

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AGONISTAS A RECEPTORES INVOLUCRADOS EN EL SÍNDROME METABÓLICO DE UN EXTRACTO DE HOJA DE *Moringa oleifera*

Chávez Macías J. A, Carvallo-Ruiz T., y González-León A.
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a La Victoria km 0.6
C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

Autor de correspondencia: agonzalezl@ciad.mx

RESUMEN

El aumento de enfermedades crónicas degenerativas, provocadas por el síndrome metabólico ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales para desarrollar nuevos medicamentos o conocer el mecanismo y las dosificaciones para su uso adecuado. Se trabajó con hojas de *Moringa oleifera* a la que se le han atribuido efectos benéficos contra el cáncer, hipertensión arterial y diabetes, principalmente. Se identificaron compuestos de dos extracciones (agua y metanol) por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) y por cromatografía líquida con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). La materia prima se obtuvo de un huerto en la costa de Hermosillo, Son. Mex. Para la identificación de los compuestos se utilizaron como estándares tres fármacos, los más utilizados en el tratamiento de diabetes, e hipertensión. Se logró identificar al fitol por GC-MS con una columna DB-5ms 30 m x 0.25 mm utilizando helio como gas acarreador, para ambas extracciones. Dicho compuesto se reporta como agonista de receptores PPARs involucrados en la regulación de la hiperglicemia y dislipidemia. Para HPLC-DAD, se utilizó una mezcla de metanol:acetonitrilo:buffer de acetato de amonio pH 2 [75:22:3] como fase móvil isocrática, identificando que hay compuestos con estructura muy similar a los estándares.

ABSTRACT

The increase of chronic diseases due to the metabolic syndrome 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, GC-MS and HPLC-DAD. Two different solvents of extraction were use, water and methanol, the separated compound were characterized using three standards of identification, well-known drug to treat diabetes type 2 and hypertension. GC-MS (column DB-5ms 30 m x 0.25 mm using helium as mobile phase) showed that the main compound was phytol, a well-documented compound that activate the nuclear receptors PPARs that regulate hyperglycemia and dyslipidemia. An isocratic mobile phase was used for purification by HPLC, methanol:acetonitrile:buffer acetate of ammonium pH 2 [75:22:3] with a C₁₈ column at flow rate 1.0 mL/min, identifying compounds with similar chemical structures than the standards.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, fitol, cromatografía.

Área: Otros

INTRODUCCIÓN

Debido al incremento de enfermedades crónico degenerativas, han sugerido alternativas naturales para su tratamiento y prevención (WHO, 2005). El interés emerge por los compuestos bioactivos que se encuentran en las fuentes naturales, sin embargo, son necesarios estudios a profundidad para conocer el mecanismo de acción y dosificación de los mismos. *Moringa oleifera* (MO) es una planta proveniente de la India muy popular por sus propiedades nutricionales y medicinales como regulador de la presión arterial, hipoglucemiante, anticancerígeno, para la artritis reumatoide, entre otras (Faizi *et al.*, 1995; Fahey, 2005). Sin embargo existe mucha controversia sobre los compuestos que poseen esta actividad reportados principalmente los isotiocianatos. Sin embargo, estudios revelan que estos compuestos son prácticamente nulos en las hojas (Bennet *et al.*, 2003). Es por ello que se requieren más estudios para la identificación de los compuestos bioactivos y el uso de modelos biológicos adecuados. Dentro de los medicamentos utilizados para tratar la diabetes e hipertensión se encuentran la metformina, candesartán, tiazolidinedionas como la hidroclorotiazida, por mencionar algunos. Dichos compuestos comparten grupos aromáticos azufrados y nitrogenados. Sus mecanismos de acción se relacionan con la activación de receptores proliferadores de peroxisomas (PPARs) intercelulares reguladores de la oxidación de ácidos grasos y regulador del síndrome metabólico. Es por ello que en el presente estudio se propone identificar mediante las técnicas analíticas como la cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) utilizando como estándares de identificación a los fármacos que se encuentran en el mercado con el objetivo de buscar moléculas de extractos de hoja de moringa con estructura similar y probar su efecto biológico en una línea celular humana mediante la activación de receptores PPARs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados son grado HPLC de la compañía J.T. Baker®. 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. A su vez, se disolvieron los estándares en solvente metanólico debido a la solubilidad de los mismos.

