



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

Comparación de los extractos metanólicos
obtenidos de *Moringa oleifera* Lam de
diferentes orígenes

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

KARLA JAQUELINE RAMÍREZ MAGAÑA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández



Los Reyes Iztacala, Estado de México

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE CUADROS	4
RECONOCIMIENTO	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
Pregunta de Investigación	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Materiales y Métodos	22
a) Colecta del material	22
b) Pruebas químicas	22
c) Caracterización química de los extractos.	24
d) Evaluación de la actividad mutagénica (Prueba de Ames)	25
RESULTADOS	26
1. Obtención de los extractos	26
2. Rendimiento de los extractos	27
3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios.	28
4. Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios.	28
5. Composición química de los extractos	33
6. Evaluación de la Actividad Mutagénica por Prueba de Ames	40
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>M. oleifera</i> . A. rama floreciendo. B, esquema de flor. C, corte transversal de flor. D-E, semillas de <i>M. oleifera</i> (Rondón et al., 2017).....	13
Figura 2. Partes de la moringa (<i>Moringa oleifera</i>), (Olson, 2002).....	13
Figura 3. Distribución actual de <i>M. oleifera</i> (Balbir, 2005).....	14
Figura 4. Usos de las diferentes partes de <i>Moringa oleifera</i> (Foidl et al., 2001 citado en Canett-Romero, et al., 2014)	15
Figura 5. Estructura química de la bencil-amina y moringina.....	17
Figura 6. Moringa en polvo comerciall (MOP) y moringa cultivada en Invernadero (MOI) en maceración con MeOH para la obtención de los extractos puros.....	26
Figura 7. a) Extracto vaciado en un plato de cristal para la evaporación total del solvente; b) Extractos puros despúes del proceso total de evaporación del solvente.....	27
Figura 8. Curva patrón de ácido gálico con concentraciones seriadas de ácido gálico.....	29
Figura 9. Curva patrón de Quercetina.....	30
Figura 10. Curva patrón de Atropina.....	31
Figura 11. Prueba de la actividad antioxidante media de los extractos, como patrón se utilizó la quercetina.....	32
Figura 12. Cromatograma del extracto MOP diluido en acetato de etilo.....	33
Figura 13. Cromatograma del extracto MOI diluido en metanol.....	34
Figura 14. Cromatograma del extracto MOI diluido en hexano.....	35
Figura 15. Cromatograma del extracto MOP.....	38
Figura 16. Cromatograma del extracto MOI.....	39
Figura 17. Número de colonias revertantes de His+ por concentración de extracto, R.E. 66+-, DMSO (blanco) y mutágeno AP (Ácido picrolónico)	40
Figura 18. Colonias revertantes de Histidina (His+/-) en el grupo basal o reversión espontanea (1), el grupo con DMSO (2) y en presencia del mutágeno AP [10µg] (3) en la cepa TA 98.....	41

Figura 19. Número de colonias revertantes de Histidina+ por concentración de extracto, R.E. 466+-, DMSO (blanco) y mutágeno MNNG N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (metilnitronitrosoguanidina).....	42
Figura 20. Colonias revertantes de Histidina (His+/-) en el grupo basal o reversión espontanea (A) y en presencia del mutágeno MNNG [5µg] (B) en la cepa TA 100.....	42
Figura 21. Número de colonias revertantes de Histidina+ por concentración de extracto, R.E. 1113+-, DMSO (blanco) y mutágeno MitC (Mitomicina C).....	43
Figura 22. Colonias revertantes de Histidina (His+/-) en 1: Grupo Basal, 2: DMSO (blanco) y 3: mutágeno MitC [10µg].....	44
Figura 23. Estructura química de un flavonoide.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos metanólicos de <i>M. oleifera</i> de diferentes procedencias.....	27
Cuadro 2. Pruebas colorimétricas para la determinación de metabolitos secundarios de fenoles (cloruro férrico), flavonoides (cloruro de aluminio) y alcaloides (ácido sulfúrico)	28
Cuadro 3. Concentración de fenoles totales.....	29
Cuadro 4. Concentración de flavonoides totales.....	30
Cuadro 5. Concentración de alcaloides totales.....	31
Cuadro 6. Partes por millón de MOI y MOP necesarias para una reducción del 50% del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	32
Cuadro 7. Compuestos detectados del extracto MOP en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	33
Cuadro 8. Compuestos detectados del extracto MOI diluido en metanol en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	35
Cuadro 9. Compuestos detectados del extracto MOI diluido en hexano en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	36
Cuadro 10. Promedios de las colonias revertantes de His+ en <i>S. typhimurium</i> dados por los extractos MOI y MOP.....	44

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Campus Iztacala y en la Unidad de Investigación en Microbiología y Toxicología (UIMYT) del Hospital Juárez de México.

Fue dirigido por la Doctora Ana Bertha Hernández Hernández.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. María Guadalupe Ortiz López

Dra. Nancy Janet Ruíz Pérez.

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

Financiamiento: PROYECTO UNAM PAPIIT IN205020.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis, la Dra. Ana que a pesar de todos los inconvenientes que se mostraron para obtener las muestras y empezar la actividad experimental, siempre estuvo apoyándome, alegrándome las mañanas y dándome ánimos ante toda adversidad junto con la Dra. Margarita, que desde el momento que fui a buscarla por un consejo me brindó su apoyo para continuar con el trabajo de Tesis.

A la Dra. Guadalupe, la Dra. Katy y el M. en C. Joel, que en el servicio social siempre me brindaron su cariño, apoyo y comprensión. Gracias por todas las enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, por impulsarme a empezar en el mundo de la investigación y por las ricas reuniones con todo el equipo.

A la Dra. Nancy, la Dra. Julia y el Dr. Jaime, que también a pesar de todas las adversidades en los diferentes laboratorios donde realizamos la actividad experimental, siempre buscaron la manera de continuar y terminar el trabajo de la mejor manera.

Les agradezco inmensamente su apoyo, sus enseñanzas y su cariño.

Agradezco el apoyo y amor incondicional que siempre me ha tenido mi familia. A mi hermana preciosa que siempre se enoja conmigo, pero nunca deja de apoyarme, amarme y creer en mí. A mi madre que a pesar de sus regaños siempre desea lo mejor para mí, que me ama a pesar de todo y me anima, me apoya y regaña para cumplir todo lo que me propongo. A mi padre que a veces pelea y me solo me pide la cura del envejecimiento, pero siempre me brinda su apoyo y amor.

A mi amada Tía Marí que siempre ha creído y deseado que llegue lo más lejos académicamente posible y cumpla las metas que me propongo. A mi abuela que se fue sabiendo que iba a lograr mil cosas a favor de la salud siempre en apoyo a la gente.

Los amo infinitamente y agradezco ser su hermana, hija, sobrina y nieta con toda el alma.

Gracias a mis compañeras de Servicio Social y trabajo de Tesis en el Hospital Juárez, Jessica, Jazmín, Alejandra, Nats y Gaby por escucharme, apoyarme, enseñarme, por su paciencia a mis horarios tan atareados y su maravillosa amistad que llevo siempre en mi corazón.

Agradezco mucho todo el apoyo y enseñanzas de mis compañeros de laboratorio de farmacognosia, Nancy, Uriel, Paola, Juan y José que hacían la actividad experimental más ligeras y siempre me enseñaros los métodos y técnicas necesarias con el mejor optimismo.

Gracias a todos ustedes, les quiero mucho y los llevare siempre en mí.

A mis profesores maravillosos de la FES Iztacala, Mónica Chico, Anabel Ruíz, Erick López, Vania Pérez, Ana María, Deni, Saúl, Hibraim Pérez, Francisco Javier Martínez, Francisco "Paquito", Marcial, Mayra y José Luis Tello por todas sus enseñanzas, sus consejos, por escucharme en algún momento difícil, por apoyarme y exigirme siempre más. Gracias a ustedes por la formación académica brindada (y también las enseñanzas de vida), todas sus enseñanzas son mis bases para continuar mi camino.

A todos mis grandiosos compañeros, mi primer compa Christian que a pesar de ser difícil el primer semestre nunca faltaron las risas y el cariño. A mi primer equipo, Nancy, Jessica, Aimée, Ana, Cristina y Erick que con ustedes aprendí el trabajo en equipo en la facultad. A mis amigos del 05, Edgar, Daniela, Giovanna e Ikbal donde me di cuenta que romper material de laboratorio es más fácil de lo que parece.

A todos mis compañeros del 53 y los más cercanos, Ikbal, Bruno, Lomelí, Nancy, Jessica, Javier, María, Christian, Oscar, Aimée, Álvaro, Alison y Arturo que siempre me regañaron para que no perdiera el camino y continuara con todo, que cuidaron de mi en campo y siempre se aventaron a hacer cosas chistosas a mi lado.

