

Los diuréticos por lo general se presentan en combinación con otros antihipertensivos de acción no diurética como candesartán, losartán, lo cual implica un costo más elevado por la combinación de estos tratamientos o medicamentos. Es por ello, que surge la necesidad de buscar fuentes alternativas en la dieta para el control de la presión y la diabetes más efectivas y de bajo costo.

2.5. Relación de los Fármacos con la Activación de Receptores Celulares de Importancia Biológica

Se ha visto recientemente que los fármacos sintéticos, principalmente los del tipo tiazolidinedionas como la rosiglitazona y del tipo tiazidas como hidroclorotiazida, así como algunos hipotensores como losartán y candesartán, son capaces de activar a receptores nucleares proliferadores de peroxisomas (PPARs). Estos receptores dependientes de ligando, activan diversos genes relacionados con el metabolismo de lípidos y glucosa que se encuentran en los tejidos blanco de la insulina como el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado (Cárdenas *et al.*, 2002).

No obstante, se ha visto que medicamentos sintéticos pueden actuar como agonistas a estos receptores, es decir, unirse como ligandos, activar y desencadenar una respuesta. La unión de rosiglitazona a los PPARs activa selectivamente la transcripción y altera la expresión de genes de lipoprotein lipasas, citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α), dependiendo de la necesidad celular.

El efecto antidiabético de rosiglitazona se ha demostrado en diversos modelos animales (Cárdenas *et al.*, 2002; Salam *et al.*, 2008). A su vez, se han identificado agonistas naturales de diversos extractos, capaces de activar a los receptores PPARs en estudios *in vitro* con modelos celulares (Christensen *et al.*, 2010). Dichos receptores son de gran importancia biológica debido a su acción como oxidantes de los ácidos grasos mediante la activación de genes que favorecen la producción de colesterol HDL y la disminución del colesterol LDL. A su vez la disminución de la resistencia a la insulina (Leibovitz y Schiffrin, 2007) y de esta forma contribuir a las patologías más comunes como la HTA y la DT-2, mediante la activación de los receptores nucleares.

2.6. Fuentes Naturales como Alternativa a Enfermedades Crónicas Degenerativas

El término “medicina tradicional”, surge en África, Latinoamérica, Sudeste asiático y/o el Pacífico occidental; mientras que el término “medicina complementaria y alternativa” se utiliza en Europa, Norteamérica y Australia. La medicina tradicional ha sido utilizada en el cuidado de la salud alrededor del mundo como remedio a diversas enfermedades. No obstante, con el transcurso de los años se ha visto un aumento en el uso de estos remedios. En África el 80% de la población utiliza las fuentes naturales, en Australia el 48 % de la población lo utiliza al menos una ocasión, un 70% en Canadá, 42% en Estados Unidos, 38% en Bélgica y un 75% en Francia (OMS, 2005; Awodele *et al.*, 2012)

El incremento en el uso de la medicina tradicional se debe principalmente a la problemática que enfrenta el sector salud en la búsqueda de compuestos de origen natural que provean beneficios y mayor eficacia, sin efectos colaterales y altos costos. Diversas plantas son comestibles y seguras como alimento (Farah *et al.*, 2000). Sin embargo, la información sobre la posible toxicidad está dada por la ingesta aguda o crónica. La medicina tradicional ha sido un punto importante para comenzar esta búsqueda, debido a que son plantas que se encuentran al alcance de todos y, por lo tanto, se requieren estudiar a fondo cada uno de los atributos medicinales de dichas plantas para conocer su mecanismo en el organismo y la dosis en las que se puede ingerir para ejercer un efecto benéfico a la salud del individuo.

Se estima que anualmente en todo el mundo se facturan 60,000 millones de dólares por concepto de comercialización de medicinas de patente elaboradas con plantas medicinales. A pesar de esto, no existe un marco jurídico internacional que regule el acceso a las plantas mismas y su uso racional, ni la seguridad, eficacia y calidad de sus principios activos, puesto que su aplicación ha superado fronteras ancestrales de países y culturas. En México, aproximadamente el 15 % de la flora total, es considerada medicinal, es decir, una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa destacando el ajo, árnica, epazote, flor de azahar, ruda, moringa, entre otros (Juárez-Rosete *et al.*, 2013). A pesar de la abundancia, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen, solamente se ha llevado a cabo en un 5% solo en estas especies (Ocegueda *et al.*, 2005; WHO, 2005).

2.7. Árbol de *Moringa oleifera*

La moringa, pertenece a la familia Moringaceae, un grupo pequeño de plantas dentro del orden de las Brassicales, que incluye la familia de la col y del rábano, junto con la familia del mastuerzo y de las alcaparras. Existen 13 especies de *Moringa*, que abarcan una gama muy diversa de formas de crecimiento, desde hierbas y arbustos hasta árboles grandes (Olson y Fahey, 2011). Es la planta más cultivada dentro de la familia Moringaceae, nativa de la India (Fahey, 2005) y es conocida como el árbol de rábano, árbol baqueta, ángela, resedá, árbol de los espárragos, árbol de las perlas, árbol "ben" y por varios otros nombres. En los últimos años ha crecido el interés por esta planta debido a sus propiedades medicinales, es por ello que su cultivo se ha expandido ampliamente a países asiáticos, europeos e inclusive occidentales, principalmente en el trópico. Se utilizan todos los tejidos de la planta con fines farmacológicos; sin embargo, las hojas, flores y raíces se consumen como vegetales, a su vez se utiliza como alimento para ganado (Moyo *et al.*, 2011). Esa planta tiene el potencial para mejorar la nutrición, la seguridad alimentaria e impulsar el desarrollo rural.

Entre las características más destacada de la moringa, están su rápido crecimiento (unos 3 metros su primer año pudiendo llegar a 5 metros en condiciones ideales), el árbol adulto llega a los 10 o 12 metros de altura máxima y su rusticidad lo hace muy fácil de cultivar (Olson y Fahey, 2011).

Las flores (Figura 4) aparecen por primera vez durante los primeros seis meses después de haber sido plantados y usualmente durante el primer año.

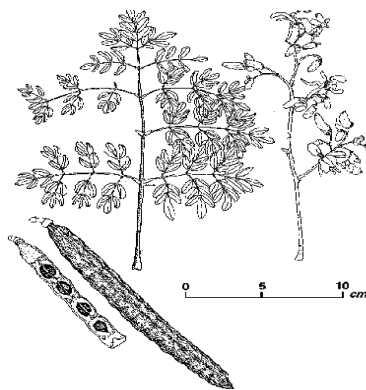


Figura 4. Floración y fruto de *Moringa oleifera*.

Las vainas (fruto) alcanzan la madurez aproximadamente 3 meses después del florecimiento. El fruto es muy resistente a la sequía y se cultiva en regiones áridas y semiáridas de la India, Paquistán, Afganistán, Arabia Saudita y África (Parrotta, 1993). No se ve afectada por ninguna enfermedad seria en sus áreas de distribución natural o donde ha sido introducido. Se han reportado casos en donde se ha visto afectada por daños menores incluyendo la pudrición de las raíces causada por *Diplodia sp* y una pudrición de la fruta causada por *Cochliobolus hawaiiensis*. Esta planta es muy susceptible a daño por el viento. En general se ve afectada por daños ocasionados por insectos, la mosca de la fruta, los barrenadores de los tallos, varias otras plagas de insectos que rara vez causan daño mayor o que usualmente causan daños menores han sido también reportadas (Roloff *et al.*, 2009).

2.7.1. Potencial Terapéutico.

Las especies de moringa son importantes por sus múltiples propósitos como alimento, medicina y producción de aceite principalmente (Bennett *et al.*, 2003). Todas las partes de la planta son comestibles y se le ha relacionado con alguna propiedad medicinal. Se ha reportado que las hojas ejercen un efecto hipotensor, hipocolesterolémico (Gashi *et al.*, 2000), antiespasmódico, diurético y antimicrobiano. El extracto acuoso de las hojas se dice que ayuda a la fertilidad (Saroj *et al.*, 1996), el jugo de las hojas se utiliza en casos de dolor de cabeza y se aplica en los ojos cansados causados por debilidad nerviosa. Las semillas son utilizadas como floculante en el tratamiento de aguas (Makkar y Becker, 1997). Uno de los usos que se le ha dado en la medicina tradicional de la India han sido para tratar el reumatismo, mordeduras venenosas, así como un estimulante cardíaco y circulatorio (Roloff *et al.*, 2009).

Todos los tejidos del árbol de moringa son comestibles e ingeridos como cualquier otro vegetal por los pobladores de la India y debido a su popularidad curativa, su cultivo se distribuyó en diversos países de todo el mundo. La distribución del cultivo se llevó a cabo principalmente en países localizados en el trópico, debido a las condiciones climáticas y mejor desarrollo del árbol (Chaudhri, 1996; Pankaj y Anand, 1999; Oludoro *et al.*, 2010). De acuerdo a un estudio hecho por Dangi *et al.* (2002) revelan que el extracto acuoso de las hojas ejercen un efecto cronotrópico e inotrópico en ranas y le atribuyen a los compuestos alcaloides que se encuentran en

el extracto acuoso. Dentro de las propiedades hipoglucemiantes de moringa, se han realizado estudios solamente en ratas con extractos crudos (Cáceres *et al.*, 1992). Un estudio realizado por Jaiswal *et al.* (2009), revela que el extracto acuoso de MO exhibe un efecto hipoglucemiante en ratas, sin embargo son necesarios más estudios con modelos adecuados.

2.7.2. Composición Química.

Existe una gran diversidad de fitoquímicos presentes en MO como los glucosinolatos, compuestos fenólicos y carbamatos (Cuadro 1). Sin embargo, a los compuestos azufrados se le atribuyen efectos biológicos como anticancerígenos y quimiopreventivos. Cabe mencionar, que la planta es rica en compuestos azufrados, especialmente en glucosinolatos (Figura 5), presentes prácticamente en casi todos los tejidos. No obstante, los compuestos que realmente poseen el efecto biológico son los isotiocianatos (Figura 6) que se liberan por acción enzimática de la mirosinasa sobre los glucosinolatos. Una peculiaridad de los glucosinolatos en moringa es que poseen un azúcar simple adicional de ramnosa, la cual le confiere estabilidad a los isotiocianatos (Fahey, 2005). Se han identificado compuestos azufrados que se consideran los responsables de las actividades biológicas, algunos de ellos se les atribuye efecto hipotensor, anticancerígeno y antibacterial incluyendo al (4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato, 4(α -L-ramnopiranosiloxi)bencil isotiocianato, niazinin, pterygospemin, bencil isotiocianato y 4(α -L-ramnopiranosiloxi)bencil glucosinolato (Siddhuraju y Becker, 2003; Waterman *et al.*, 2014). Estos compuestos son únicos de la familia de la moringa, sin embargo, cabe mencionar que también es rica en otros fitoquímicos como carbamatos y tiocarbamatos, así como carotenoides, incluyendo el β -caroteno precursor de la vitamina A. De acuerdo a un estudio del perfil de la composición química en MO llevado a cabo por Bennett *et al.* (2003) encontraron a su vez algunos flavonoides y ácidos clorogénicos como el ácido cafeico, kaempferol, y quercetina.

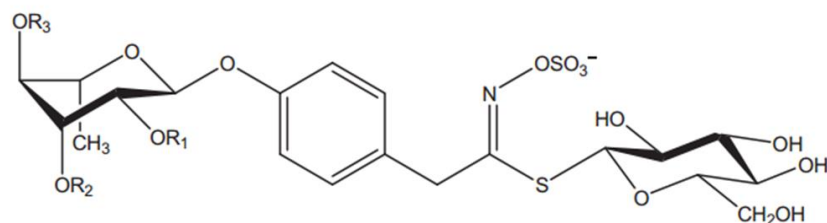


Figura 5. Estructura de un glucosinato de *Moringa oleifera*, donde R₁₋₃ puede ser un OH o un grupo acetilo.

Cuadro 1. Composición química de *Moringa oleifera*

Compuesto	Concentración mg/g ps			
	Hoja	Semilla	Tallo	Raíz
Extracto Metanol				
Fenólicos				
• Quercetina	0.25±0.02	-	0.04±0.01	-
• Kampferol	0.08±0.02	-	Trazas	-
• Ácido cafeico	8.90±0.30	-	0.30±0.01	-
Azufrados				
• Glucosinatos	59.4±1.40	202±15	16.3±0.09	20.4±0.80
• Isotiocianatos				

Bennett, et al., 2003

Dentro de la composición bioquímica, los fitoquímicos que se encuentran en la planta son compuestos fenólicos y organoazufrados, principalmente. A su vez, se encuentran proteínas, vitaminas y minerales de interés por su valor nutricional. Sin embargo, ha crecido el interés por el estudio a fondo de los compuestos azufrados por su alta reactividad y función biológica en el organismo, en donde ejercen un efecto benéfico. Existen diversos tipos de compuestos azufrados, en donde se diferencian por su naturaleza química, ya sea compuestos alifáticos, aromáticos en su grupo R dentro de su estructura (Oluduro *et al.*, 2010).

Se han llevado a cabo estudios de identificación de los compuestos bioactivos, sin embargo no han sido suficientes para elucidar o atribuir una participación en las reacciones metabólicas ya que no son los modelos más adecuados.

El principal mecanismo que se conoce por dichos compuestos, es el ataque nucleofílico del grupo sulfhidrilo que interacciona con diferentes proteínas importantes en el metabolismo celular cambiando su conformación y de esta forma se impide su acción catalítica.

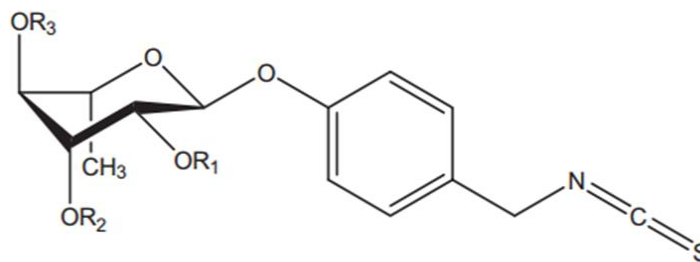


Figura 6. Estructura de un isotiocianato de *Moringa oleifera*. Donde R₁₋₃ puede ser un OH o un grupo acetilo

2.7.3. Compuestos Organoazufrados

El azufre es un elemento muy reactivo, ha crecido su interés debido a su participación en los procesos metabólicos y aplicación industrial, farmacéutica y de investigación (Taiz y Zeiger, 2002). Estos compuestos organoazufrados poseen diferentes mecanismos de acción dependiendo de su naturaleza química. Por una parte inhiben el daño ocasionado por reacciones oxidativas generadas por la vejez o enfermedades, además reducen los niveles sanguíneos de lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés). Tienen un efecto anti-inflamatorio, antiaterogénico y antitrombótico relacionado con su capacidad de inhibir la síntesis de prostanoïdes.

2.7.4. Glucosinolatos.

Son metabolitos secundarios de la planta y estos difieren cada uno por su forma y estructura de las agliconas (Bennett *et al.*, 2003). Estos compuestos contienen en su estructura nitrógeno, azufre y una glucosa, se encuentran de forma exclusiva en el género *Brassica* (repollo, coliflor, brócoli, rábano, entre otros) y especies relacionadas de crucíferas (Cartea *et al.*, 2008), *Resedaceae*, *Tovariaceae* y *Moringaceae*. A su vez, afectan la actividad de las larvas, de los parásitos de las raíces de las plantas (Anaya, 2003). La hidrólisis de estos compuestos tienen diferentes actividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral), por ejemplo como un mecanismo de defensa y atrayentes (Halkier y Gershenzon, 2006).