Extracción de la muestra. Las extracciones acuosa y metanólica se llevaron a cabo de acuerdo al método de Anastassiades *et al.*, 2003. Para la acuosa se hidrataron 10 g de hoja seca de MO con 50 mL de agua destilada. Se pesaron 10 g y se añadieron 10 mL de acetonitrilo. Se adicionaron 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl. 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 y se adicionó a un vial de PSA para eliminar impurezas, clorofilas y agua, con la ayuda de una centrifugación a 3300xg 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. En la extracción metanólica se pesaron 2g de hoja seca de MO y se agregaron 10 mL de metanol se procedió a

centrifugar y filtrar bajo las mismas condiciones que en el extracto acuoso hasta obtener la muestra para inyectar.

Preparación de estándares. Se realizaron soluciones madre para cada compuesto por 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 .

Fortificación de la muestra con estándares. Se fortificaron las muestras con los estándares [50ppm] para ambos extractos (agua y metanol), se inyectaron las muestras fortificadas y sin fortificar como control.

Condiciones cromatográficas GC-MS. Se utilizó un cromatógrafo (GS-MS) Varian (modelo Saturn 2100T) para las dos extracciones con una columna DB-5ms 30 m x 0.25 mm de diámetro con Helio como gas acarreador. La inyección se llevó a cabo mediante splitless con una temperatura de inyector de 250 $^{\circ}\text{C}$.

Condiciones cromatográficas HPLC-DAD. Se trabajó 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 en [75:22:3]. Las condiciones cromatograficas constaron de una columna C_{18} 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 μm y tamaño de poro de 100 \AA . Se inyectaron 20 μL a un flujo de 1.0 mL/min a una longitud de 260 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de identificar los componentes individuales de extracciones acuosas y metanolica de hoja de moringa se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta resolución. En las figuras 1 y 2 se muestran los cromatogramas para ambas extracciones. Los datos que se presentan se llevaron a cabo con un análisis estadístico descriptivo en donde los valores son representados por la media.

Para la extracción acuosa (**Fig1a**) se observa un pico con mayor absorbancia presentando dos máximos a los tiempos de retención (T_r) de 2.87, 2.96 y un hombro al T_r 3.16, lo que indica la presencia de una mezcla de al menos 3 compuestos. La gran similitud estructural y afinidad de estos compuestos por la columna es la razón principal de la co-elución, impidiendo su purificación eficaz.

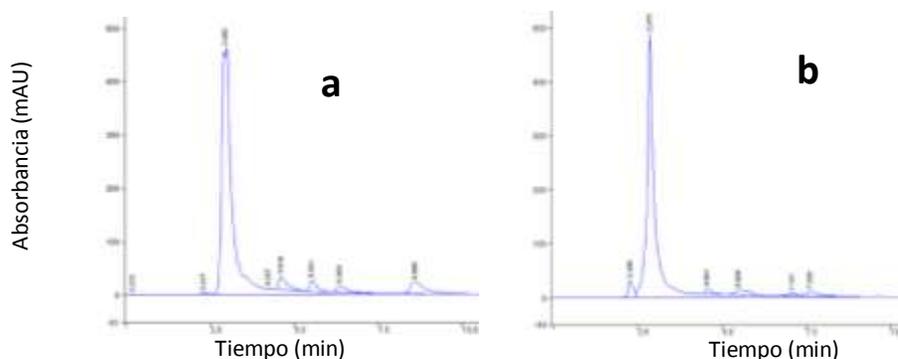


Figura 1. Cromatograma extracción acuosa (a) y metanolica (b).

Sin embargo, este pico cromatográfico es de gran interés, ya que los estándares hidrocortiazida y candesartan eluyen a tiempos de retención muy semejantes como se muestra en la tabla 1, posiblemente sea por una estructura química muy similar a estos compuestos de 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.2b**) arroja un cromatograma similar, sin embargo en el Tr 2.8 minutos se observa un pico simétrico y tiene mayor área. Asimismo, al Tr 2.3 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 mejor separación de la muestra. 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 coeluyen como un solo pico (**Fig.1a**). Sin embargo, para poder identificar y conocer el tipo de compuesto que se está separando, es necesario recurrir a otra herramienta analítica como 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 crónicas degenerativas, destacando por su nivel de incidencia la diabetes tipo II e hipertensión. Los fármacos más comunes son el candesartán e hidrocortiazida como antihipertensivos, así como la metformina que funciona como un regulador de la concentración de azúcar en sangre. 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 estructuras similares.