Por su amor y amistad, gracias a todos ustedes, hicieron de la carrera universitaria la mejor.

A las Dras. Vanesa, Aline y Lorena que conocí en una aventura y me enseñaron más que sólo metodologías y técnicas de laboratorio. Gracias por sus buenos

deseos siempre, su apoyo, sus enseñanzas y su cariño. Ahora forman parte de mi vida y siempre llevaré sus consejos a lo largo de todo mi camino con mucha alegría.

Gracias a mis mejores amigas, Gabriela, Selene y Alejandra, que los años solo nos han mostrado que la amistad se hace más fuerte cada vez, por su apoyo y amor siempre. Por no dejarme sola nunca y alegrarme la vida con su compañía cada que lo necesité. A mi best friend Arturo, que, aunque al principio no quería nada conmigo termino formando parte de mi círculo de amistad más cercano, por escucharme horas y horas quejarme sobre mis problemas amorosos siempre me acompañó y brindó su cariño incondicional. A Ikbai, que me enseñó a crecer como persona, me apoyó siempre y acompañó en locuras y sueños que compartimos a lo largo de todo el tiempo juntas. A mis amigas Brianda y Norma Elyze por su maravillosa amistad, consejos de vida y apoyo en todo momento. A mi hermana que siempre tiene tiempo para escucharme y brindarme consejos y regaños aun sean las 2 de la madrugada. A Alonso que me acompaña siempre, me regaña, cree en mí y me impulsa a ser cada vez mejor para cumplir todos mis sueños.

A todas las personas que conocí a lo largo del camino les agradezco todo. Los amo con toda mi alma y siempre los llevo en mi corazón. ¡Gracias!

RESUMEN

Actualmente la medicina tradicional es reconocida como un recurso fundamental para el sistema de salud en países, como India y China. Dentro de la medicina tradicional, una de las plantas medicinales que se ha vuelto muy popular en nuestro país es *Moringa oleifera*. Ésta es perteneciente a la familia Moringaceae, es un árbol perenne originario del norte de India y Paquistán el cual se sabe que presenta diferentes metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides y alcaloides que pueden llegar a tener actividad benéfica en el tratamiento de diferentes enfermedades, como el asma, epilepsia, enfermedades renales, artritis y diabetes, entre otras. Recientemente, *M. oleifera* es muy consumida entre los pacientes diabéticos, sin embargo, no se sabe con certeza los efectos tóxicos y mutagénicos que pueda tener. Asimismo, es muy importante tomar en cuenta las propiedades del medio ambiente en donde se cultiva, ya que si la planta se encuentra en un medio de estrés la síntesis de metabolitos secundarios será variable a beneficio de la misma planta y de la concentración de estos metabolitos secundarios sintetizados dependerá la actividad benéfica y/o tóxica de la planta al momento de consumirla. En este sentido es importante evaluar la planta en la región donde será utilizada. Por esta razón se realizaron ensayos para evaluar la toxicidad y mutagenicidad de la moringa, como pruebas iniciales, para determinar el uso seguro en humanos previo a la evaluación de posibles actividades benéficas que pudiera tener. En este estudio se obtuvieron dos extractos metanólicos de *M. oleifera* de diferentes procedencias, cultivada en invernadero (MOI) y de un supermercado (MOP), se analizó la composición química por Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a una espectrometría de masas (HPLC-MS), Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), la concentración de metabolitos secundarios (fenoles totales por el método de Singleton, flavonoides totales por el método de Dowd y alcaloides totales por la técnica de Shamsa), la capacidad antioxidante (Reducción de DPPH) y la actividad mutagénica (ensayo de Ames). El extracto con mayor cantidad de fenoles y flavonoides fue el obtenido en

MOP con 288.2 mg eAG/g y 12.47 mg eQ/g respectivamente. El obtenido en MOI presentó la concentración de alcaloides más alta de 11.25 mg eA/g, y la mejor capacidad antioxidante la obtuvo MOP con una CA_{50} de 13.98 ppm. Los compuestos obtenidos por el método de GC-MS para el extracto de MOP diluido en AcEtO fueron la 1-Dodecanamina N,N-dimetil-3-(N,N-dimetilaurylammonio)propanesulfonato y el Ácido sulfuroso, dodecyl 2-propilester. A diferencia del extracto de MOI diluido en MeOH en el cual se detectaron 4 compuestos siendo el más abundante el Eicosano y para el mismo extracto diluido en hexano se detectó el (fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil). En HPLC-DAD de MOP se detectaron 7 compuestos que se identificaron como fenoles simples y flavanoles. Por otro lado, se encontraron por HPLC-MS la luteolina y el ácido clorogénico en ambos extractos. Finalmente, en la prueba de Ames se utilizaron las cepas TA98, TA100 y TA102 y se probaron concentraciones de 16 a 2 μ g de cada extracto. Ninguna concentración de ambos extractos tuvo efecto mutagénico en las cepas utilizadas para este ensayo

Palabras clave: Medicina tradicional, moringa, extracto metanólico, metabolitos secundarios, prueba de Ames.

INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo la medicina tradicional, conocida también como medicina complementaria, alternativa o no convencional ha ocupado un papel muy importante en la medicina actual y ha sido asociada a los variados aspectos curativos que practican las poblaciones de países en desarrollo, producto de los valores indígenas o autóctonos de éstos. (Lozoya, 1987). La Organización Mundial de la Salud la define como “La suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizadas tanto en el mantener la salud como en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales” (OMS, 2020).

Actualmente es reconocida como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos. En todo el mundo existe un gran interés por el uso de la medicina tradicional, por ejemplo, en China el 40% de la terapia farmacológica recae en la medicina tradicional y en India el 65% de la población rural recurre a plantas medicinales para atender sus necesidades primarias de salud (OMS, 2003a).

Desde la antigüedad, las plantas medicinales de cada región se han estudiado y descritos en diferentes documentos (Santamaría y Balderrabano. 2016), por ejemplo, en Europa se escribieron en los siglos XIV y XV los códices de *Tacuinum sanitatis* en donde mencionan plantas con propiedades oculares curativas (García y Suárez, 2003).

Sin embargo, el uso de las plantas medicinales no está basado en análisis científicos y en ocasiones no se tiene la certeza de la especie que puede ser utilizada para consumo humano. Existen especies de plantas que son comercializadas en lugares lejos de su distribución natural, las cuales, pueden ser sustituidas por plantas locales que comparten ciertas características (Linares y Bye 1987), además de que el lugar de colecta afecta en gran medida la producción de ciertos compuestos que podrían ser los responsables de las actividades farmacológicas que presentan algunas plantas o peor aún, compuestos tóxicos para el humano.

Es por lo anterior que se deben realizar análisis de los componentes y de la genotoxicidad de estas especies para evaluar su posible utilización en el tratamiento para ciertas enfermedades, así como establecer su recolección en el lugar donde se consumen para tener certeza de la correcta identificación de especie y conocer el ambiente donde crece para estandarizar y atribuir algunos compuestos al mismo.

Moringa oleifera

Actualmente *M. oleifera* es muy estudiada gracias a las propiedades atribuidas a sus numerosos componentes bioactivos como vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, isotiocianatos, taninos y saponinas presentes en cantidades significativas (Vergara-Jiménez et al., 2017). Además de que cuenta con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, y terapéuticas (Canet-Romero et al., 2014).

M. oleifera forma parte de la horticultura tradicional desde hace mucho tiempo, principalmente con fines ornamentales. Es conocida también como palo de tambor, árbol del rábano picante, palillo de árbol, árbol de los espárragos, Ben de la India occidental, entre muchos otros. Pertenece a la familia Moringaceae y está estrechamente emparentada con la familia de la papaya (Caricaceae), ambas forman parte de la subclase Malvidae y al orden de las Brassicales (APG, 2009). Presenta un único género (*Moringa*) y las dos especies más comunes son *Moringa oleifera* y *Moringa concanensis* (Ramachandran et al., 1980).

Los organismos pertenecientes a la familia Moringaceae son árboles o arbustos con raíces tuberosas las cuales, junto con las hojas, producen glucosinolatos e isotiocianatos. Los tallos erectos no presentan ramificación; las hojas son alternas y compuestas con estípulas glandulares. Las inflorescencias son axilares y paniculadas con ramificación de tres a cuatro órdenes sostenidas por pedicelos. Generalmente presentan brácteas. Las flores aparecen en racimos, son pequeñas, de color blanco y olorosas; son zigomorfas (casi actinomorfas), con una fórmula floral de cinco sépalos, cinco pétalos (insertados al borde del hipantio de forma opuesta, con tres estaminodios) y cinco estambres (Figura 1). El ovario está formado por tres carpelos. Los frutos son de forma capsular, presentan dehiscencia,

tienen textura parecida al terciopelo, son fibrosos y contienen de 10 a 35 semillas por fruto, las cuales son marrones, globulares, aladas y con cotiledones aceitosos (Figura 2). La corteza de las Moringaceae tiene una madera blanca o amarillenta y sus planos son fibrosos, principalmente compuestos de parénquima (Olson, 2002; Olson, 2010; Geilfus, 1994; Foidl et al., 1999).