En la última década, los glucosinolatos han sido identificados como potentes preventorios del cáncer en varios modelos animales, debido a la habilidad de ciertos productos de su hidrólisis al inducir la detoxificación enzimática, como la quinona

reductasa, glutation-S-transferasa y glucoronosil transferasas (Halkier y Gershenzon, 2006).

Dichos compuestos se encuentran en mayor concentración en las semillas por su naturaleza biológica para protección de la especie. Sin embargo, en las hojas existe controversia sobre el contenido de dichos compuestos y los productos de su hidrólisis ya que son termolábiles y sensibles a la luz (Bennett *et al.*, 2003). A su vez los productos de la hidrólisis de los glucosinolatos son los que ejercen la actividad biológica en el organismo.

2.7.5. Isotiocianatos.

Son compuestos azufrados derivados de los glucosinolatos presentes en las crucíferas como el berro, calabaza y brócoli. Cuando estos vegetales son macerados, cortados o masticados, se lleva a cabo la hidrólisis de glucosinolatos por acción de la mirosinasa dando como producto a los isotiocianatos. Poseen la estructura general $R - N = C = S$. Se caracterizan por exhibir un sabor amargo que repele a los insectos que se les acercan (Allinger y Johnson, 1984). Diversos estudios muestran el efecto biológico que ejercen los isotiocianatos al combatir enfermedades crónicas por diferentes vías. Una de las vías de acción es, a través de la inhibición enzimática del metabolismo, como la citocromo oxidasa p450, complejo que evita la conversión metabólica de carcinógenos para transformarlos en derivados capaces de unirse de forma covalente para formar aductos de ADN o proteína (Amagase *et al.*, 2001; Borek, 2001)

Otros isotiocianatos incrementan la actividad de las enzimas de la fase II del metabolismo como la glutatión-S-transferasa, UDP-glucoronosil transferasas y sulfotransferasas. (Munday y Munday, 2002) Los isotiocianatos inactivan y detoxifican a los carcinógenos mediante su conversión a derivados hidroxilados que son hidrosolubles y eliminados rápidamente. Además de bloquear la activación de los carcinógenos inducen apoptosis en células derivadas de líneas tumorales y exhiben actividad antimicrobiana sobre *Helicobacter pylori*. Sin embargo, a pesar de las propiedades benéficas que se han encontrado de estos compuestos, a su vez hay evidencia experimental que demuestra que dichos compuestos incrementan el efecto de carcinógenos debido a su toxicidad (Hecht, 2004). Es por ello que en la actualidad

se están investigando compuestos derivados de isotiocianatos que ejerzan un efecto selectivo sin dañar otros tejidos celulares.

2.7.6. Carbamatos y Tiocarbamatos.

Estos compuestos son más conocidos por su uso en la agricultura como pesticidas. En hoja de moringa se han logrado caracterizar compuestos del tipo carbamatos a los cuales se les atribuye el efecto antimicrobiano e hipotensor en ratas (Faizi *et al.*, 1995). Sin embargo los estudios realizados no son los más adecuados ya que los llevan a cabo con extractos crudos, y se han enfocado a la capacidad antimicrobiana, de ahí radica la importancia de su identificación y evaluación de la actividad biológica de estos compuestos.

Los tiocarbamatos son compuestos derivados de los carbamatos que incluyen en su estructura al azufre. Estos compuestos se han identificado en la semilla de *Moringa oleifera*, sin embargo se cree que también pueden estar presente en las hojas (López-Cervantes *et al.*, 2000).

2.8. Cultivo en México

De acuerdo a Olson y Fahey (2011), el árbol de la moringa tiene gran potencial para su cultivo en México, así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades. Los frutos jóvenes son comestibles y las semillas producen un aceite comestible y lubricante. Los desechos del prensado de las semillas para obtener aceite pueden usarse como floculante y pueden eliminar la turbidez del agua precipitando sólidos solubles. Sus hojas ofrecen un forraje nutritivo para los animales, así como también los residuos de las semillas después de la extracción de aceite y aún las ramas molidas (Martínez, 1959; Reyes y Ledin, 2006). Estos son solo algunos de los usos de este árbol, que además crece con suma rapidez, tolera el calor y es resistente a las sequías.

Cabe mencionar que Sonora es una zona semiárida en donde MO se cultiva de forma exitosa. En esta zona la precipitación puede ser de 300 mm, lo que es bajo, a pesar de que dichos sitios son probablemente irrigados y se caracterizan por poseer un nivel alto de agua subterránea (INEGI, 2012).

El árbol de moringa se encuentra con frecuencia en los pueblos de toda la costa del pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo la península de Baja California. La planta también se cultiva en los poblados de depresiones tropicales secas del país, como la del Balsas y la depresión central de Chiapas. La planta se encuentra en los pueblos de la zona del Infiernillo y en las cercanías de Apatzingán, Mezcala, Iguala y Tequesquitengo (Pérez *et al.*, 2012).

En México la mayoría de estos cultivos tiene finalidad ornamental, aunque también son consumidos de diferentes formas, como por ejemplo, las vainas tiernas son comestibles y se usan en sopa o se preparan a manera de espárragos; las raíces tienen sabor picante como el rábano y se usan como condimento en lugar de éste, las semillas maduras se tuestan y consumen como nueces; las almendras proveen alto contenido de aceite; las hojas se comen como verdura y también pueden servir de forraje, así como infusiones para diversos malestares, como dolor de cabeza, espasmos, diabetes, antihipertensión, antiinflamatorio, entre otras. Poco a poco se ha ido popularizando el uso de la moringa en el país, debido a los beneficios terapéuticos y nutricionales que se han encontrado de forma comunitaria. Sin embargo, la información publicada sobre la dosificación y los potenciales compuestos bioactivos es muy escasa, es por ello que se requiere investigar más a fondo para conocer su mecanismo en el organismo (Pérez *et al.*, 2012). Dado los atributos mencionados anteriormente crece más el interés por este cultivo, es por ello que se han realizado algunos trabajos y proyectos, invirtiendo en huertos para producir moringa en Escuinapa, Rosario y Culiacán, en Sinaloa y en Empalme, Sonora, a través del Departamento Industrial y Agrícola de Introducción y Aclimatación.

Es objeto de gran atención por parte de los productores, en tanto que crece el número de proveedores que promueven la planta como panacea. Sin embargo, es de gran importancia sustentar científicamente los beneficios que se le atribuyen. La mayoría de los estudios sobre las cualidades benéficas de la moringa se han llevado a cabo *in vitro* o en animales; por lo tanto se desconoce la dosis necesarias para producir algún efecto benéfico en humanos.

Por esta razón, esta investigación se centra en la búsqueda de compuestos presentes en las hojas de moringa que posean estructuras químicas similares a los fármacos

prescritos para controlar las enfermedades más frecuentes como la hipertensión y la diabetes mellitus tipo II entre los cuales se encuentran la hidroclorotiazida (diurético y antihipertensivo), candesartán (antihipertensivo) y metformina (hipoglucemiante). Así como buscar compuestos del tipo carbamatos ya que reportan como los responsables del efecto hipotensor en la planta.

III. HIPÓTESIS

La hoja de *Moringa oleifera* contiene compuestos bioactivos del tipo tiazidas y carbamatos estructuralmente similares a los fármacos sintéticos hipotensores e hipoglucemiantes.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Identificar compuestos bioactivos del tipo tiazidas y carbamatos estructuralmente similares a los fármacos sintéticos hipotensores e hipoglucemiantes en un extracto acuoso de hoja de *Moringa oleifera*.

4.2. Objetivos Específicos

- Extracción de compuestos de hojas de Moringa con solventes de distintas polaridades
- Identificación y cuantificación de fitoquímicos por Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a los detectores: Arreglo de Diodos (HPLC-DAD), Índice de refracción (HPLC-IR), Fluorescencia (HPLC-FL), Espectrometría de Masas (HPLC-MS) y cromatografía de gases acoplada a un detector de Espectrometría de Masa (GC-MS).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materia Prima o Material Vegetal

Se utilizaron hojas secas comerciales de Moringa cultivadas en la Costa de Hermosillo por la industria Mundo Natural®. Se realizaron dos extracciones, acuosa y metanólica con la finalidad de obtener compuestos distintos por la polaridad de los solventes, así como buscar la mejor separación posible para su identificación.

5.2. Extracción Acuosa

Las extracción acuosa se llevó a cabo de acuerdo al método de Anastassiades *et al.* (2003) mediante la extracción en fase sólida dispersa con el kit QuEChERS Agilent Technologies. Se hidrataron 10 g de hoja seca de MO con 50 mL de agua destilada. Se adicionaron 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl para eliminar el agua. A su vez, se utilizó una centrífuga Beckman Coulter (modelo Allegra 64R) a 2348 x g durante 5 minutos. Se colectaron 500 µL del sobrenadante y se llevaron a 1 mL con acetonitrilo. Posteriormente se realizó una limpieza de la muestra con el reactivo PSA (amina primaria/secundaria) eliminando ácidos orgánicos y pigmentos polares, lípidos y esteroides, seguido de una centrifugación a 3300 x g durante 2 minutos. Finalmente, se llevó a cabo una filtración del sobrenadante con una membrana nylon Millex-GN® de 13 mm con un tamaño de poro de 0.20 µm previa a la inyección en el cromatógrafo.

5.3 Extracción Metanólica

Para la extracción metanólica se siguió el mismo método descrito anteriormente con ligeras modificaciones. Se pesaron 2 g de hoja seca de MO, se agregaron 10 mL de metanol y se centrifugó. Se colectó el sobrenadante y se aforaron 100 µL en 1 mL con metanol. Posteriormente se adicionó el mililitro a un vial PSA para eliminar impurezas como pigmentos en exceso y agua que pudiera estar presente. Se procedió a filtrar bajo las mismas condiciones que en el extracto acuoso hasta obtener la

muestra para inyectar. En esta extracción no se utilizaron las sales (NaCl y MgSO₄) ya que la muestra contenía solamente 2% de humedad.

5.4. Preparación de Estándares de Identificación (fármacos)

Se prepararon soluciones madre para cada compuesto (metformina, hidroclorotiazida y candesartán) a una concentración de 1000 ppm. Las soluciones madre se filtraron al vacío con una membrana de poliamida Whatman NL-16® de 47 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0.2 µm. Posteriormente se fortificaron las muestras con los estándares a una concentración conocida [50ppm] para ambos extractos (agua y metanol). Las muestras no fortificadas se consideraron como control.

5.5. Preparación de Estándar Fitol

Se preparó una solución madre de fitol a una concentración de [100 ppm] de fitol. Posteriormente se realizaron diluciones para obtener concentraciones desde 5 ppm hasta 20 ppm para realizar una curva de calibración y cuantificarlo en la muestra.

5.6. Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Arreglo de Diodos.

Se utilizó el método de Ramzia *et al.* (2011) con modificaciones con el equipo de cromatografía líquida de alta resolución con un detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD) Varian (modelo pro Star 230). Se utilizó una fase móvil isocrática con metanol:acetonitrilo:buffer de acetato de amonio 10 mM pH 2 [75:22:3]. Las condiciones cromatográficas constaron de una columna C₁₈ 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 100 Å. Se inyectaron 20 µL, se eluyó con un flujo de 1.0 mL/min y se generó el cromatograma a una longitud de 260 nm. Para comparar los espectros de absorción se utilizó el programa poliview 2000 y el parámetro de pureza determinado por la ecuación 1.

$$PuP = \frac{\sum A_i^2 \cdot \lambda_i}{\sum A_i^2} \quad (1)$$

En donde:

A= Absorbancia

λ= Longitud de onda

5.7. Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC-FL)

Se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta resolución con un detector de Fluorescencia (HPLC-FL) Varian (modelo pro Star 363) y un derivatizador post-columna Pickering (modelo PCX 5200). Se utilizó un gradiente de metanol y agua, en una C₁₈ 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 100 Å, manteniendo una temperatura constante de 25 °C. Se utilizaron ocho estándares comerciales: aminocarb, carbaril, metomil, carbofuran, aldicarb, aldoxicarb, oxamil y tiodicarb a una concentración de 3 ppm cada uno. Posteriormente estos se derivatizaron utilizando la post-columna. La derivatización consiste en dos reacciones, la primera consiste en una saponificación de los estándares y la muestra con NaOH a 100 °C. En la segunda, realiza propiamente la derivatización, donde se adiciona el derivatizador, *o*-phthalaldehyde (OPA) y Thiofluor™. Se inyectaron 20 µL a un flujo de 1.0 mL/min a una longitud de excitación de 250 nm y una de emisión de 350 nm. La separación de los carbamatos se logró en un tiempo de elución de 50 minutos. De acuerdo al método 531.1 establecido por la U.S Environmental Protection Agency (UEPA, 1989) y al Protocolo Internacional 29.A05 de la (AOAC, 2002).

5.8. Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de Masas (HPLC-MS)

Se utilizó una fase móvil isocrática con agua:ácido fórmico al 0.1%. Las condiciones cromatográficas constaron de una columna C₁₈ 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 100 Å. Se inyectaron 20 µL a un flujo de 1.0 mL/min generando el cromatograma a una longitud de 260 nm a una temperatura de 30 °C. Se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos Agilent (serie 1100) acoplado al detector de espectrometría de masas de trampa de iones VL. El detector de masas se utilizó con la polaridad del ion negativa y la fuente de iones tipo ESI (ionización por electrospray). Se utilizó el software chemstation y Chembiodraw® 13.0 para las fragmentaciones. Con el método Ramzia *et al.* (2011) modificado.

5.9. Identificación por Cromatografía líquida de Alta resolución con detector de Índice de Refracción

Se llevó a cabo la búsqueda de compuestos mayoritarios y con actividad optica en la muestra mediante el uso de la cromatografía líquida de alta resolución con un detector de índice de refracción. Se utilizó la columna C₁₈ 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 100 Å. Se utilizó una fase móvil isocrática de metanol:acetonitrilo:buffer de fosfatos [80:15:5]. Con el método de Erk (2003) con ligeras modificaciones.

5.10. Cromatografía de Gases acoplado a un detector de Masas (GC-MS)

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC, Varian modelo 3800) acoplado a un detector de masas (GC-MS) Varian (modelo Saturn 2100T) con una columna DB-5ms 30 m x 0.25 mm de diámetro y Helio como gas acarreador. La temperatura de la trampa de iones fue de 220 °C, Manifold de 120 °C y la temperatura de la línea de transferencia de 260 °C. La temperatura de rampa del horno de la columna se inició con 40 °C manteniéndola por 2 minutos. Posteriormente se incrementó a 96 °C en un rango de 25 °C/min, ascendiendo a 170 °C en un rango de 8 °C/min y finalizó con 250 °C en un rango de 25 °C/min manteniéndose por 3 minutos. Se inyectó 1 µL, en modo “splitless” con una temperatura del inyector de 230 °C. La identificación de los compuestos se realizó inicialmente mediante una comparación en la biblioteca NIST, y posteriormente se comparó el tiempo de retención de los compuestos con el obtenido por el estándar puro fitol (Sigma Aldrich). La cuantificación se realizó con el método del estándar externo (Zhang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2006) con modificaciones.

5.11. Diseño de Experimentos

Se realizó un análisis descriptivo para la identificación de los compuestos, en donde los valores fueron representados por la media ± E.S. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cromatografía Líquida de Alta resolución con Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

Con el objetivo de identificar los componentes individuales de extracciones acuosas y metanólica de hoja de moringa se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos. En las figura 7 y 8 se muestran los cromatogramas para las extracciones acuosas y metanólica, respectivamente. Los datos que se presentan se llevaron a cabo con un análisis estadístico descriptivo en donde los valores del tiempo de retención son representados por la media.