En recientes investigaciones se ha reportado que estos fármacos sintéticos son capaces de activar a factores de transcripción, los receptores nucleares proliferadores de peroxisomas PPARs que ejercen una función reguladora en la oxidación de ácidos grasos, resistencia a la insulina, principalmente. Para conocer la presencia de estructuras similares se realizaron inyecciones de los estándares puros. Como se observa en la tabla 1. Los estándares candesartan e hidrocortiazida tienen Tr muy similares, a su vez comparten grupos aromáticos, azufrados y nitrogenados en sus estructuras. Asimismo 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 2.87 minutos cuando se fortifica con hidrocortiazida como se observa en la figura 3.

Tabla I. Tiempos de retención de estándares puros

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

Esto supone la presencia de hidrocortiazida debido al incremento en el pico al mismo tiempo de retención al ser fortificada la muestra. A su vez se compararon los

espectros de absorción para cada estándar por separado con la muestra al mismo Tr. Para hidroclorotiazida se observan espectros similares 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 2.87. Sin embargo la pureza es diferente, ya que la separación en la muestra no es total y pueden interferir en su espectro los compuestos que co-eluyen en la muestra.

A su vez, se realizaron inyecciones para ambas extracciones en el equipo de cromatografía de gases acoplada a masas. Con la ayuda de la biblioteca NIST se pudo identificar el compuesto fitol. Con el extracto acuoso se define mejor el pico ya que representa mayor área y simetría como se muestra en la figura 4. 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). Este compuesto presenta semejanza estructural a ligandos naturales (ácidos grasos) de estos receptores. No se le ha dado la importancia debida ya que el porcentaje de liberación es relativamente bajo (5%). 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, siendo una fuente de regulación de la oxidación de ácidos grasos, dislipidemia e hiperglucemia.

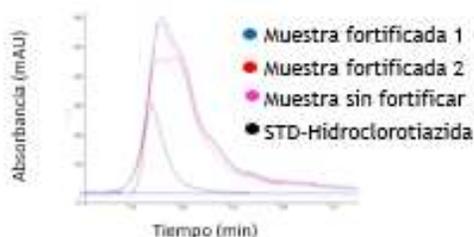


Figura 3. Cromatograma de la extracción acuosa de la hoja de MO fortificada con hidroclorotiazida [50 ppm].

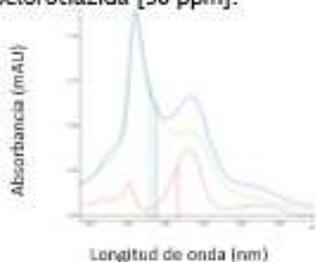


Figura 4. Espectros de absorción (Tr 2.87 min) del estándar hidroclorotiazida (línea roja), muestra sin fortificar (línea verde) y la muestra fortificada (línea azul).

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

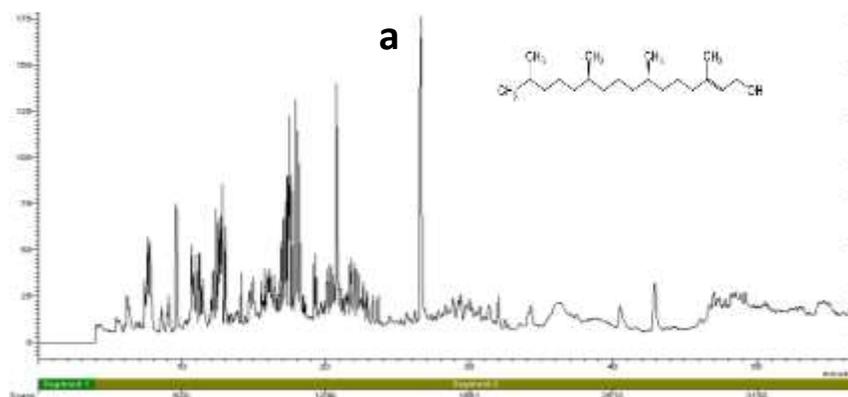


Figura 5. Cromatograma de GC-MS. a) fitol.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. *J AOAC Int*, 86(2): 412-431.
- Baxter J. 1968. Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with Refsum's disease. *Journal of Lipid Research*, vol. 9.
- 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* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12):3546-3553.
- 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., Shaheen S., Rubeena S., Salimuzzaman A. K, y Gilani A. 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry*, 38(4), 957-963.
- Goto, Tsuyoshi T., Nobuyuki K., Sota E., Kahori E., Shogo M., Tatsuya F., 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.
- WHO. (2005). Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002-2005.