Figura 1. Flor de *M. oleífera*. A, rama floreciendo. B, esquema de flor. C, corte transversal de flor. D-E, semillas de *M. oleífera*. (Rondón et al., 2017).

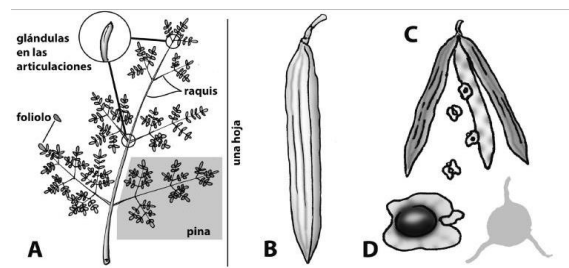


Figura 2. Partes de la moringa (*Moringa oleífera*). A, hojas grandes, pinnadas divididas en folíolos dispuestos sobre un raquis. En la inserción del peciolo al raquis se observan pequeñas glándulas. B, fruto en forma de cápsula ligera, leñosa y seca. C, dehiscencia del fruto en 3 valvas. D, semillas de color café, con 3 alas color beige (Olson, 2002).

La propagación se da de forma sexual (para forraje) y asexual (García, 2003). Soporta largos períodos de sequía y crece bien en zonas áridas y semiáridas. Es una especie resistente y requiere pocos cuidados hortícolas, además de que puede llegar a crecer hasta cuatro metros y dar flores y frutos en un año. (Folkard y Sutherland, 1996).

Distribución

Es originaria del norte de India y Paquistán, pero se ha difundido en casi todos los países tropicales de Asia, África y América (Geilfus, 1994) (Figura 3). En México, se encuentra en el Pacífico (desde el sur de Sonora hasta Chiapas) y la depresión del Balsas (Santillán, 2013). El género *Moringa* crece en forma abundante y frondosa en las llanuras calientes del sur del istmo de Tehuantepec (Olson y Fahey, 2011).

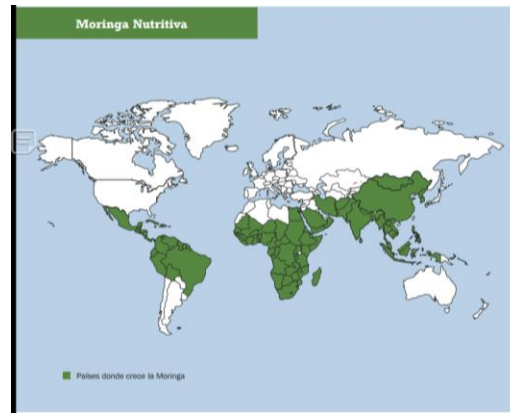


Figura 3. Distribución actual de la *M. oleifera* (Balbir, 2005)

La distribución que registró Balbir, (2005) nos dice que la moringa es una planta de zonas cálidas y generalmente prospera mejor por debajo de los 500 msnm y crece poco al ser cultivada a los 1500 msnm. (Olson y Fahey, 2011).

Usos

Se considera un buen suplemento alimenticio para el humano, se sabe que sus hojas son comestibles y son una fuente rica en micronutrientes esenciales, como las vitaminas A, B, C (ácido ascórbico) y E (tocoferol), de calcio, potasio, magnesio, fósforo, hierro y de los aminoácidos metionina, cisteína, leucina, fenilalanina, treonina y valina. Hasta el 30% del peso en las hojas secas está formado por proteínas y la mayor parte de ésta parece ser directamente asimilable (Olson y Fahey, 2011; Geilfus, 1994; Freiburger et al., 1998; Saini et al., 2016; Chelliah, et al., 2017).

Es utilizada como forraje para el ganado, siendo un complemento proteínico o sustituto completo sin que se presente disminución en la productividad del ganado. (Foidl et al., 1999).

De igual forma los frutos, semillas y flores son comestibles. Los frutos muy verdes se comen cocinados, las semillas se comen antes de volverse amarillas y al ser molidas se usan como condimento en salsas. La raíz se utiliza rallada como condimento picante y las flores se comen hervidas o en ensaladas. La resina del tronco se utiliza para espesar salsas (Geilfus, 1994).

Las semillas se usan tradicionalmente en el Sudán para purificar el agua, se ha probado ser un coagulante y floculante natural disminuyendo considerablemente el grado de turbidez de aguas residuales, lo que da lugar a una posible alternativa para la potabilización de las aguas y su extracto es utilizado en la industria cosmética. De igual forma se utiliza para la producción de biodiesel, ya que su semilla contiene entre el 30 y 41% de su peso en aceite, con un 73% de ácido oleico (Mendoza et al., 2000; Sreelatha y Padma, 2009; Bonal et al., 2012; Mera-Alegria, et al., 2016; Mora y Gacharná, 2015; Rondón et al., 2017).

Sus hojas y semillas tienen una excelente capacidad antioxidante que protege del daño oxidativo por su alto contenido de polifenoles, flavonoides y flavonoles (Omodanisi et al., 2017; Jaiswal et al., 2013; Malki et al., 2015).

En diferentes partes del mundo se han encontrado otros tantos beneficios que tiene esta planta, algunos otros se muestran en la figura 4.

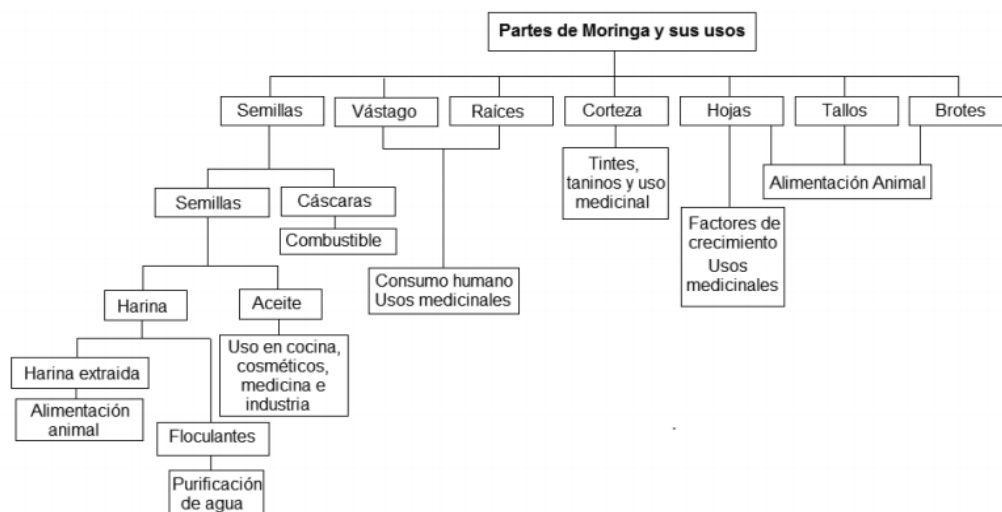


Figura 4. Usos de las diferentes partes de *Moringa oleífera* (Foidl et al., 2001 citado en Canett-Romero et al., 2014)

En cuanto a su actividad antidiabética existen diversos estudios donde se ha encontrado que *M. oleifera* ayuda a regular los niveles de glucosa en la sangre. Ndong et al., (2007) y Malki et al., (2015), sugieren que la actividad reguladora de glucosa que posee *M. oleifera* puede estar dada por el alto contenido de polifenoles como la quercetina el kaempferol y el ácido clorogénico y por glucosinolatos como glucomoringina. Kumari, en 2010 comprobó el efecto hipoglucémico de polvo de hojas de *M. oleifera*, en pacientes diabéticos tipo 2 con niveles de glucosa en ayuno iguales o mayores de 140 mg/dl en sangre administrándoles 8.0 g de polvo de hoja de *M. oleifera* en tres dosis divididas por 40 días y los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de glucosa en sangre en ayuno.

Efectos adversos de M. oleifera

Sin embargo, existe un problema puesto que las personas utilizan la medicina tradicional como auto tratamiento, debido a la creencia común de que lo natural significa inocuo y la justificación de su uso está dada con base en conocimientos etnobotánicos y de herbolaria tradicional (OMS, 2003b), por lo que no se tienen los suficientes estudios científicos que nos detallen de los posibles efectos adversos provocados por el consumo de *M. oleifera* por largos periodos de tiempo o consumos elevados.