En el cromatograma correspondiente a la extracción acuosa de la hoja de moringa (Fig. 7), se observa un pico con mayor absorbancia presentando dos máximos a los tiempos de retención (Tr) de 2.87, 2.96 min y un hombro al Tr 3.16 min, lo que indica la presencia de una mezcla de al menos 3 compuestos. La gran similitud estructural y afinidad similar de estos compuestos por la columna es la razón principal de la co-elución, impidiendo su purificación eficaz. Sin embargo, este pico cromatográfico es de gran interés, ya que los estándares de hidroclorotiazida y candesartán eluyen a tiempos de retención muy semejantes como se muestra en el Cuadro 1. Esto posiblemente ocurre por una estructura química muy similar a estos compuestos detectados en la hoja de moringa que co-eluyen en un rango de tiempo de retención desde 2.87 a 3.16 minutos.

La extracción metanólica (Fig.8) arrojó un cromatograma similar, sin embargo en el Tr 2.8 minutos se observa un pico simétrico y tiene mayor área. Asimismo, al Tr 2.29 minutos se muestra otro pico simétrico de mayor altura respecto al extracto acuoso y al Tr 3.2 minutos se observa otro. Es posible que se trate de los mismos compuestos, ya que los tiempos de retención entre ambas extracciones son muy semejantes, sin embargo en el extracto metanólico se realiza una mayor extracción de compuestos y una posible mejor separación de los compuestos.

En los cromatogramas por UV-vis es imposible conocer los compuestos mayoritarios sin un estándar, ya que la intensidad (absorbancia) está dada solamente por una longitud de onda específica y no es proporcional con la concentración. Es por ello que se utilizó el índice de refracción (figura 9 y 10) como un indicador de los compuestos mayoritarios en la muestra, debido a que la intensidad es proporcional con la concentración por la actividad óptica de los compuestos presentes en la muestra y de esta manera se puede conocer el compuesto mayoritario presentando una señal más grande.

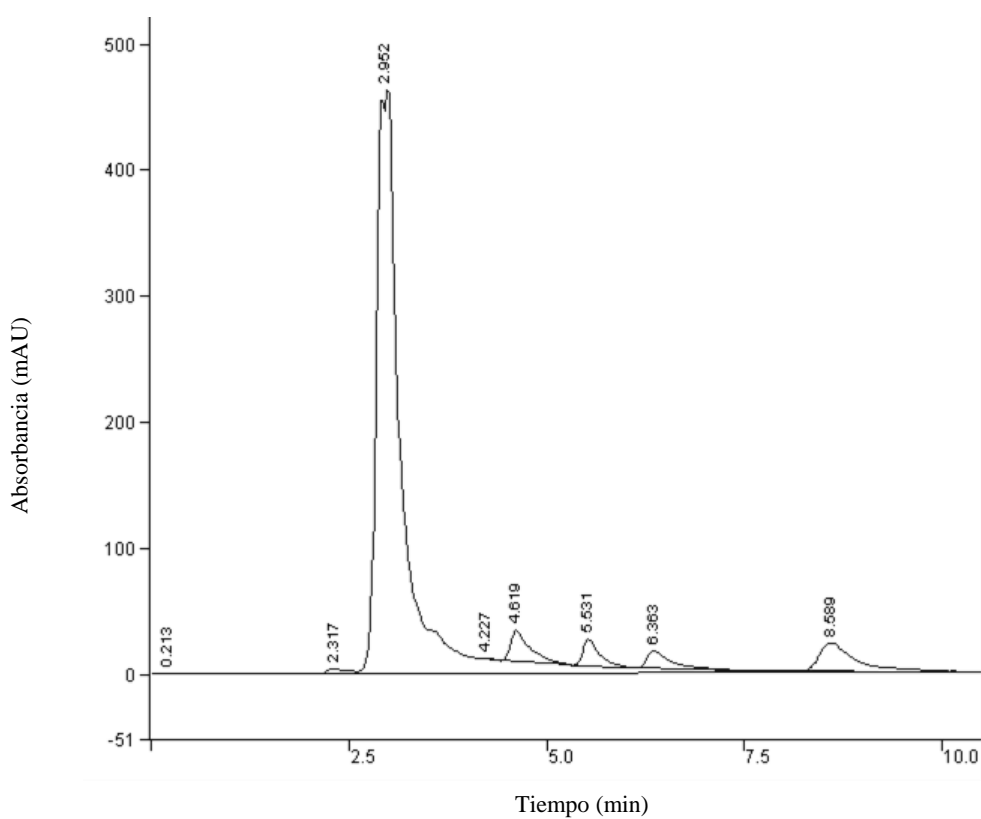


Figura 7. Cromatograma (HPLC-DAD) de la extracción acuosa de hojas de MO a 260 nm.

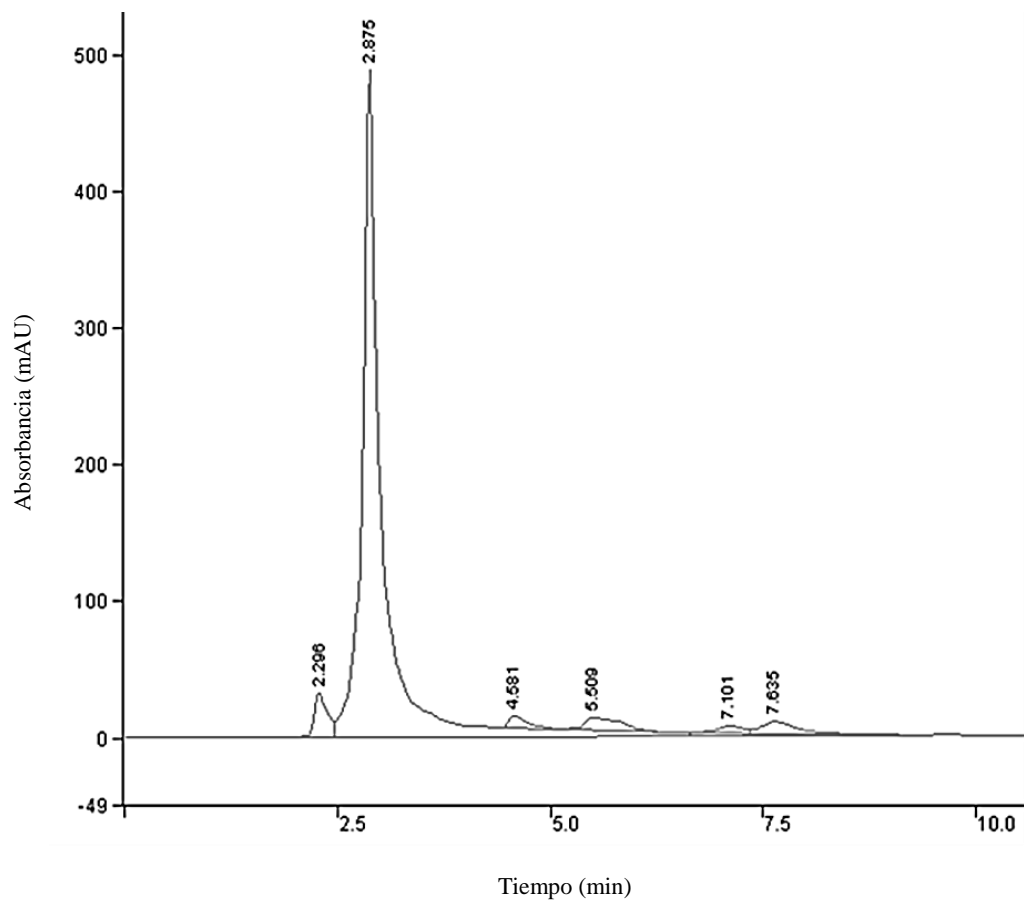


Figura 8. Cromatograma (HPLC-DAD) de la extracción metanólica de hojas de MO a 260 nm.

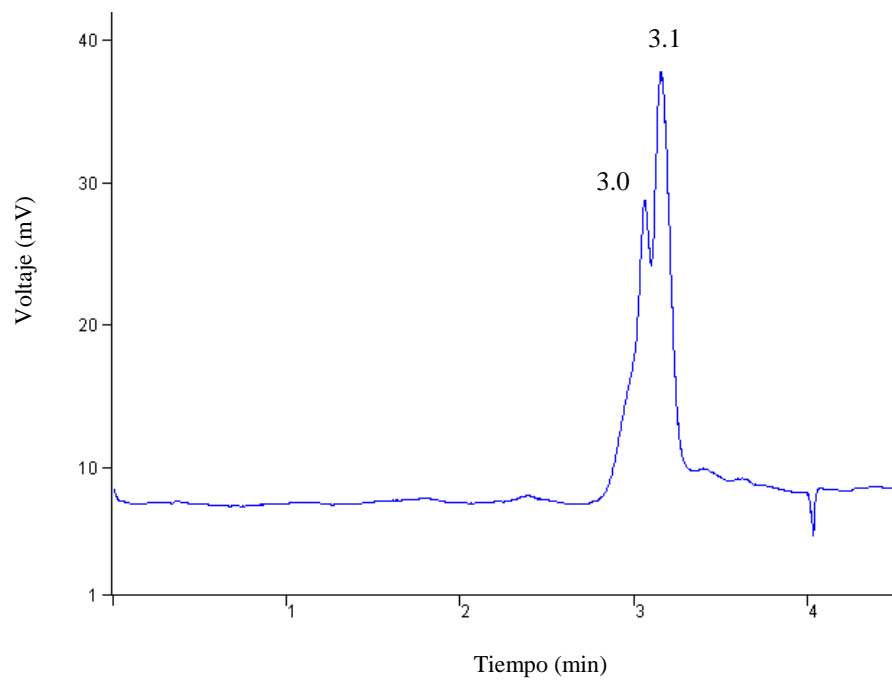


Figura 9. Cromatograma (HPLC-IR) utilizando el detector de Índice de Refracción para extracto acuoso de hoja de MO.

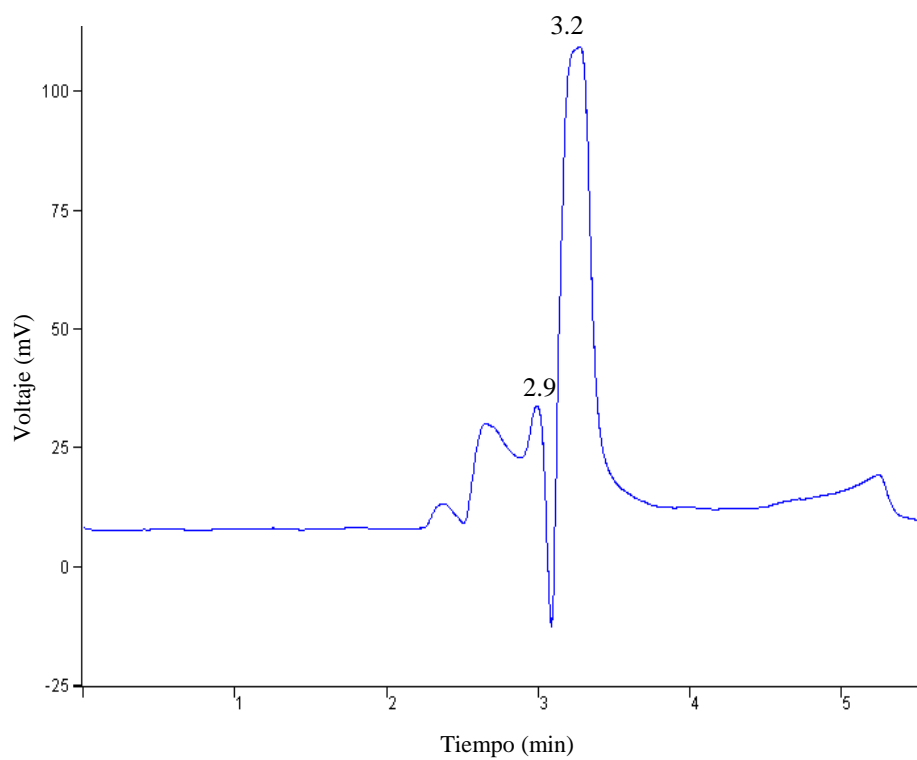


Figura 10. Cromatograma (HPLC-IR) utilizando el detector de Índice de Refracción para extracto metanólico de hoja de MO.

Como se observa en los cromatogramas del índice de refracción figuras 9 y 10, los tiempos de retención son muy similares a los del espectro por UV. Cabe mencionar que los tiempos se recorren un poco debido a que las longitudes de los conectores entre columna y detector variaron de un detector a otro. Sin embargo, se observa que coinciden en el rango de los tiempos de retención entre 2.8-3.1. Es por ello que se concluye que los compuestos que observamos por UV-Vis son los más abundantes en nuestra extracción. Claramente se puede observar que con el solvente metanol se extraen más compuestos, ya que la señal es más grande, lo que nos indica que en nuestra muestra existen además de compuestos polares, otros con polaridad media o anfipáticos que se extraen con el solvente metanol impidiendo su identificación.

Las diferencias entre las dos extracciones se deben principalmente a la polaridad por el tipo de solvente. El metanol, probablemente cambia la afinidad particular de los compuestos que co-eluyen como un solo pico (Fig.7 y 8). Sin embargo, para poder identificar y conocer el tipo de compuesto que se está separando, es necesario recurrir a otra herramienta analítica como es el detector de espectrometría de masas (HPLC-MS), para conocer la estructura molecular de cada compuesto y de esta manera utilizar estándares para su cuantificación posterior.

Actualmente se utilizan fármacos sintéticos para controlar enfermedades crónico-degenerativas, destacando por su nivel de incidencia la hipertensión arterial y diabetes tipo II (Campos-Nonato *et al.*, 2013). Los fármacos más comunes son el candesartán e hidroclorotiazida como antihipertensivos, así como la metformina que funciona como un regulador de la concentración de azúcar en sangre (SEDENA, 2012). Estos fármacos están bien estudiados en cuanto a su dosificación y mecanismo de acción, es por esta razón que se seleccionaron como estándares de identificación para conocer si en los extractos de hoja de moringa están presentes compuestos con estructuras similares y se puedan relacionar con el posible efecto biológico de los extractos. Para determinar la presencia de compuestos con estructuras similares se realizaron inyecciones de los estándares puros (Figura 11).

En el cuadro 2 se puede observar que los estándares candesartán e hidroclorotiazida tienen Tr muy similares, a su vez comparten grupos aromáticos, azufrados y nitrogenados en sus estructuras. Se fortificaron las muestras de ambas extracciones con cada uno de los estándares por separado y se observó en la extracción acuosa, un

incremento en la altura de pico al Tr 2.8 minutos cuando se fortifica con hidroclorotiazida como se observa en la figura 12.

Cuadro 2. Tiempos de retención de estándares puros

Estándar	Concentración (ppm)	Tiempo retención (min)	Absorbancia (mAU)
Hidroclorotiazida	50	2.86	310
Candesartan	50	3.06	130
Metformina	50	5.80	47.7

Esto supone la presencia de hidroclorotiazida en el extracto de hoja de moringa, debido al incremento en el pico al mismo tiempo de retención al ser fortificada la muestra. Sin embargo, se compararon los espectros de absorción para cada estándar por separado con la muestra al mismo Tr. El espectro de absorción es una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida a diferentes longitudes de onda. A partir del espectro de absorción se obtiene el valor de longitud de onda al que el compuesto presenta la mayor absorbancia (conocido como máximos de absorción), dicha longitud se puede utilizar para hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. No obstante, existe una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de longitudes máximas y absorbancias como el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas (Gargaud *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que el espectro de absorción es particular para cada compuesto y puede presentar más de un máximo de absorción. Otro parámetro importante está dado por la pureza del compuesto, en donde se hace una correlación de los máximos de absorción y longitud de onda para cada compuesto (ecuación 1), permitiendo realizar una comparación para conocer la similitud de los compuestos mediante los espectros de absorción.

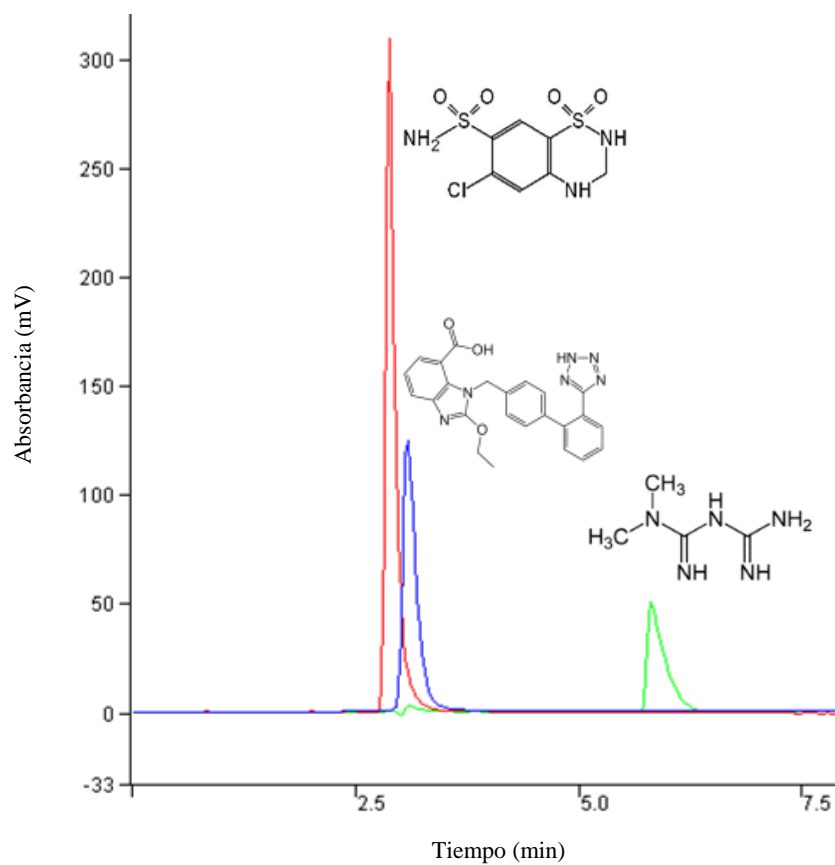


Figura 11. Cromatograma por HPLC-DAD de los estándares puros: hidroclorotiazida (Tr: 2.86), candesartán (Tr: 3.06) y metformina (Tr: 5.80).

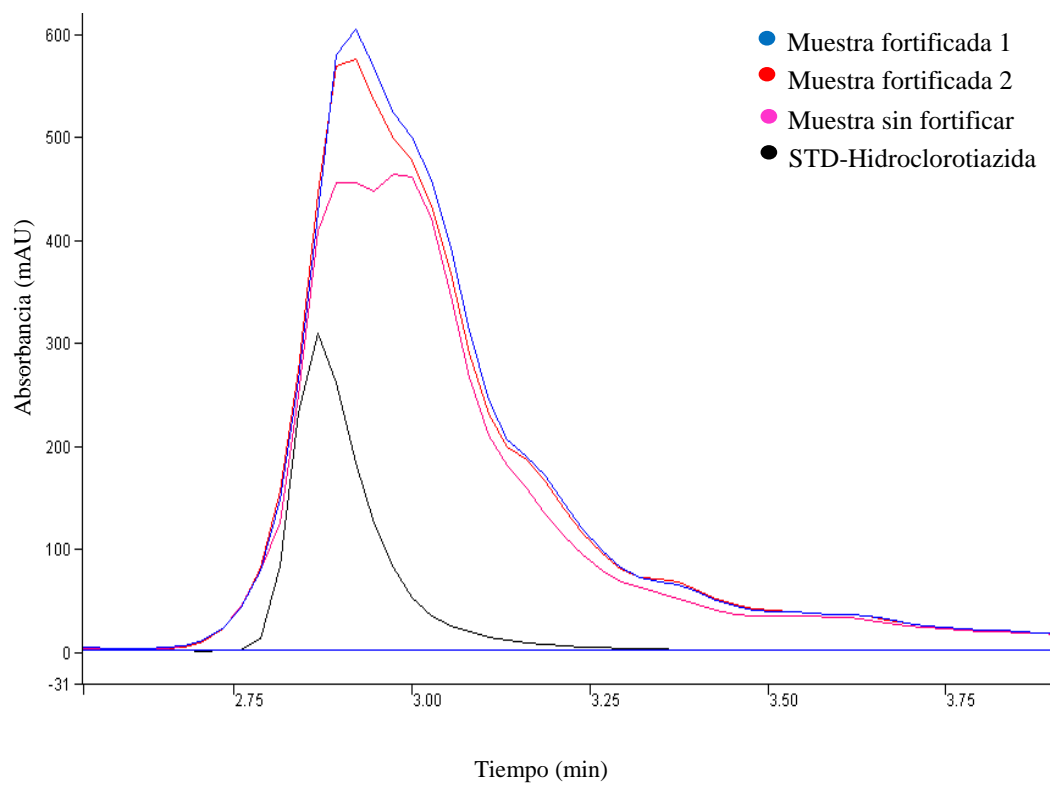


Figura 12. Cromatograma (HPLC-DAD) de la extracción acuosa de la hoja de MO fortificada con hidroclorotiazida [50 ppm] a 260 nm.

Para hidroclorotiazida se observan espectros similares en la forma (Figura 13) y presentan los dos máximos en el mismo rango de longitud de onda (232 nm para la muestra y 228 nm para el estándar) a un Tr 2.8. Se correlacionaron los espectros midiendo la pureza para la muestra control y la muestra fortificada, observándose una correlación de 0.99 (Cuadro 3), ya que prácticamente presentan el mismo espectro. No obstante cuando se correlacionan los máximos de la muestra fortificada con los máximos del estándar la correlación es de 0.73. Sin embargo, es posible que se trate del mismo compuesto a pesar de una correlación de 0.73, ya que como se mencionó anteriormente existen diversos factores que pueden afectar al espectro de absorción y en este caso la separación de la muestra no es total y puede deberse a la presencia de moléculas vecinas que modifican el espectro e impiden una correlación correcta.

Es por ello que se requiere trabajar en la purificación y separación total de los compuestos en la muestra para poder correlacionar más fiablemente nuestra muestra con los estándares. Sin embargo, es posible que se encuentre hidroclorotiazida en el extracto de moringa debido a que se obtuvo una alta correlación. A su vez, para candesartán no se observaron similitudes espectrales, pero no se descarta su presencia, ya que posiblemente interfieren otros compuestos que co-eluyen provocando una modificación en su espectro de absorción, más contundentemente.

Cuadro 3. Comparación de espectros de absorción por la pureza de cada compuesto

Tiempo de retención (min)	Pureza (nm)			Correlación	
	STD	M	MF	M&MF	STD&M
2.8	260	245	248	0.99	0.73

Debido a que no se logró una buena separación con los eluyentes metanol:acetonitrilo:buffer de acetato de amonio, se recurrió a otra fase móvil que constó de ácido fórmico 0.1% en agua y se logró una mejor separación (Figura 14). Sin embargo, aún existen compuestos que co-eluyen debido a la gran similitud estructural de los compuestos y afinidad muy similar a material de la columna, por lo que es necesario trabajar más en la purificación de la muestra.

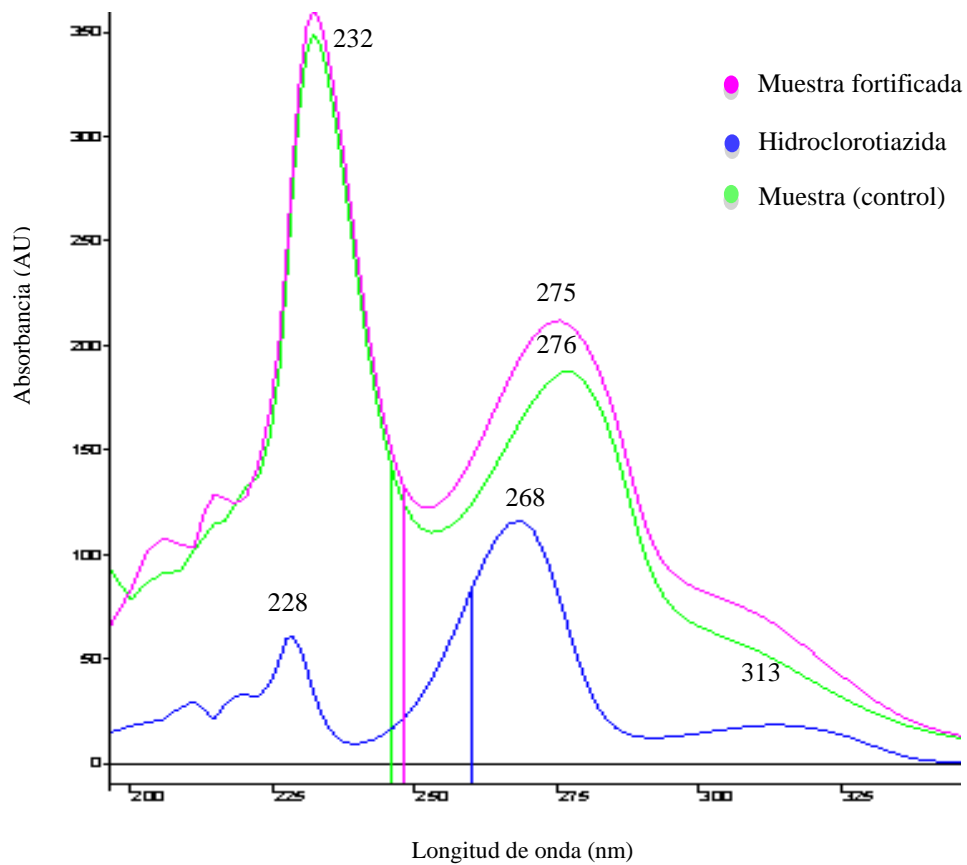


Figura 13. Espectros de absorción por HPLC-DAD (Tr 2.8 min) del estándar hidroclorotiazida, muestra fortificada y control.

6.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia, (HPLC-FL).

Se han reportado en MO otro tipo de compuestos glicosilados como son los carbamatos y tiocarbamatos, a los que se les atribuye la actividad hipotensora. La estructura general de los carbamatos es un *N*-metil sustituido uretano con la variación en el grupo éster, mientras que los tiocarbamatos en su estructura presentan azufre.

Se llevó a cabo la búsqueda de estos compuestos con un detector de fluorescencia para poder visualizarlos con un cromóforo mediante reacciones de derivatización post-columna. Se saponificó la muestra para liberar un alcohol, un carbonato y una metilamina, en la primera reacción. En la segunda reacción, la metilamina reacciona con el reactivo *O*-ftaldehído (OPA) y Thiofluortm nucleofílico para formar un compuesto derivatizado altamente fluorescente (1-metil-2-dimetil-etilamina tioisoindol) como se muestra en la figura 15.

En la figura 16 se presenta un cromatograma por HPLC acoplado al detector de fluorescencia, de una mezcla de ocho estándares comerciales: aminocarb, carbaril, metomil, carbofuran, aldicarb, aldoxicarb, oxamil y tiodicarb a una concentración de 3 ppm, y la muestra del extracto acuoso de moringa. Se puede observar que los tiempos de retención de la muestra no coinciden con los estándares utilizados (Figura 15), sin embargo, se asemeja estructuralmente a los estándares comerciales carbofurán, carbaril y tiodicarb, debido a que eluyen a tiempos muy cercanos. Además, el estándar tiodicarb presenta una estructura lineal como la del tiocarbamato reportado para MO (Faizi *et al.*, 1995). El detector por fluorescencia nos permite observar una parte de la estructura de los carbamatos, mediante la derivatización de la molécula mencionada anteriormente. Sin embargo, en el detector de UV-Vis es posible identificar otra parte de la estructura como el grupo R de los carbamatos capaz de absorber la luz a una determinada longitud de onda. A su vez, con el equipo de HPLC-MS se corroboran los resultados en base a las masas moleculares y las fragmentaciones resultantes.

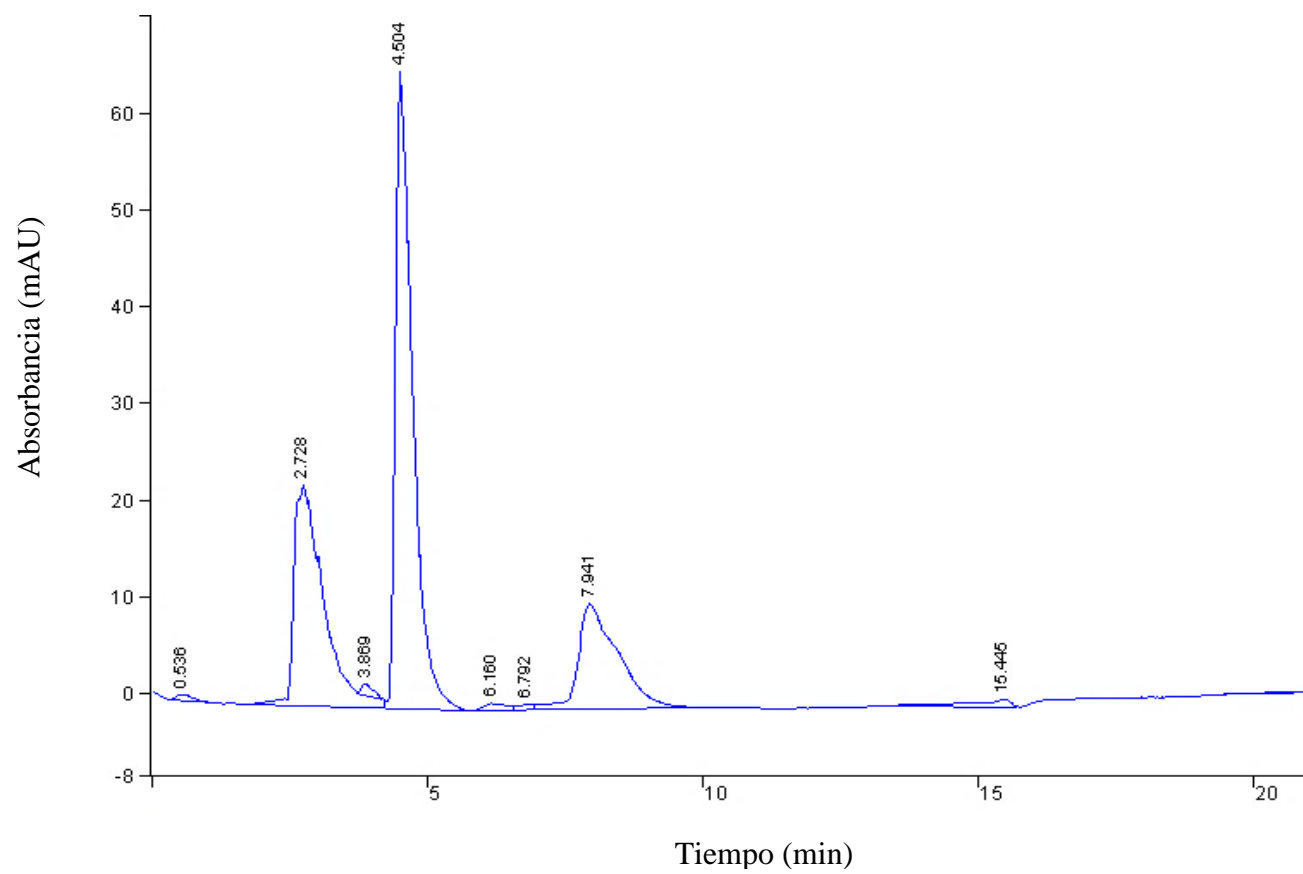


Figura 14. Cromatograma (HPLC-DAD) del extracto acuoso de hojas de Moringa a 260 nm.