La medicina tradicional actualmente está siendo usada ampliamente en poblaciones de muchos países, sin embargo, las instancias normativas y los profesionales de la salud se enfrentan a cuestiones de seguridad, eficacia, calidad, disponibilidad, preservación y reglamentación de ésta. Se deben aumentar las actividades de investigación y desarrollo, con el fin de mejorar la calidad y seguridad respecto a la evaluación de productos y servicios (OMS, 2014).

Se sabe que algunos glucosinolatos presentes en *M. oleifera* pueden ser bociógenos, es decir, evitan la correcta fijación de yodo en la glándula de la tiroides alterando la función de ésta. Algunos de estos glucosinolatos se encuentran presentes en la Moringa, aunque no se sabe con certeza las cantidades necesarias para producir este efecto bociógeno (Canett-Romero, 2014).

Paul y Didia (2012), hicieron un estudio con 24 cobayos a los que se les administró vía intraperitoneal extracto metanólico de raíz de *M. oleifera* por tres semanas en dosis de 3.6, 4.6 y 7 mg/kg de peso corporal y encontraron que estos extractos distorsionan la histología del hígado y riñones de los cobayos, de manera dependiente del tiempo y la dosis. Esto se lo atribuyen a la presencia de alcaloides en la corteza de la raíz, que son: moringina, que es similar a la bencil-amina (figura 5), y la moringinina (Paul y Didia, 2012).

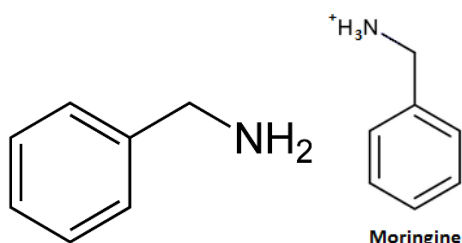


Figura 5. Estructura química de la bencil-amina y moringina.

Los usos que se le dan a esta planta son muy variados, por lo tanto, es necesario realizar una investigación más profunda sobre sus posibles efectos adversos y sus propiedades, para poder diferenciar los principios activos benéficos de los que pudieran tener algún grado de toxicidad y así reducir el riesgo de efectos adversos con el objetivo de determinar su contribución a la salud.

Pruebas de toxicidad y mutagenicidad de compuestos naturales.

Actualmente, las pruebas de toxicidad y mutagenicidad se realizan a diferentes niveles (nivel básico, nivel 1 y nivel 2) (Barrueco et al., 1999), evitando en la medida de lo posible el uso de animales ajustándose a la estrategia de las tres erres descrita por Rusel y Burch en 1959: Reemplazar dichos animales por otros organismos, Reducir el número de animales empleados en los experimentos y Refinar las técnicas a fin de disminuir el estrés y sufrimiento de estos. (Hubrecht y Carter, 2019). Por ello, autoridades de EE. UU. y Europa han creado el Comité de coordinación interagencial para la validación de métodos alternativos (ICCVAM) y el Centro Europeo para la validación de métodos alternativos (ECVAM) para realizar estudios

de validación sobre métodos de prueba para determinar la toxicidad y mutagenicidad de compuestos antes del uso animal (Stokes, et al., 2002).

La conferencia internacional de armonización de requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano (ICH) ha definido el uso de bacterias en ensayos de genotoxicidad (Kramer, 1998). Las pruebas de genotoxicidad para detectar compuestos mutagénicos se presentan dentro de las pruebas de nivel básico, ésta se detecta fácilmente en bacterias al cambiar los requisitos de su crecimiento, por ejemplo, el ensayo bacteriológico (Prueba de Ames) que sigue este principio y no bacteriológico, *in vitro*, de aberraciones cromosómicas (Test de *Allium cepa*) (Gatehouse, et al., 1994; Barrueco et al., 1999).

Prueba de Ames

Esta prueba ha sido reconocida y se usa en todo el mundo, pues tiene una alta sensibilidad en la detección de compuestos altamente probables de ser mutagénicos y es considerada como la primer prueba base antes de una prueba con animales ya que ha demostrado detectar compuestos mutágenos que posteriormente mostraron ser carcinogénicos en pruebas con animales (Stead, et al., 1981; Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000). Es considerada parte esencial de las pruebas toxicológicas para la detección de compuestos que generen un daño potencial por la presencia de compuestos genotóxicos (Villasana, 2008).

La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética auxotróficas a histidina capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del marco de lectura o por sustitución de pares de bases en el DNA (Villasana, 2008). Son sembradas en agar medio mínimo con histidina y biotina. Gracias a la composición del medio de cultivo, se forman colonias de bacterias que vuelven a la independencia de histidina procedentes de mutaciones espontáneas provocadas por la muestra problema. El valor igual o mayor a dos, de la expresión obtenida de dividir el número de revertantes en las placas de prueba entre el número de revertantes de las placas control, indica a presencia de actividad mutagénica en la muestra problema (Stead, et al., 1981; Villasana, 2008; Mortelmans y Zeiger, 2000).

La prueba de Ames se basa en el empleo de diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 y TA 1538), de las cuales para pruebas de mutagenicidad general se recomienda principalmente la TA97, TA98, TA100 y TA102; todas dependientes de histidina, cada una con diferentes mutaciones en genes del operón de histidina. Estas mutaciones son el blanco para mutágenos que producen daño al DNA por diferentes mecanismos. Al cultivar estas cepas en un medio mínimo de glucosa con trazas de histidina, sólo crecen aquellas colonias que revierten o vuelven a la dependencia de His+. (Maron y Ames, 1983; Villalobos-Pietrini, et al., 1998; Mortelmans y Zeiger, 2000; Villasana, 2008; Farmacopea Argentina 2013).

Además de las mutaciones en el gen histidina, las bacterias presentan otras mutaciones para aumentar la capacidad de detectar mutágenos, algunas de ellas son las mutaciones *rfa* y *UvrB*. La primera causa la pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que recubren la superficie de la bacteria aumentando su permeabilidad. Por otro lado, la mutación *UvrB*, la cual es una delección de un gen que codifica el sistema de reparación por escisión de ADN, lo que da mayor sensibilidad en la detección de mutágenos y al eliminar este gen se extiende a través del *bio gen* dando como consecuencia que las bacterias requieran de biotina para crecer. Las cepas TA98, TA100 y TA102 contienen el plásmido Pkm101, el cual, aumenta la mutagénesis química y espontánea al mejorar un sistema de reparación de ADN por errores que se presentan normalmente en los organismos. (Maron y Ames, 1983; Ames, et al., 1973; McCann et al., 1975; Shanabruch y Walker, 1980)

TA98, presenta la mutación en el gen *hisD* que codifica para la histidinol deshidrogenasa (Maron y Ames, 1983), ocurre en el alelo *hisD3052* dando una mutación con desplazamiento en el marco de lectura (frameshift) en -C-G-C-G-C-G-C-G. (Villalobos-Pietrini, et al. 1998).

La cepa TA100 presenta la mutación en el gen *hisG* en el alelo *hisG46* el cual codifica la primer enzima de la biosíntesis de histidina (Ames 1971), ésta sustituye la prolina por la leucina. Causa sustituciones de pares de bases, principalmente en

uno de los pares G-C de la prolina y leucina (Maron y Ames, 1983; Villalobos-Pietrini, et al., 1998).

La TA102 no contiene la mutación UvrB ya que ésta detecta mutágenos que requieren un sistema de reparación por escisión intacto. Es por ello que contiene un plásmido multicopia, pAQ1, que porta la mutación hisG428 y un gen de resistencia a la tetraciclina. Ésta presenta mutación de tipo ocre, dando lugar a una transición/transversión en TAA (Maron y Ames, 1983; Villalobos-Pietrini, et al., 1998).

Pregunta de Investigación

¿Existen diferencias en el perfil fitoquímico y la actividad mutagénica de los extractos metanólicos de *Moringa oleifera* de diferente procedencia?

Hipótesis

Debido a que ambas plantas tuvieron un crecimiento o procesamiento diferente, se espera que si cuentan con diferencias en su perfil fitoquímico y en la actividad mutagénica.

Objetivo general

Comparar la composición química y el análisis mutagénico de los extractos metanólicos de *Moringa oleifera* obtenida de diferentes orígenes.

Objetivos particulares

Del extracto metanólico de dos muestras de diferente origen de *M. oleifera*:

- Obtener y comparar el rendimiento de los extractos obtenidos por maceración.
- Determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios.
- Cuantificar la concentración de fenoles totales, de flavonoides totales y de alcaloides totales por espectrofotometría.
- Determinar la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) (reducción del DPPH).
- Analizar la composición de los extractos por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD), Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).
- Determinar la actividad mutagénica por ensayo de Ames.