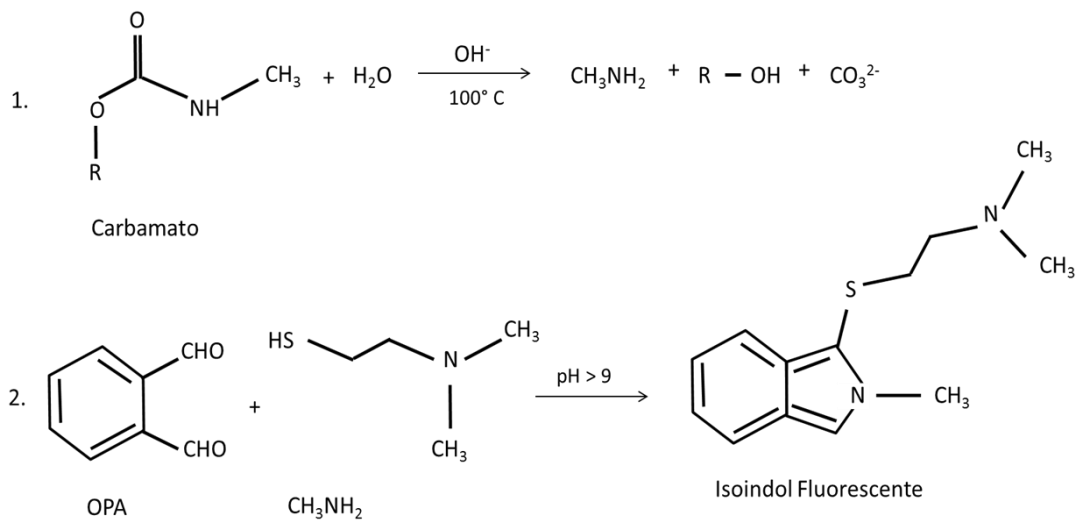


Figura 15. Reacciones de derivatización post-columna de carbamatos.

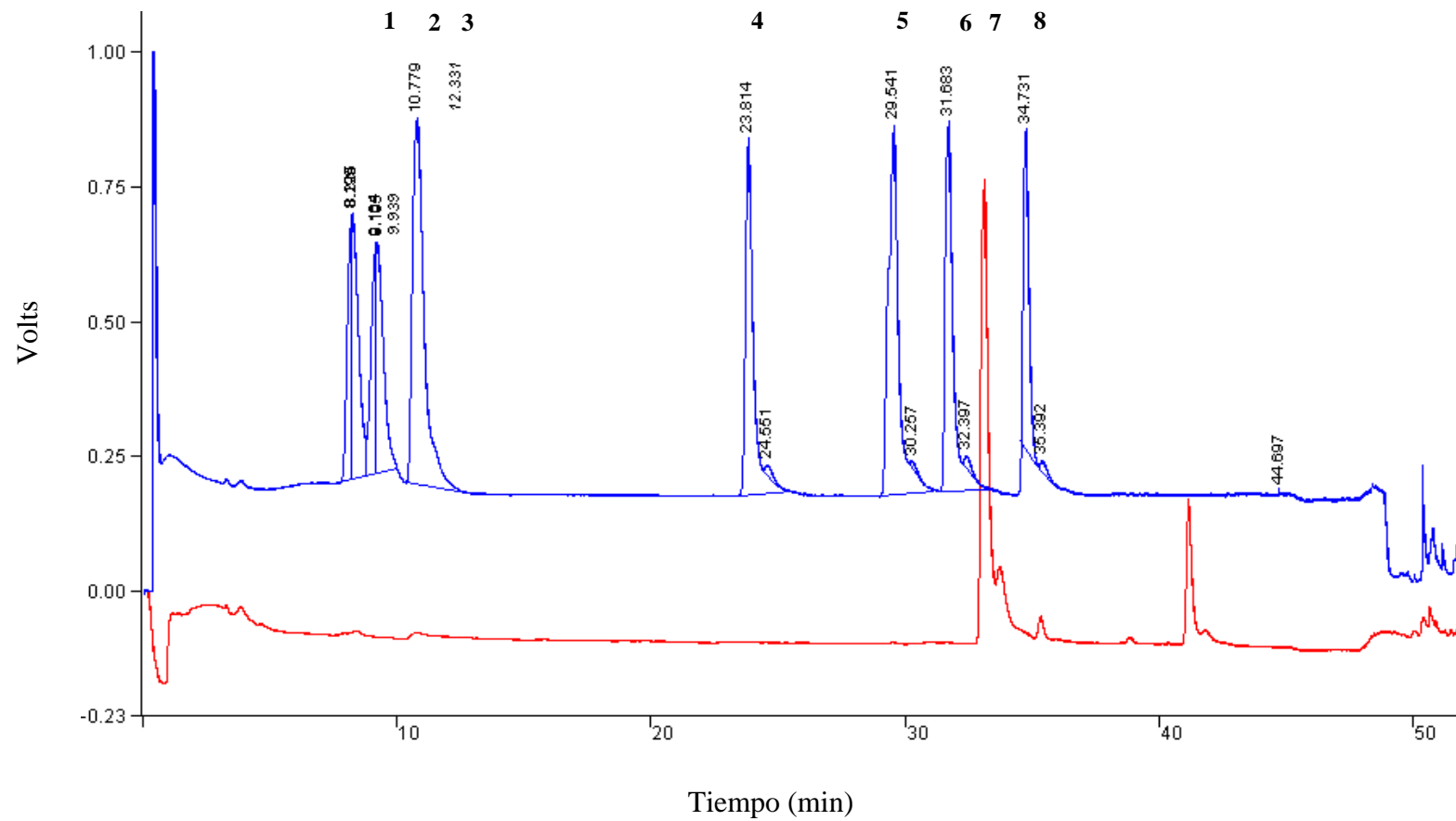


Figura 16. Cromatograma (HPLC-FL) acoplado a un detector de fluorescencia del extracto acuoso de MO. Muestra (línea roja) y estándares (línea azul). 1. Aldoxicarb; 2. Oxamil; 3. Metomil 4. Aldicarb; 5. Aminocarb; 6. Carbofurán; 7. Carbaril; 8. Tiodicarb.

Por medio de la cromatografía líquida con el detector de UV-Vis se obtuvo una separación de 3 picos cromatográficos con tiempos de retención de 2.7, 4.5 y 7.9 minutos, en donde posiblemente se encuentren una parte estructural de los carbamatos o su grupo R y los metabolitos de la molécula candesartán cilexetilo. Sin embargo, debido a que no se cuenta con los estándares de los carbamatos reportados en la literatura, similares a los presentes en MO, se recurrió a buscar información sobre las masas moleculares y las fragmentaciones de los carbamatos y tiocarbamatos reportados en MO y compararlos con nuestros iones mayoritarios mediante la cromatografía de líquidos acoplada a masas (HPLC-MS). Además de la implementación del software ChemBiodraw® 13.0 para las simulaciones de los posibles fragmentos presentes en la muestra. Los resultados y discusiones para este apartado se muestran en la siguiente sección.

6.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrómetro de Masas (HPLC-MS).

Los compuestos detectados en MO fueron identificados y/o confirmados mediante espectrometría de masas. Se observaron masas moleculares y fragmentos con las características de tres carbamatos, particularmente en el pico registrado en el cromatograma por UV-Vis (Figura 14) a un tiempo de retención de 2.7 min, similares a las reportadas en el estudio realizado por Faizi *et al.* (1995). Los fragmentos moleculares reportados en ese estudio corresponden a: *O*-metil, 4-[(2',3',4',-tri-*O*-acetil- α -L-ramnosiloxi)bencil] carbamato, *O*-metil, 4-[(4'-*O*-acetil- α -L-ramnosiloxi)bencil] carbamato y *O*-etil, 4-[(α -L-ramnosiloxi)bencil] tiocarbamato, representados estructuralmente en las figuras 17, 18 y 19, respectivamente.

Claramente se observa en el cromatograma de UV-vis que existe más de un compuesto eluyendo al Tr de 2.7 min, debido a la gran similitud en su estructura química y afinidad similar con otros compuestos, en donde los grupos R difieren por un átomo ya sea de azufre o un grupo amino. No obstante, mediante la detección por HPLC acoplado al detector de fluorescencia se afirma la presencia de carbamatos en la muestra.

Los carbamatos y tiocarbamatos presentes en MO se encuentran glicosilados con una molécula de glucosa y una molécula de ramnosa, azúcares característico de la planta, lo cual se puede corroborar con los cromatogramas de índice de refracción, en donde se genera una gran señal indicando que existen compuestos con propiedad óptica como son los azúcares, en este caso la ramnosa y la glucosa. Por otra parte, no se encontraron compuestos del tipo isotiocianatos en los extractos de hojas, lo que coincide con (Bennett *et al.*, 2003), ya que reporta que los isotiocianatos no están presentes en las hojas o solamente se encuentran en trazas y es casi imposible detectarlos debido a la sensibilidad del equipo.

Por cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS), también se encontraron fragmentos que posiblemente sean semejantes en estructura con el fármaco candesartán cilexetilo (hipotensor) con una masa molecular de 610 [m/z] como se observa en la Figura 20. Partiendo de un fragmento como ion principal del compuesto con una masa molecular de 497 [m/z] cargado con el ion sodio dando una masa total de 521 [m/z] (Figura 21).

Con el programa ChembioDraw® 13.0 se logró elucidar la estructura química, partiendo de la molécula original del fármaco candesartán cilexetilo. Se realizaron los posibles rompimientos de la molécula con el uso del software Chembiobdraw 13.0, encontrando 4 fragmentaciones posibles presentes en la extracción acuosa, de acuerdo a las reglas de fragmentación reportadas por Gross (2004). Cabe mencionar, que los siguientes resultados solo se llevaron a cabo para la extracción acuosa, debido a que en la extracción metanólica se extrajeron más compuestos que interferían con la elucidación estructural. A su vez, se compararon los resultados solamente con el fármaco candesartán cilexetilo ya que para hidrocortizida los fragmentos eran más pequeños y la fase móvil interfería para su posible elucidación en la muestra.

El fragmento 521 [m/z] representa uno de los iones moleculares más abundantes en el extracto acuoso el cual puede estar representado por la estructura de la figura 21 formando una sal con el ion Na^+ , de manera natural. Partiendo de esa estructura se realizó la búsqueda de las posibles fragmentaciones. Se encontraron los fragmentos: 497 [m/z], 473 [m/z], 372 [m/z] y 291 [m/z], figuras 22-25. Con el programa

ChemBioDraw® 13.0 se logró elucidar la estructura química partiendo de la molécula original del fármaco candesartan cilexetilo (figura 20).

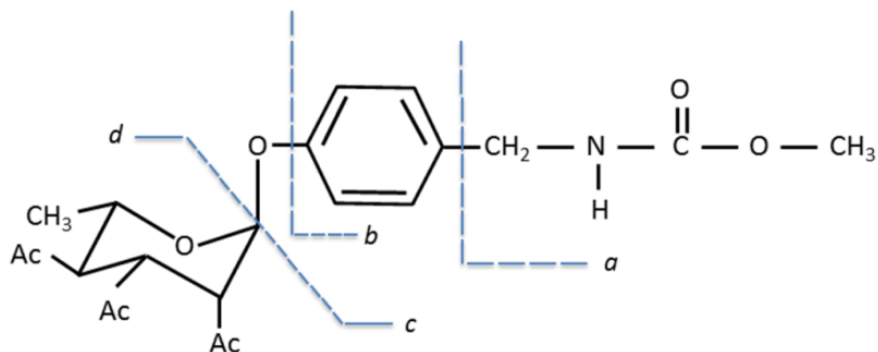


Figura 17. *O*-metil, 4- [(2',3',4',-tri-O-acetil- α -L-ramnosiloxi)bencil] carbamato,

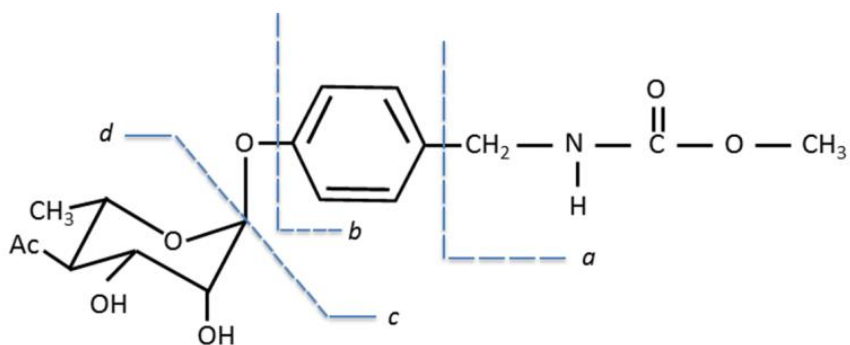


Figura 18. *O*-metil, 4-[(4'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi)bencil] carbamato

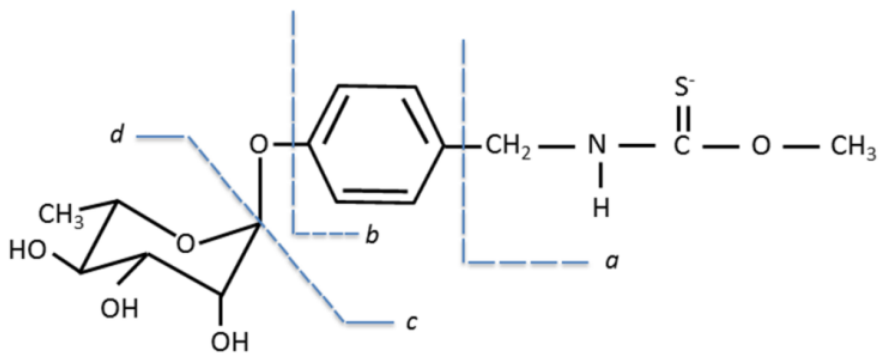


Figura 19. 4-[(α -L-ramnosiloxi)bencil] tiocarbamato

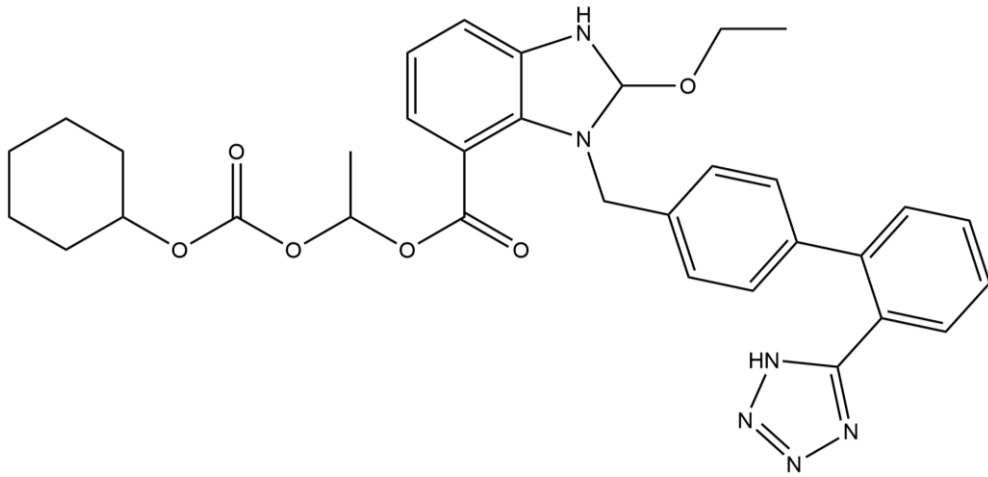


Figura 20. Estructura química del fármaco candesartán 610 [m/z]

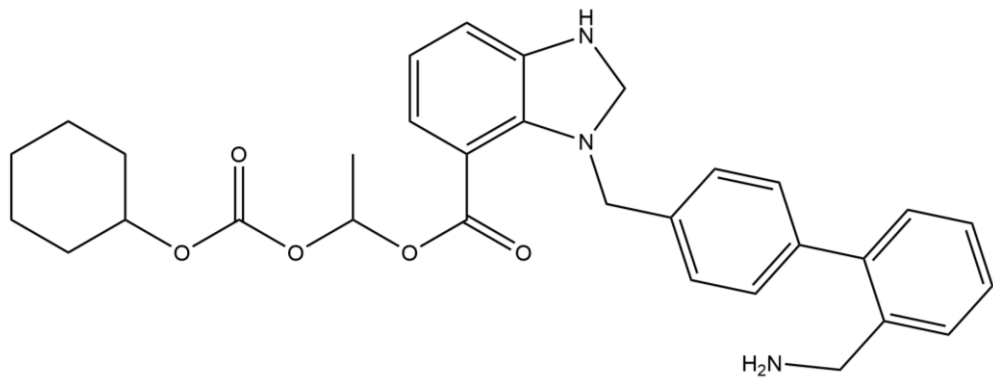


Figura 21. Fragmento 497+Na [m/z]

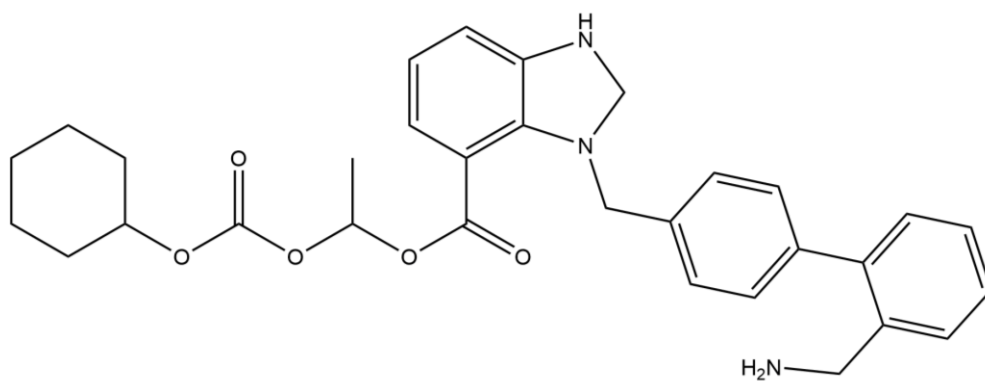


Figura 22. Fragmento 497 [m/z]

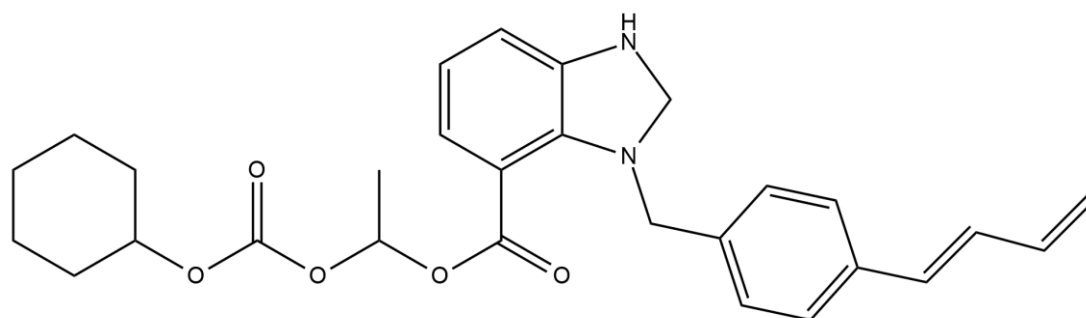


Figura 23. Fragmento 473 [m/z]

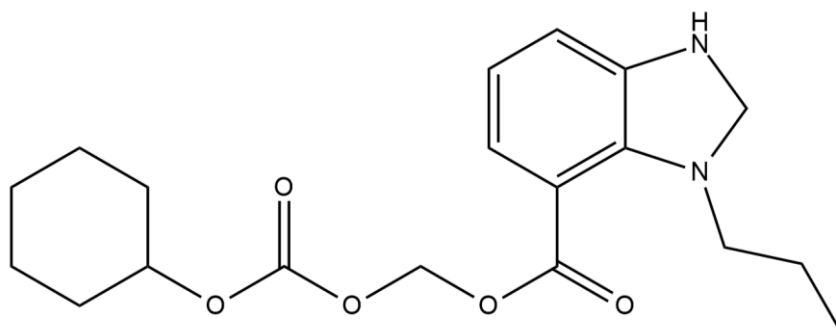


Figura 24. Fragmento 372 [m/z]

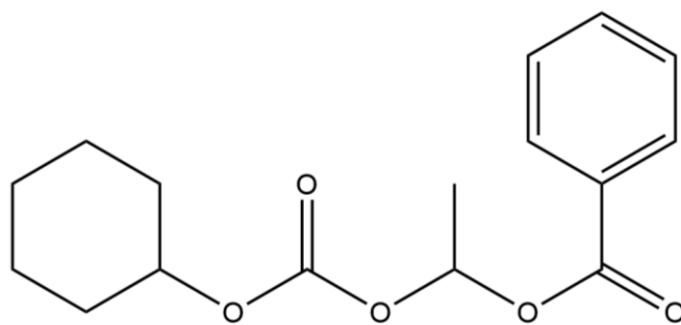


Figura 25. Fragmento 291 [m/z]

El mecanismo de acción de candesartán cilexetilo ocurre por la inhibición del sistema renina-angiotensina II en el endotelio por su gran afinidad, liberando el grupo cilexetilo, dejando como compuesto activo a candesartan, una fracción que comprende una masa molecular de 440 [m/z]. Sin embargo, su biodisponibilidad es aproximadamente del 34% (Akula *et al.*, 2010). A su vez, se han reportado otro posible mecanismo de acción de fármacos hipotensores, como activadores de receptores nucleares proliferadores de peroxisomas (PPARs), ejerciendo su acción como agonistas de dichos receptores (Ernsberger y Koletsky, 2007).

La relación que existe entre la activación de los receptores tipo PPARs y la hipertensión, está mediada en función del perfil lipídico. Esto es, el incremento en los niveles de colesterol HDL y la reducción de triglicéridos por la vía de la activación de los PPARs, esto en células hepáticas. Específicamente para PPAR- α causa una sobreexpresión del gen APO A1 que codifica para la producción de colesterol HDL y una disminución en la expresión del gen APO-CIII que codifica para la generación de la lipoproteína VLDL, rica en triglicéridos (Leibovitz y Schiffrin, 2007). Esta podría ser otra vía de acción de los fármacos y sus metabolitos presentes en el extracto acuoso de MO.

Cabe mencionar que los fragmentos que se presentan no son los compuestos activos de la estructura del fármaco original. No obstante, se desconoce si podrían tener actividad biológica una vez aislados y corroborar si se trata de esas estructuras. Es por ello, que se necesitan otras herramientas analíticas instrumentales para poder comprobar estos resultados, como el espectro de índice de refracción (IR) para conocer los grupos funcionales presentes en la estructura y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para elucidar totalmente la estructura molecular.

Por otra parte, la planta de moringa es bien conocida tradicionalmente por su efecto hipotensor y el fármaco con el que presenta estructuras o metabolitos similares (candesartán cilexetilo) ejerce esa función como regulador de la presión por el mecanismo de bloqueador del sistema renina-angiotensina. Sin embargo, como se menciona anteriormente su biodisponibilidad es relativamente baja y son necesarias las combinaciones con otros fármacos para tener un mejor efecto. Además, es posible

la vía de activación de los PPARs para los metabolitos con semejanza estructural, sin embargo, se necesitan estudios a mayor profundidad.

El efecto hipotensor de moringa puede estar relacionado a estos metabolitos que aún no están elucidados totalmente. Sin embargo, se requiere purificar estos compuestos y posteriormente realizar estudios sobre la actividad biológica. Por lo cual es importante continuar estudiando los posibles compuestos presentes que le confieren dicha propiedad ya que pueden ser atribuidos directamente a los carbamatos o a otros compuestos que aún no han sido identificados en la planta.

Las mediciones realizadas en el equipo HPLC-MS se llevaron a cabo modificando la temperatura a 30 °C para mejorar la separación, arrojando el cromatograma de la Figura 26. A su vez se puede observar una gran concentración de iones como lo muestra la Figura 27 en el Tr de 2.4 a 3.0 minutos, lo que supone la presencia de más de un compuesto en ese tiempo de retención. Esto puede deberse a la presencia de carbamatos y tiocarbamatos que presentan características químicas y de estructura muy similares entre sí, así como los metabolitos que presentan estructura similar a candesartán. En las Figuras 28 y 29 se muestran las masas moleculares de la fragmentación del ion 521 y 610 [m/z] respectivamente. Cabe mencionar que no fue posible identificar los compuestos presentes en el pico cromatográfico más abundante, en donde el ion molecular lo representó la masa 610 [m/z] debido a la falta de estándares y a la disponibilidad del equipo de espectrometría de masas.

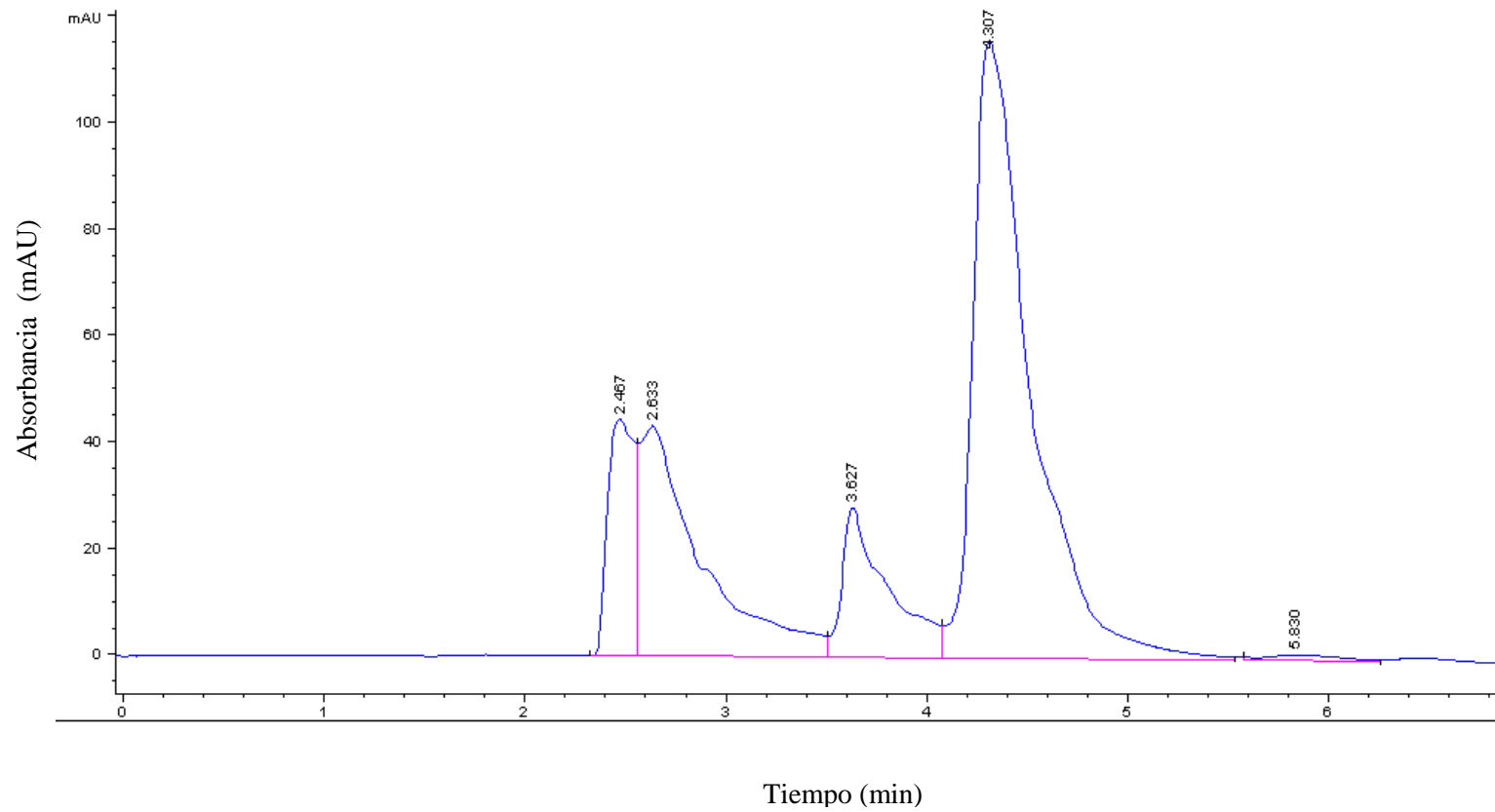


Figura 26. Espectro de UV-Vis del extracto acuoso de hojas de MO a 30° C, obtenido con el HPLC-UV-Vis acoplado a MS.

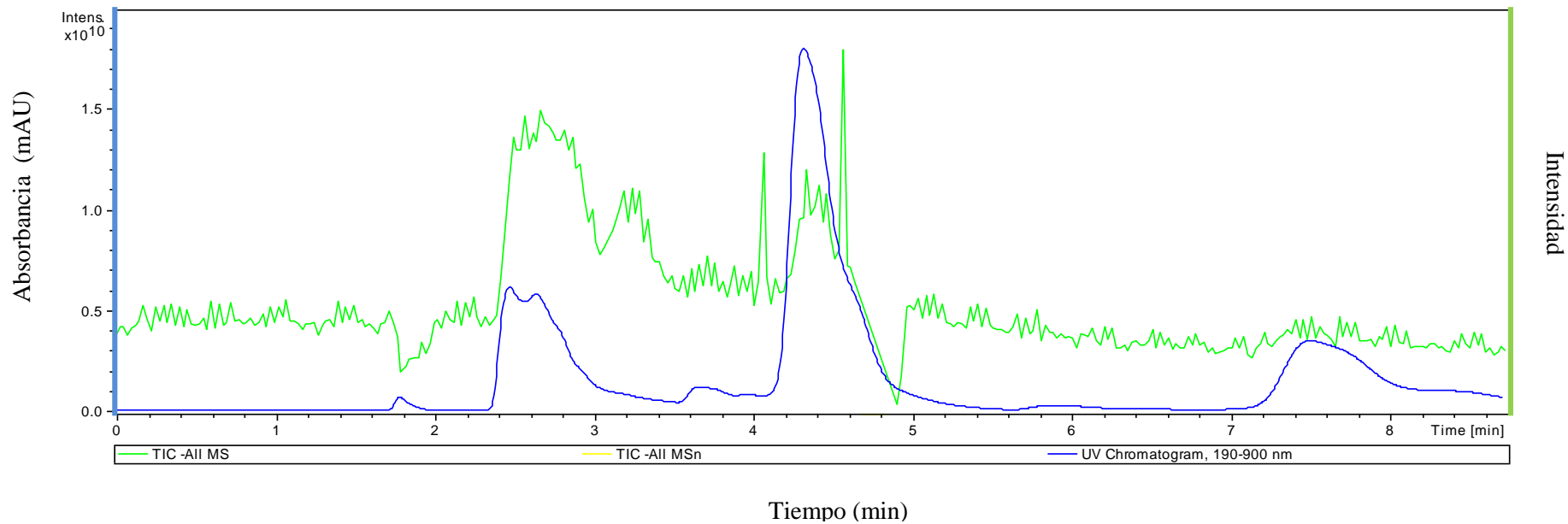


Figura 27. Cromatograma generado por la cuenta o intensidad de iones totales (verde) y cromatograma de UV-Vis (azul).