Materiales y Métodos

a) Colecta del material

Se utilizaron 127.5 g de hoja de moringa oleífera comercial, de plantavit super foods en polvo, y 35.6 g de la parte aérea de moringa cultivada en invernadero de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de los cuales se obtuvieron los extractos metanólicos por el método de maceración (Domínguez, 1973).

La parte aérea de la moringa cultivada en invernadero se dejó secar por 24 horas y, junto con la moringa en polvo comercial, se dejaron por 72 horas cada una en un matraz con metanol. Los extractos se filtraron y destilaron a presión reducida utilizando un rotavapor. La maceración, filtración y destilación se realizó repetidas veces hasta que el solvente (metanol) quedara limpio. El rendimiento del extracto se determinó en relación del peso total de las hojas y el polvo de la planta utilizado respectivamente.

b) Pruebas químicas

Fenoles Totales

La Concentración de fenoles totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de Singleton et al., 1999. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en una solución estándar de 200 µg/ml y a partir de ésta se obtienen las concentraciones seriadas de 6.25, 12.5, 50, 100 y 200 µg/ml. A cada una se le agregó el volumen de agua destilada correspondiente para tener 1 mL de volumen final.

Se utilizó 1 mg de extracto metanólico de moringa en polvo y 10 mg de extracto de hojas de moringa cultivada en invernadero, los cuales, por separado, se diluyeron en 5 ml de agua destilada y posteriormente se toman dos alícuotas: 250 y 500 µL.

Las muestras se dejan reposar durante dos horas, tiempo en el cual todos sus componentes reaccionan a temperatura ambiente, y se lee a 760 nm.

Flavonoides Totales

Se determinó por medio del método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007). Se realizó una curva patrón de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 mg/L). Para el análisis de flavonoides totales de los extractos se prepararon 3 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en 3mL metanol, se mezcló con 5 mg de extracto metanólico de moringa en polvo y 10 mg de extracto de hojas de moringa cultivada en invernadero en solución a probar (0.2mg/mL). Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina/g de extracto.

Capacidad antioxidante del extracto

Se determinó por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1picrilhidracil (DPPH) (Okusa et al., 2007). Se cuantificó la concentración antioxidante media (CA_{50}), utilizando diferentes concentraciones (1-100 ppm). Como control positivo se utilizó quercetina y como blanco 200 μg de metanol grado HPLC.

Para las soluciones stock de los extractos se pesaron 5 mg de extracto de moringa comercial y 20 mg de extracto de hojas de moringa cultivada en invernadero. Cada extracto se disolvió en 5 mL de MeOH grado HPLC y para el Stock de quercetina se pesó 1 mg y se disolvió en 5 mL de MeOH grado HPLC.

Los resultados se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción, calculado con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción de DPPH} = (\text{C}-\text{E}/\text{C}) * 100$$

En donde:

C=Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH

E= Absorbancia experimental (Mezcla de DPPH (150 μL) + solución problema (50 μL)).

Cuantificación de alcaloides Totales

Se determinó por medio de la técnica de Shamsa et al., 2008, utilizando para ello, verde de bromocresol. Se realizó una curva patrón con atropina a diferentes concentraciones (0.02-0.1 mg/mL). Se determinó la absorbancia a 470 nm y los resultados se expresaron como mg equivalentes de atropina por gramo de extracto (mg eA/g).

Los problemas se obtuvieron con 10 mg de cada extracto, los cuales se diluyeron con 5 ml de agua destilada, mientras que el Stock de atropina se obtuvo con 1mg de atropina disuelto en 10 ml de agua destilada.

c) Caracterización química de los extractos.

La composición química de los extractos se estudió mediante una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) en un cromatógrafo de gases modelo 6850 y un espectrómetro de masas modelo 5975 C, marca Agilent Technologies. Las condiciones de corrida para las fracciones fueron: temperatura del inyector a 250° C, modo de inyección fue Split (flujo de 29.9 ml/mn) y un flujo de corrida de 35 cm/seg. Las condiciones del horno fueron: temperatura inicial de 70° C, la rampa de calentamiento de 15° C por minuto hasta 290° C, la cual se mantuvo por 6 minutos. El tiempo de corrida total fue de 30 minutos. El detector del espectrómetro de masas tuvo un método de adquisición de datos de Full Scan, el rango de masas fue de 35 a 600 m/z, la temperatura de la fuente del cuádruplo fue de 150° C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230° C y el impacto electrónico fue de 70 eV.

El estudio por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a diodos (HPLC-DAD). Se utilizó una columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de película de 5 µm, el extracto metanólico se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25:25:50), la fracción activa fue una mezcla de MeOH-acetonitrilo-H₂PO₄-H₂O (25:25:0.1:50) con un flujo de 1 mL/min. La longitud de onda fue de 260nm y se realizó un barrido completo de 200 a 400nm.

Por último, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a una Espectrometría de Masas (HPLC-MS), donde se utilizó una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150 x 2.1 mm) (Phenomenex) y una fase móvil en gradiente de dos líneas (A y B), donde A= Agua grado HPLC 89% (135 ml), Acetonitrilo 10% (15 ml) y ácido fórmico 1% (1.7 ml) ; y B= Metanol 89% (135 ml), Acetonitrilo 10% (15 ml) y ácido fórmico 1% (1.7 ml). Se inyectaron 700 µl de muestra. cromatograma se comparó con los estándares.

d) Evaluación de la actividad mutagénica (Prueba de Ames)

Del extracto obtenido de los 127.5 g de la moringa en polvo y los 35.6 g de peso seco de hoja de *Moringa oleifera* cultivada en invernadero se realizaron diluciones para la evaluación de la actividad mutagénica.

Cepas empleadas para la prueba de actividad mutagénica

Las cepas utilizadas de *Salmonella typhimurium* están construidas por ingeniería genética y son capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases del ADN (Sandoval, 2008).

Se prepararon cultivos en fase estacionaria de 16 hr de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 y TA 102 en caldo nutritivo Oxoid-No. 2 en baño maría con agitación a 90 rpm, a 37 °C.

Ensayo de actividad mutagénica

La evaluación mutagénica se realizó conforme lo descrito en Maron y Ames, 1983; Se utilizaron 100 µL de cada cepa de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 y TA102) se expusieron a 10 µL de cada una de las concentraciones (200, 160, 80, 40 y 20 µg) de cada extracto/placa, a un control positivo indicado para cada cepa: Ácido Picrolónico (AP) (10 µl/placa), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)

(10 μ l/placa), Mitomicina C (Mit C) (10 μ l/placa) respectivamente y como control negativo se utilizó el disolvente dimetil-sulfoxido (DMSO), (10 μ l/ placa). Los ensayos se realizaron mezclando el contenido en un tubo con agar suave y requerimientos mínimos de histidina-biotina, sirviendo éste como vehículo, con ayuda de un vórtex se homogenizó y posteriormente se vació el contenido en placas de medio Vogel-Bonner que se incubaron durante 48 h a 37 °C. Las colonias revertantes de histidina (His⁺) se contaron con un contador de colonias Fisher. Los estudios se realizaron por triplicado en tres estudios independientes.

RESULTADOS

1. Obtención de los extractos

El material vegetal se mantuvo en maceración por 72 horas con metanol (MeOH), como se muestra en la figura 6. Se destiló a presión reducida con rotavapor y el extracto fue vaciado en platos para la evaporación total de metanol (figura 7a) para después almacenarlos en frascos de vidrio (figura 7b).



Figura 6. Moringa en polvo comercial (MOP) y moringa cultivada en Invernadero (MOI) en maceración con MeOH para la obtención de los extractos puros.

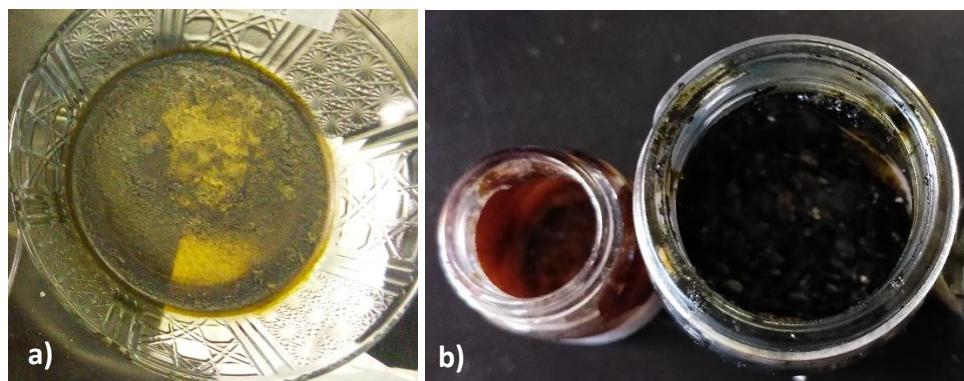


Figura 7. a) Extracto vaceado en un plato de cristal para la evaporación total del solvente, b) Extractos puros después del proceso total de evaporación del solvente.

2. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos se observa en el cuadro 1. El extracto de la planta cultivada en invernadero (MOI) tuvo un mayor rendimiento a comparación con el extracto del polvo comercial (MOP).

El rendimiento de los extractos fue dado con relación al peso seco del material vegetal y el peso final del extracto obteniendo 16.9% para la moringa en Polvo y 22.14% de la moringa cultivada en invernadero (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos metanólicos de *M. oleifera* de diferentes procedencias.

Extracto	Peso (g)	%
MeOH (Polvo)	21.65	16.9
MeOH (Invernadero)	7.8	22.14









Porcentaje calculado con base al polvo de *M. oleifera* comercial (127.5 g) y *M. oleifera* cultivada en invernadero (35.6 g)

El peso del material vegetal que se utilizó para obtener los extractos fue diferente debido a que el tiempo en que se cultivaron los árboles fue poco y no alcanzaron el peso de la moringa comercial, sin embargo, el rendimiento de los extractos se obtuvo de acuerdo con el peso seco del material vegetal respectivamente.

3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios.

En cuanto a las pruebas cualitativas se observaron cambios en el viraje de las muestras. Para la prueba de Fenoles se muestra un cambio a color azul en ambas muestras, lo que nos confirma la presencia de fenoles. Para la prueba de flavonoides se observa de igual manera el mismo color original pero más opaco, afirmándonos la presencia de estos; y finalmente, en la prueba de alcaloides se observa una ligera precipitación color gris en el fondo del tubo lo que nos indica la presencia de dichos metabolitos secundarios. Esto lo observamos en MOP y MOI.

Cuadro 2. Pruebas colorimétricas para la determinación de metabolitos secundarios de Fenoles (Cloruro férrico), Flavonoides (Cloruro de aluminio) y Alcaloides (reactivo Meyer).

Extracto MeOH	Fenoles	Flavonoides	Alcaloides
Moringa en Polvo 			
Moringa de Invernadero 			

4. Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas cualitativas se hicieron las pruebas para cuantificar los metabolitos secundarios.

Cuantificación de Fenoles Totales.

Para la cuantificación de Fenoles totales se realizó una curva patrón de ácido gálico (figura 8) y a partir de ésta se obtuvieron las concentraciones de Fenoles en ambas muestras de moringa por medio de extrapolación.

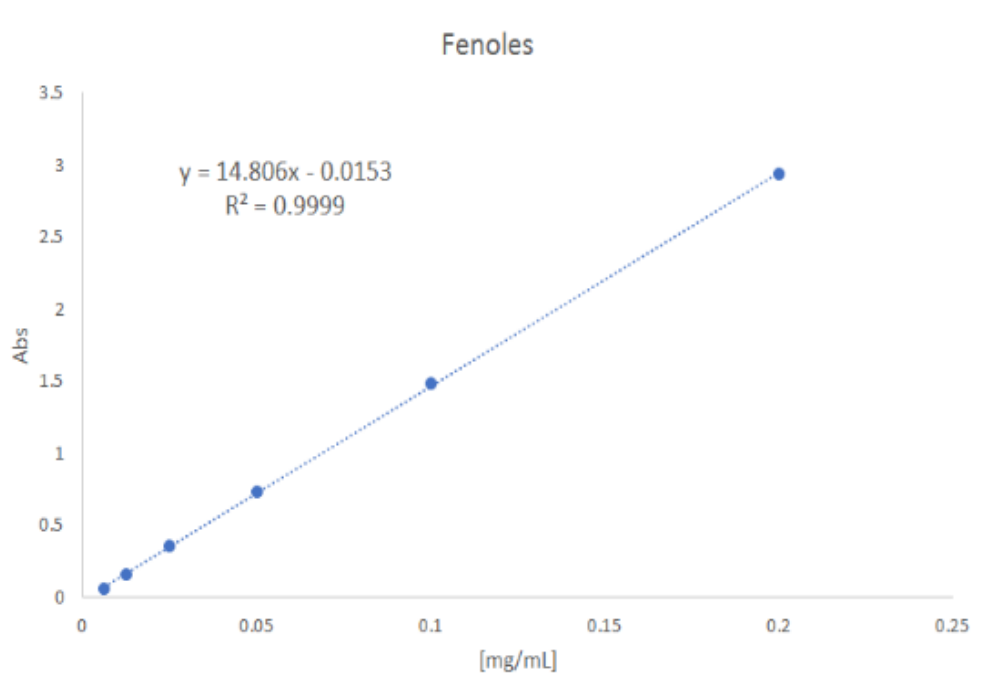


Figura 8. Curva patrón de ácido gálico con concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0,0125, 0.050, 0.100, 0.200 mg/mL).

Cuadro 3. Concentración de Fenoles Totales y su porcentaje.

Extracto MeOH	mg eAG/g	%
<i>M. oleifera</i> en polvo	288.2	28.8
<i>M. oleifera</i> de Invernadero	34.4	3.4

El extracto que obtuvo una mayor concentración de fenoles fue el obtenido de MOP con 288.2 mg eAG/g de muestra.

Cuantificación de Flavonoides Totales.

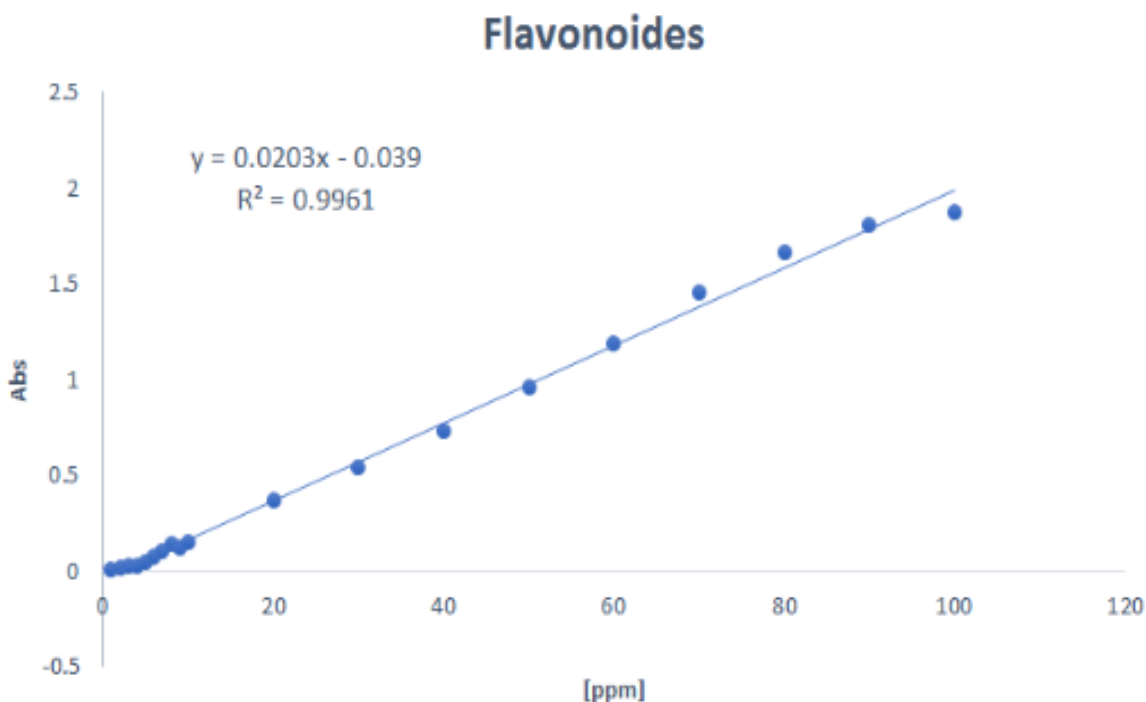


Figura 9. Curva patrón de Quercetina con concentraciones de 0 a 100 ppm.

Cuadro 4. Concentración de Flavonoides Totales y su porcentaje.

Extracto MeOH	mg eQ/g	%
<i>M. oleifera</i> en polvo	12.47	1.24
<i>M. oleifera</i> de Invernadero	2.94	0.29

Observamos una mayor concentración de flavonoides en el extracto de MOP con 12.47 mg eQ/g de muestra.

Los flavonoides se encuentran dentro de la familia de los fenoles, por lo que en el caso del polvo comercial de los 288.2 mg eAG/g 12.47 mg eQ/g (1.24%) son flavonoides, mientras que en la planta cultivada en invernadero se obtuvo 34.4mg eAG/g de los cuales 2.94mg eQ/g (0.29%) fueron flavonoides.

Cuantificación de Alcaloides Totales.

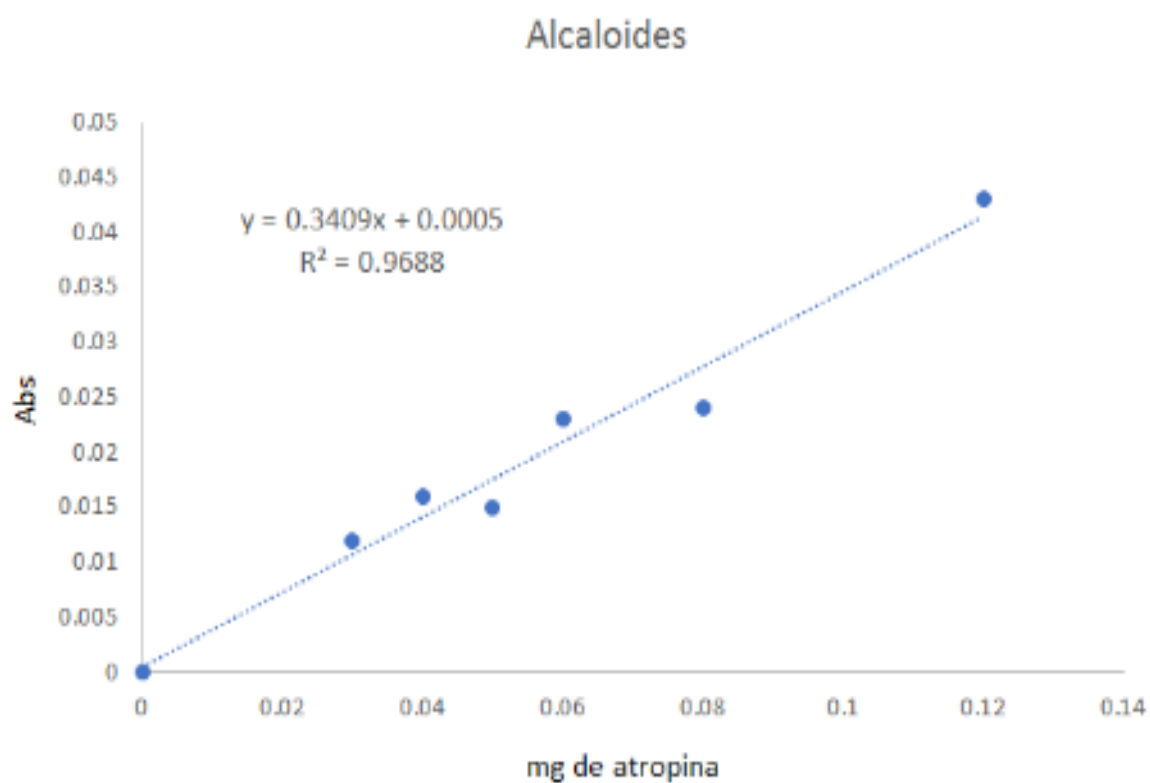


Figura 10. Curva patrón de Atropina con concentraciones seriadas de 0.02 a 0.1 mg de atropina.

Cuadro 5. Concentración de Alcaloides Totales y su porcentaje.

Extracto MeOH	mg eA/g	%
<i>M. oleifera</i> en polvo	3.7	0.37
<i>M. oleifera</i> de Invernadero	11.25	1.25

Como se observa en el cuadro 5, el extracto MOI obtuvo una mayor concentración de alcaloides con 11.25 mg eA/g de muestra.

Capacidad Antioxidante

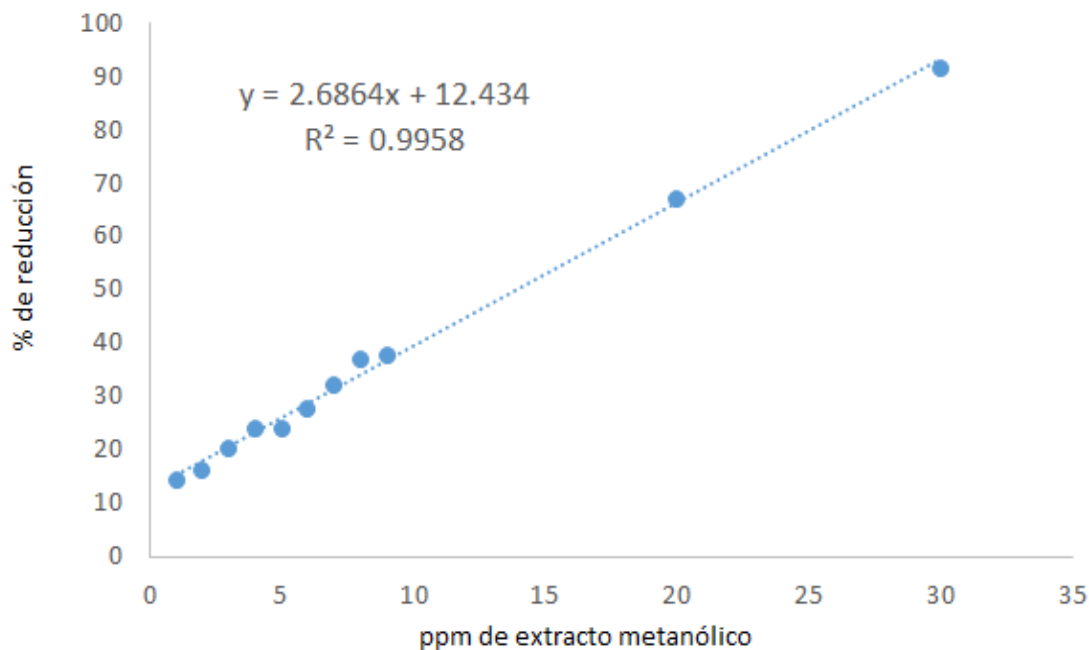


Figura 11. Prueba de la actividad antioxidante media de los extractos, como patrón se utilizó la quercetina cuya CA_{50} es de 4.8 ppm.

Cuadro 6. Partes por millón de ambos extractos necesarias para una reducción del 50% del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

Extracto MeOH	CA_{50}
<i>M. oleifera</i> en polvo	13.98 ppm
<i>M. oleifera</i> de Invernadero	73.47 ppm

Se observa una buena Capacidad Antioxidante para ambos extractos, en MOP observamos que con 13.98 ppm el DPPH se redujo en un 50%, mientras que en MOI se necesitó 73.47 ppm (Cuadro 6).

5. Composición química de los extractos

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Los compuestos se detectaron por el dispositivo de GC-MS de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBBIPRO) en FES Iztacala a partir de la base de datos de este.

La figura 12 y el cuadro 7 muestran los compuestos detectados por GC-MS del extracto de MOP diluido en AcEtO.

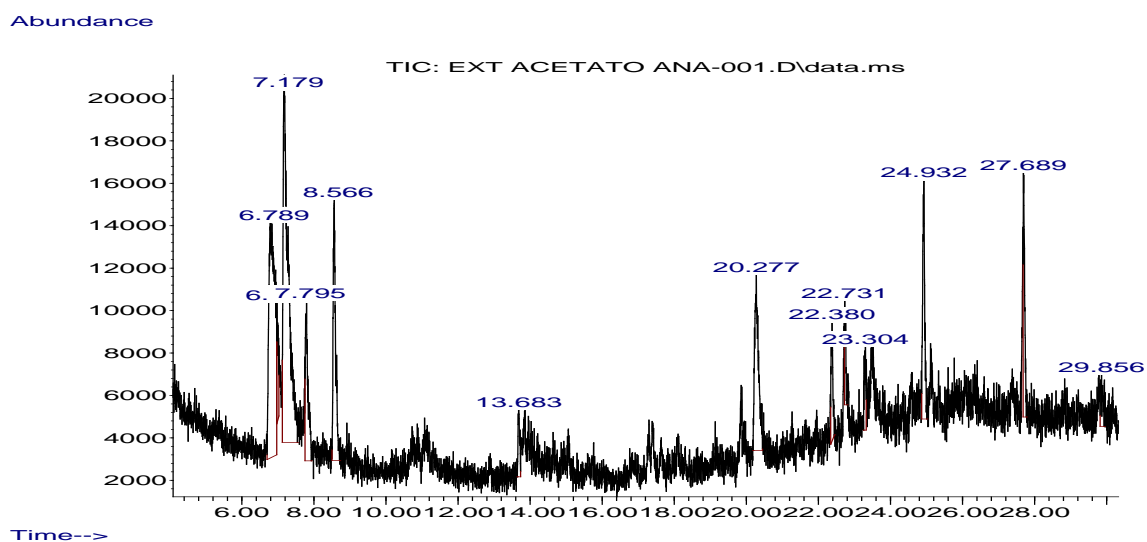
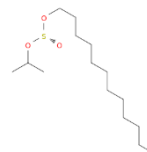


Figura 12. Cromatograma del extracto MOP (AcEtO)

Cuadro 7. Compuestos detectados del extracto MOP en AcEtO en GC-MS

TR (min)	Nombre	Fórmula
7.178	1-Dodecanamina N,N-dimetil-3-(N,N-dimetilaurylammonio)propanesulfonato	

27.689 Ácido sulfuroso, dodecyl 2-propilester



El cuadro 7 muestra los compuestos detectados del extracto MOP los cuales se identificaron por su espectro de masas registrando su fórmula química.