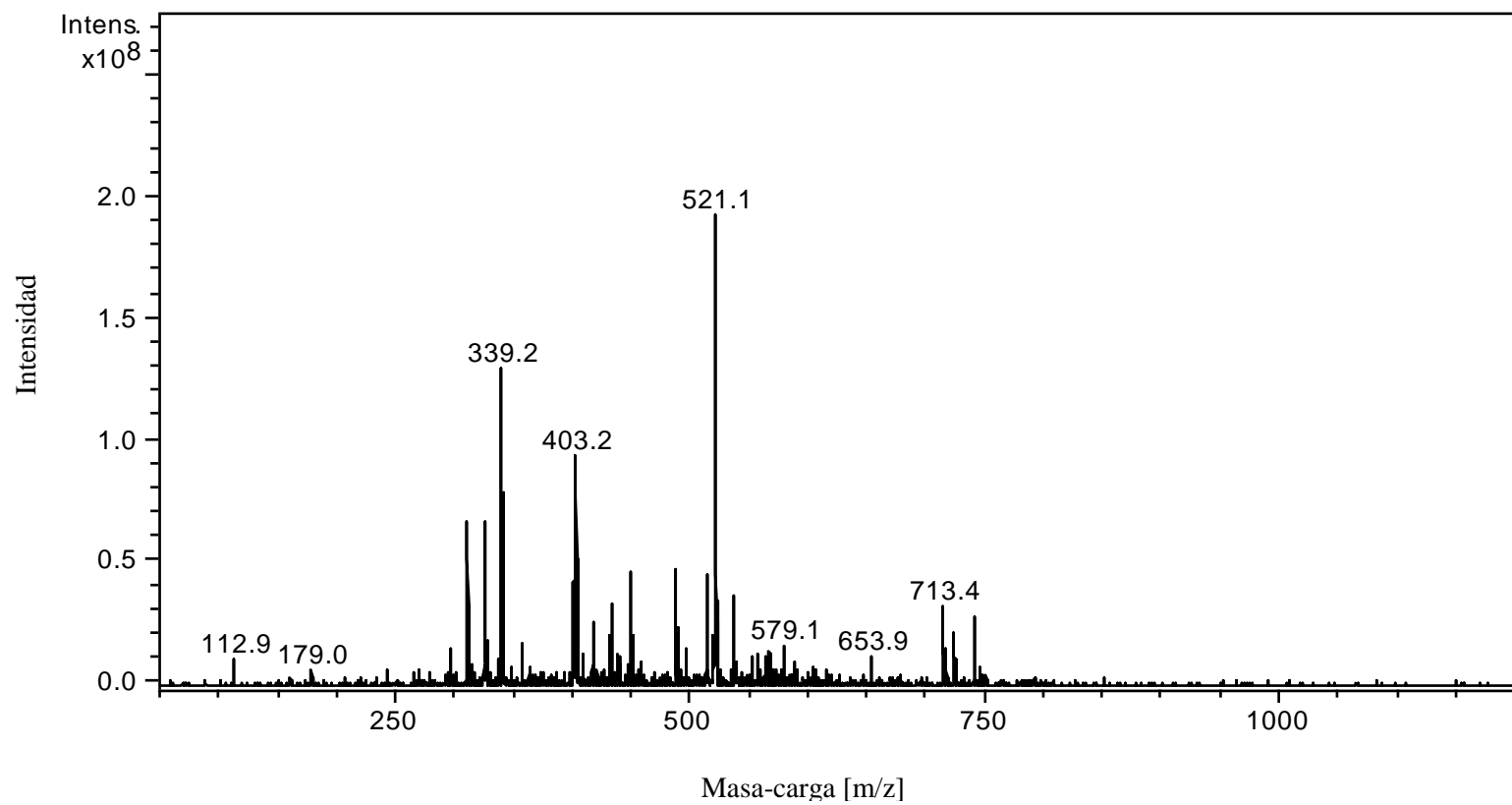


Figura 28. Masas moleculares de la fragmentación del ion 510 [m/z] del extracto acuoso en Tr 2.6 min.

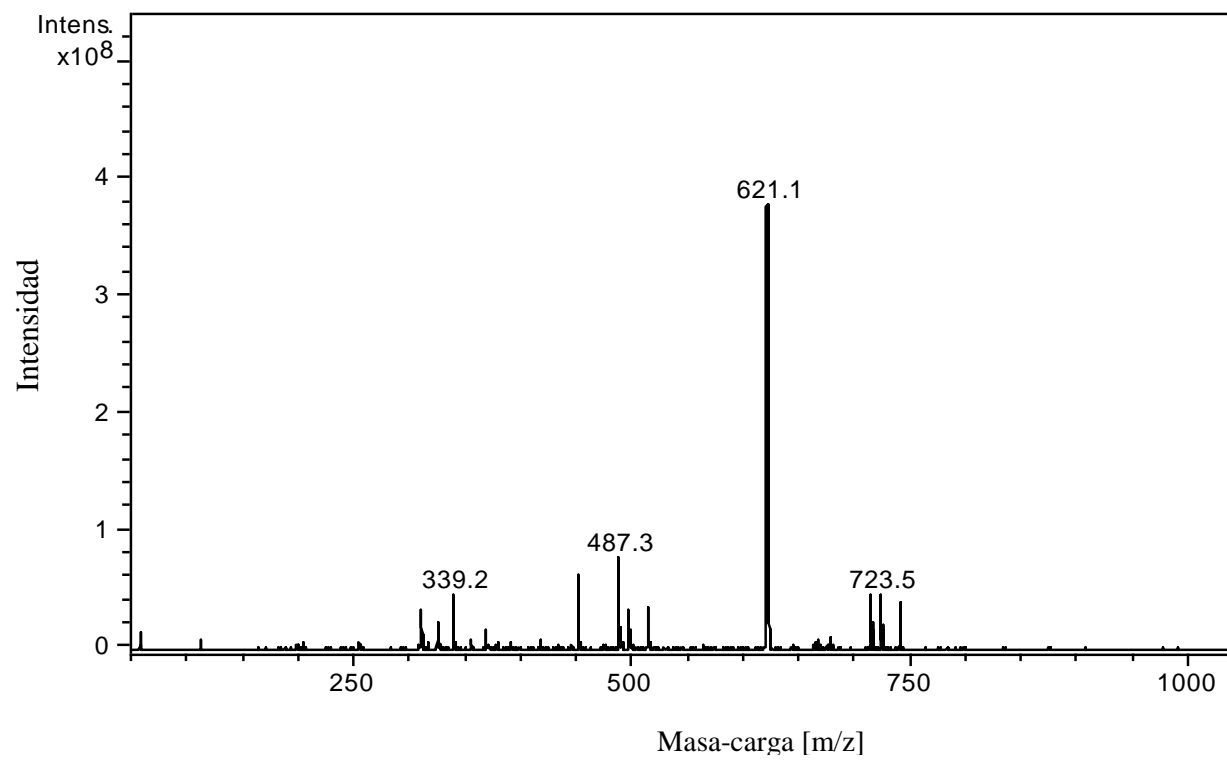


Figura 29. Masas moleculares de la fragmentación del ion 610 [m/z] del extracto acuoso a Tr 4.3 min.

6.4. Cromatografía de Gases acoplada a Masas GC-MS

A su vez, se realizaron inyecciones para ambas extracciones en el equipo de cromatografía de gases acoplada al detector de masas. Con la ayuda de la biblioteca NIST se logró identificar el compuesto fitol, corroborando con el estándar comercial, de acuerdo al patrón de fragmentación con los iones moleculares principales de 71, 123 y 278 [m/z] respectivamente, como se muestra en el espectro de masas de la Figura 30. En el extracto acuoso se define mejor el pico ya que representa mayor área y simetría como se muestra en la Figura 31. Posteriormente se cuantificó el fitol en la muestra, realizando una curva estándar de 4 puntos (Figura 32) con tres repeticiones arrojando la ecuación 2:

$$y = +170.1x - 989.6 \quad (2)$$

Se observó un comportamiento lineal y una $r^2:0.9513$ indicando que existe una correlación positiva entre las dos variables, una relación directa. Utilizando esta curva estándar, se obtuvo una concentración de 32.94 mg de fitol/kg en peso seco en las hojas de MO. En la curva que se muestra se obtuvo un 16.80 mg/L de acetonitrilo o solvente de extracción y posteriormente se realizaron los cálculos para expresarlo en mg/ kilogramo de polvo de hoja de moringa.

El fitol es una forma esterificada presente como una cadena lateral en la molécula de la clorofila y este es un producto de su degradación. Recientemente se ha reportado que funciona como activador de los factores de transcripción PPARs, indispensables para la regulación del metabolismo de lípidos en varios tejidos (Goto *et al.*, 2005). El fitol, por su estructura química similar a los ligandos naturales de los receptores PPARs como los ácidos grasos libres, es capaz de actuar como ligando de los mismos y activar la respuesta para la oxidación y metabolismo de ácidos grasos y la resistencia a la insulina. A su vez existen metabolitos de la misma estructura de fitol como el ácido fitico que también es capaz de activar a este tipo de receptores específicamente al receptor PPAR- α a bajas concentraciones en células hepáticas.

El fitol puede actuar como agonista activando a estos receptores específicos para PPAR- α y seguir el mecanismo de acción mencionado anteriormente para contrarrestar los efectos de la presión alta en personas con un alto contenido de triglicéridos en sangre o lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Leibovitz y Schiffrin, 2007).

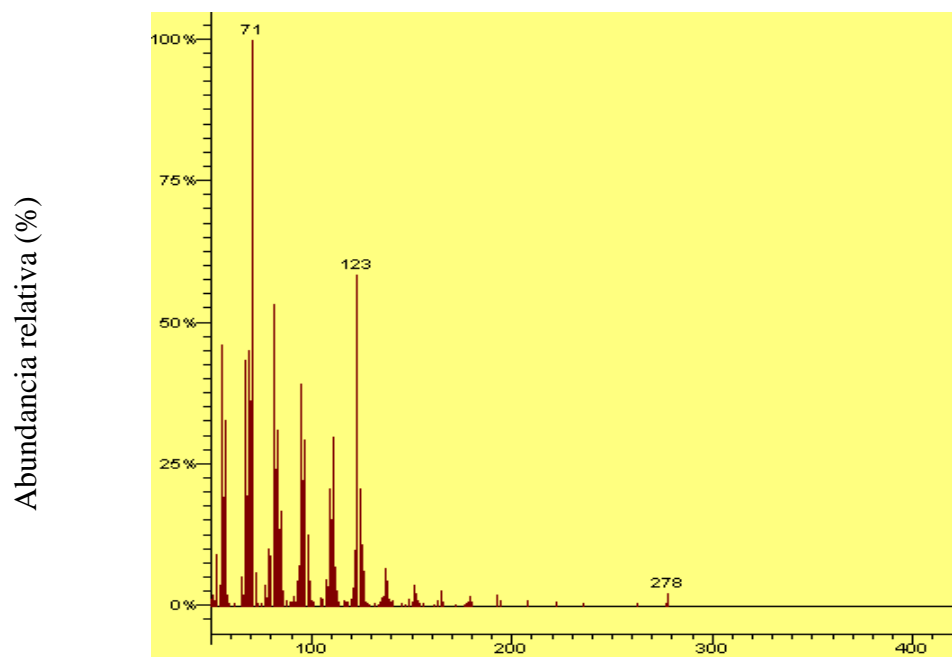


Figura 30. Patrón de fragmentación de la molécula de Fitol.

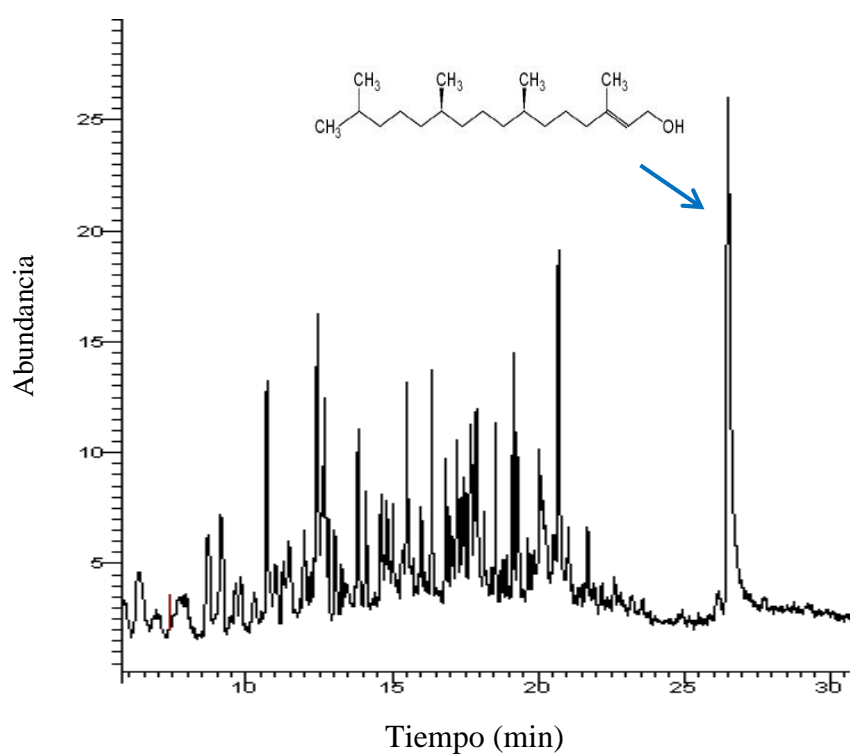


Figura 31. Cromatograma de fitol y su estructura por GC-MS.

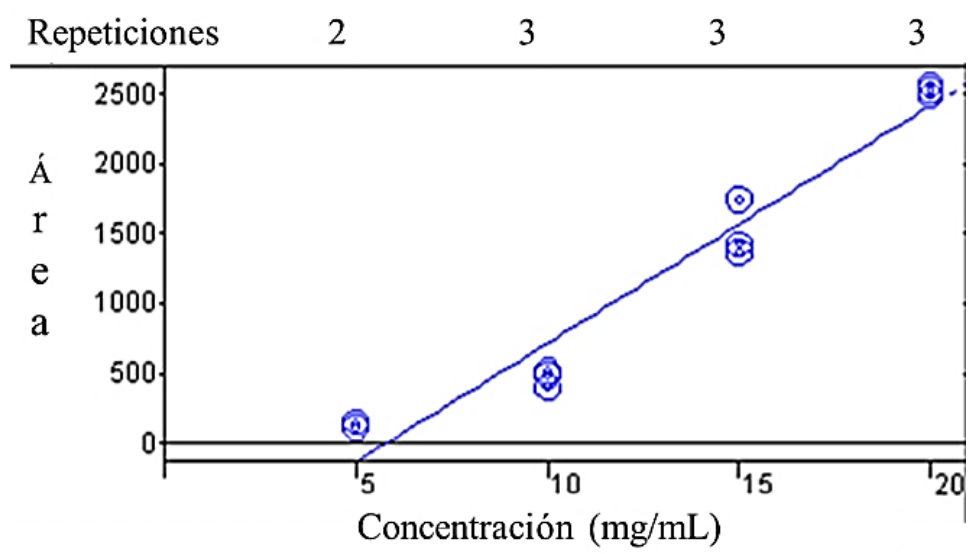


Figura 32. Curva estándar de ficol

Sin embargo, a esta estructura del fitol no se le ha dado la importancia debida ya que el porcentaje de liberación es relativamente bajo (5%) al ser consumido como clorofila. Sin embargo, no existe evidencia sobre la dosis-respuesta sobre fitol, pero es bien sabido que tanto fitol como sus metabolitos como el ácido fítico, son capaces de activar directamente a los receptores PPARs a concentraciones desde los 10 μM de fitol, según el estudio *in vitro* de Goto *et al.* (2005) y un EC_{50} para el ácido fítico de 40 μM de acuerdo a un estudio realizado por van den Brink y Wanders (2006), siendo una fuente de regulación a la oxidación de ácidos grasos, dislipidemia e hiperglucemia.

Como se mencionó anteriormente, el fitol pertenece a la estructura de la clorofila, compuesto responsable de la pigmentación de la planta y a su vez se ha reportado anteriormente en un estudio en nopal (*Opuntia ficus-indica*) por Tesoriere *et al.* (2004) que los pigmentos deben ser considerados al momento de evaluar la actividad biológica del nopal, ya que suponen que otros compuestos además de la vitamina C y compuestos fenólicos contribuyen a la reducción de la oxidación lipídica de acuerdo a sus resultados.

Es por ello la importancia de continuar estudiando estos metabolitos presentes en MO, los cuales exhiben potencial como una herramienta terapéutica. Es probable que este compuesto sea uno de los que contribuya a las propiedades benéficas de MO, sin embargo, son necesarios estudios más profundos de este compuesto así como la identificación de otros fitoquímicos presentes en la planta.

VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontraron compuestos con estructura químicamente similar al fármaco candesartán cilexetilo en la muestra acuosa de *Moringa oleifera*, en donde sus metabolitos pueden ejercer el efecto hipotensor de la planta. A su vez, se logró identificar la presencia de carbamatos en las hojas, compuestos que han sido reportados como los responsables para la disminución de la presión arterial en pacientes con HTA. Además se identificó y cuantificó al fitol, molécula que resulta de la degradación de la clorofila, el cual puede activar directamente a los receptores nucleares PPAR- α específicamente, y actuar como regulador de la presión por la vía de la disminución de triglicéridos en sangre y a su vez disminuir la resistencia a la insulina en pacientes con DT-2.

VIII. CONSIDERACIONES ADICIONALES

De acuerdo a los hallazgos del presente trabajo, es posible que *Moringa oleifera* sea una alternativa para regular las patologías como la HTA y la DT-2 debido a los compuestos bioactivos que contiene. Sin embargo, es necesario profundizar en estudios de purificación, identificación y cuantificación de estos compuestos para establecer dosis apropiadas en un modelo biológico.

IX. RECOMENDACIONES

Para realizar una mejor identificación y cuantificación de los compuestos separados, es necesario contar con los estándares comerciales puros. Así como mejorar las condiciones de separación de los compuestos utilizando otras fases móviles y otros gradientes de concentración. También se propone realizar fracciones en trabajos posteriores para probar el efecto en modelos *in vitro* y de esta manera conocer el efecto biológico por cada fracción. Es necesario contar con las herramientas analíticas para la elucidación total de los compuestos como un cromatógrafo de líquido acoplado a un detector de espectrometría de masas (HPLC-MS), el equipo Infra Rojo (IR), y el de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahir, K. B., Pratelina, E. M, y Shah, A. (2013). Simultaneous Estimation of Metformin Hydrochloride and Repaglinide in Pharmaceutical Formulation by HPTLC-Densitometry Method. *Chromatography Separation Techniques*, 41(1).
- Akula, G., Saikrishna, K., Bhupathi, S., Kumar, R., y Kumar, K. (2010). RP-HPLC method development and validation of candesartan cilexetil in bulk and their pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 191-196.
- Alberti, K. G., y Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of WHO consultation. *Diabetes Medicine*, 15(7), 539-553.
- Allinger, C., y Johnson, L. S. (1984). *Química orgánica* (Reverté Ed. segunda edición ed.). New York: Worth Publishers, Inc.
- Amagase, H, Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., y Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*, 131(3S), 955D-962S.
- Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Lo Curto, R. B., Rosa, A. S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Curto, A., Crea, F., y Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera L.*, grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4), 1047-1054.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., y Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int*, 86(2), 412-431.
- Anaya, A. L. (2003). *Ecología química* (Valdés Ed. primera ed.). México.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., y Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17-25.
- AOAC, Protocolo Internacional 29.A05. (2002).
- Awodele, Olufunsho, Oreagba, Ibrahim Adekunle, Odoma, Saidi, Teixeira da Silva, Jaime A, y Osunkalu, Vincent Oluseye. (2012). Toxicological evaluation of

- the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 330-336.
- Bennett, R.N., Mellon, F.A., Foidl, N., Pratt, J.H., Dupont, M.S., Perkins, L., y Kroon, P.A. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L.(horseradish tree) and *Moringa stenopetala* Lam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3546-3553.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*, 131(3S), 1010S-1015S.
- Cáceres, A., Saravia, A., Sofia, R., Zabala, L., de León, E., y Nave, F. (1992). Pharmacology properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(3), 233-237.
- Campos-Nonato, I. , Hernandez-Barrera, L. , Rojas-Martínez, R., Pedroza-Tobías, A. , Medina-García, C. , y Barquera, S. (2013). Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Publica Mexicana*, 55(2), S144-S155.
- Cárdenas, E., Muñoz, M.J., y Honorato, J. (2002). Rosiglitazona. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 46(1), 45-52.
- Cartea, E. C., Francisco, M., Arbillera, R., y Velasco, P. (2008). Tecnología poscosecha. Los glucosinolatos como factor de calidad en las brásicas. *Horticultura*, 209.
- Chaudhri, R. D. (1996). Herbal drug Industry: a practical approach to industrial pharmacognosy. *New Delhi: Eastern Publishers*, 58.
- Christensen, K. B., Petersen, R. K., Kristiansen, K., y Christensen, L. P. (2010). Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ . *Phytotherapy Research*, 24(S2), S129-S132.
- Dangi, S. Y., Jolly, C. I., y Narayanan, S. (2002). Antihypertensive activity of the total alkaloids from the leaves of *Moringa oleifera*. *Pharmaceutical Biology*, 40(02), 144-148.
- Erk, N. (2003). Simultaneous Analysis of Candesartan Cilexetil and Hydrochlorothiazide in Human Plasma and Dosage Forms Using HPLC with

- a Photodiode Array Detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(15), 2581-2591.
- Ernsberger, P., y Koletsky, R. J. (2007). Metabolic actions of angiotensin receptor antagonists: PPAR- γ agonist actions or a class effect?. *Current opinion in pharmacology*, 7(2), 140-145.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for Life Journal*, 1-5.
- Faizi, S., Siddiqui, B. S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K., y Gilani, A. H. (1995). Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry*, 38(4), 957-963.
- Farah, M., Edwards, R., Lindquist, M., Leon, C., y Shaw, D. (2000). International monitoring of adverse health effects associated with herbal medicines. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 9(2), 105-112.
- Gargaud, M., Amilis, R., James, H., Viso, M., y Pintini, D. (2011). Encyclopedia of Astrobiology (pp. 1853): Springer Science & Business Media.
- Gashi, S., Nwobodo, E., y Ofili, J. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 21-25.
- Goto, T., Takahashi, N., Kato, S., Egawa, K., Ebisu, S., Moriyama, T., Fushiki, T., y Kawada, T. (2005). Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337, 440-445.
- GPC, Guía de Práctica Clínica. (2014). Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial en el Primer Nivel de Atención. *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-076-08*.
- Gross, J. H. (2004). *Mass Spectrometry* (Heidelberg Ed. First ed.). Germany.
- Guevara, A. P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H., y Nishino, H. (1999). An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 440(2), 181-188.

- Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, V. K., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R., y Gupta, R. S. (2012). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *J Diabetes*, 4(2), 164-171.
- Halkier, B. A., y Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 303-333. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228
- Hecht, S. S. (2004). *Cancer Chamoprevention* (Press Ed. Hardcover ed. Vol. 1).
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2012). Perspectiva estadística Sonora.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2013). Estadísticas a propósito del día de muertos, datos de Sonora.
- Jaiswal, D., Rai, K. P., Kumar, A., Mehta, S., y Watal, G. (2009). Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 392-396.
- Juárez-Rosete, C.R., Aguilar-Castillo, J.A., Juárez-Rosete, M.E., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P., y Cruz-Crespo, E. (2013). Hierbas Aromáticas y Medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3), 119-129.
- Kwang, K. K., Quon, M. J., Seung, H. H., Wook-Jin, Ch., Jeong, Y. A., Jeong-a, K., Yonghee, L., y Eak-Kyun, S. (2006). Additive Beneficial Effects of Fenofibrate Combined With Candesartan in the Treatment of Hypertriglyceridemic Hypertensive Patients. *Diabetes Care*, 29(2), 195-201.
- Leibovitz, Eyal, y Schiffrin, Ernesto L. (2007). PPAR activation: a new target for the treatment of hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 50(2), 120-125.
- López-Cervantes, G., Ramírez-Rodríguez, C., Fick, R. , y Ibarra-Gallardo, A. (2000). Hidropesía fetal no inmune. Presentación de siete casos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 43(4), 133-137.
- Makkar, H. P. S., y Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 128, 311-322.
- Martínez, M. (1959). *Plantas útiles de la flora mexicana* (Botas Ed.). México, D. F.
- Messerli, F. H. , Makani, H., Benjo, A., Romero, J., Alviar, C., y Bangalore, S. (2011). Antihypertensive Efficacy of Hydrochlorothiazide as Evaluated by

- Ambulatory Bloody Pressure Monitoring. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(5), 590-600.
- Moyo, B., Masika, J. P., Hugo, A., y Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925-12933. doi: 10.5897/AJB10.1599
- Munday, R., y Munday, C. M. (2002). Selective induction of phase II enzyme in the urinary bladder of rats by allyl isothiocyanate, a compound derived from *Brassica* vegetables. *Nutrition and Cancer- an International Journal*, 44(1), 52-59.
- Ocegueda, S., Moreno, E., y Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversidad*, 62, 12-15.
- Olson, M. E., y Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*, un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82.
- Oludoro, O. A., Aderiye, B. I., Connolly, J. D., Akintayo, E. T., y Famurewa, O. (2010). Characterization and antimicrobial activity of 4-(β -d-glucopyranosyl-1 \rightarrow 4- α -l-rhamnopyranosyloxy)-benzyl thiocarboxamide; a novel bioactive compound from *Moringa oleifera* seed extract. *Folia Microbiológica*, 55(5), 422-426.
- Oluduro, OA, Aderiye, BI, Connolly, JD, Akintayo, ET, y Famurewa, O. (2010). Characterization and antimicrobial activity of 4-(β -d-glucopyranosyl-1 \rightarrow 4- α -l-rhamnopyranosyloxy)-benzyl thiocarboxamide; a novel bioactive compound from *Moringa oleifera* seed extract. *Folia microbiologica*, 55(5), 422-426.
- OMS. (2005). Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002-2005.
- Pankaj, T., y Anand, K. (1999). Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. *Pharmacological Research*, 41(3).
- Parrotta, J. (1993). Resedá árbol del rábano. *Department of Agriculture Forest Service*.
- Pérez, R., de la Cruz, B. J., Vázquez, E., y Obregón, J. F. (2012). *Moringa oleifera*, una alternativa forrajera para Sinaloa. *Fundación Produce Sinaloa A. C.*
- Ramzia, I., Ehab, F. E., y Bassam, M. A. (2011). Liquid Chromatography Methods for the Determination of Vildagliptin in the Presence of its Synthetic Intermediate and the Simultaneous Determination of Pioglitazone

- Hydrochloride and Metformin Hydrochloride. *International Journal of Biomedical Science*, 7(3), 201-208.
- Reyes, N., y Ledin, I. (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, 101, 24-31.
- Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U., y Stimm, B. (2009). *Moringa oleifera* Lam. *Enzyklopädie der Holzgewächse. Handbuch und Atlas der Dendrologie*.
- Salam, N. K., Huang, T. H-W., Kota, B. P., Kim, M. S., Li, Y., y Hibbs, D. E. (2008). Novel PPAR-gamma Agonists Identified from a Natural Product Library: A Virtual Screening, Induced-Fit Docking and Biological Assay Study. *Chemical biology & drug design*, 71(1), 57-70.
- Salcedo-Rocha, A., Garcia, J. , y Contreras-Marmolejo, M. (2010). Presión arterial en adolescentes mexicanos: clasificación, factores de riesgo e importancia. *Revista de Salud Pública*, 12(4), 612-622.
- Sandoval, Luna H. (2010). Impacto de Enfermedades Crónicas en las Poblaciones Pensionadas. *Instituto Nacional de Salud Pública*.
- Saroj, K. P., Pulok, K. M., Kakali, S., Pal, M, y Saha, B. P. (1996). Studies on some psychopharmacological actions of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) leaf extract. *Phytotherapy research*, 10, 402-405.
- SEDENA, Secretaría de Defensa Nacional. (2012). Guía de Referencia Rápida. Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial en el Primer Nivel de Atención Médica. *Gobierno Federal*.
- Siddhuraju, P., y Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144-2155.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2002). Fisiología Vegetal (primera edición ed., pp. 994).
- Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., y Livrea, M. A. (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 391-395.
- UEPA, U.S. Environmental Protection Agency. (1989). Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-Methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatization. Method 531.1.

- van den Brink, D. M., y Wanders, R. J. A. (2006). Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1752-1765.
- Velázquez-Monroy, O., Lara-Esqueda, A., y Tapia-Conyer, R. (2002). Metformina y Síndrome Metabólico. *Secretaria de Salud SSA*.
- Waterman, C., Cheng, D., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Dreifus, J., Lila, M. A., y Raskin, I. (2014). Stable, water extractable isothiocyanate from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*. *Phytochemistry*, 103, 114-122.
- Westendorp, B., Hamming, I., Szymanski, M. K. , Navis, G., van Goor, H., Buikema, H., van Gilst, W. H. , y Schoemaker, R. G. . (2009). Adverse renal effects of hydrochlorothiazide in rats with myocardial infraction treated with an ACE inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, 602, 373-379.
- WHO. (2005). Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002-2005.
- Zhang, Y., Spokas, K., y Wang, D. (2005). Degradation of Methyl Isothiocyanate and Chloropicrin in Forest Nursey Soils. *Journal of Environmental Quality*, 34, 1566-1572.
- Zheng, W., Yates, S., Papiernik, S., y Nunez. (2006). Conversion of metam sodium and emission of fumigant from soil columns. *Atmospheric Environment*, 40, 7046-7056.