En la figura 13 y el cuadro 8 observamos los compuestos detectados en el extracto MOI en MeOH por GC-MS.

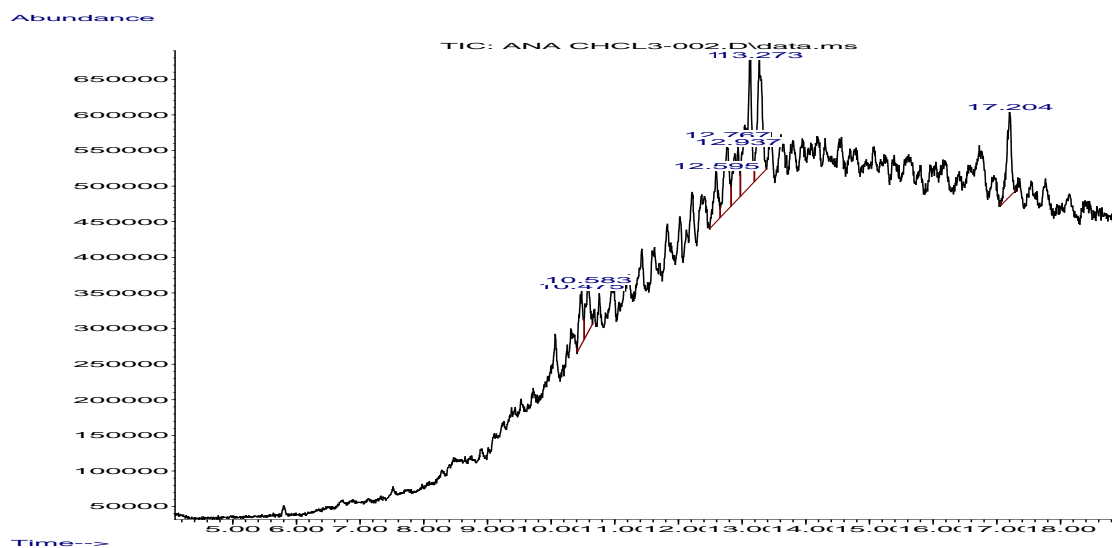


Figura 13. Cromatograma del extracto MOI diluido en MeOH.

Los compuestos detectados en el extracto MOI diluido en MeOH se presentan en el cuadro 8, donde se observan 4 compuestos detectados a partir de su espectro de masas. Cada compuesto se registró con su porcentaje de abundancia y su fórmula química.

Cuadro 8. Compuestos detectados del extracto MOI diluido en MeOH en la GC-MS.

TR (min)	Nombre	Fórmula
10.474	Octadecano	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
10.585	Eicosano	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
12.597	Pyridina-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N=C2C=CC=CN2</chem>
12.768	1-Hexacoseno	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC=C</chem>

La figura 14 muestra el cromatograma del extracto MOI diluido en hexano en donde por el tiempo de retención, se encontró un compuesto (cuadro 9) con una abundancia de 58.65 % y un tiempo de retención de 11.27.

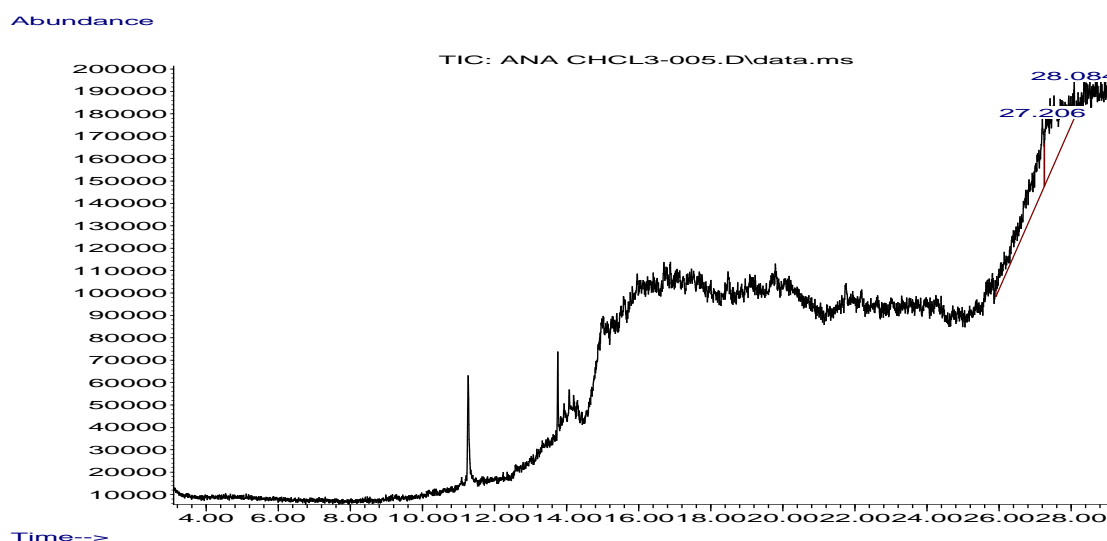
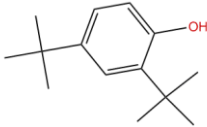
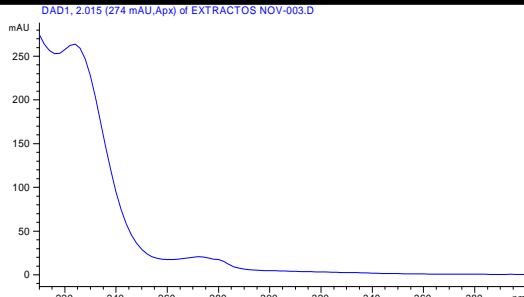
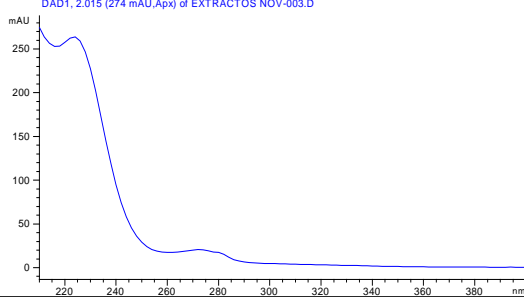
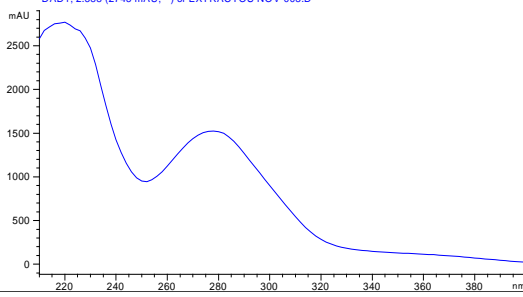


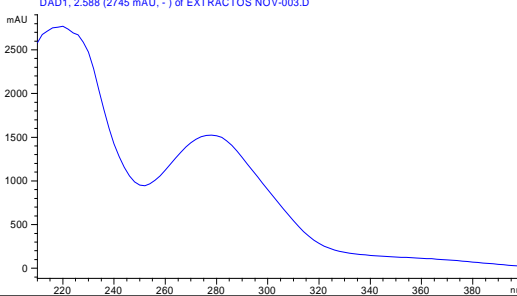
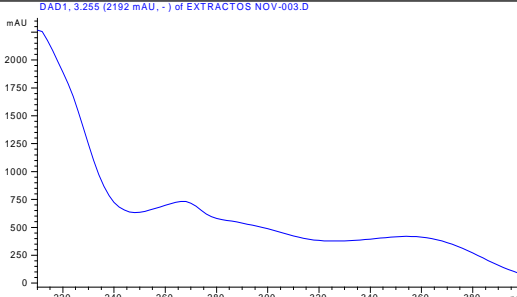
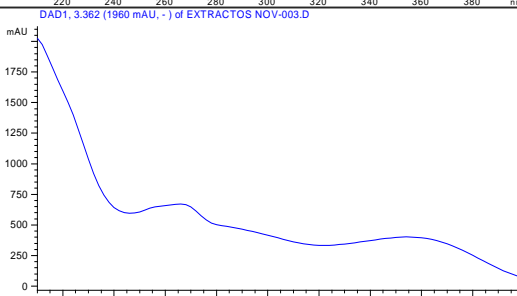
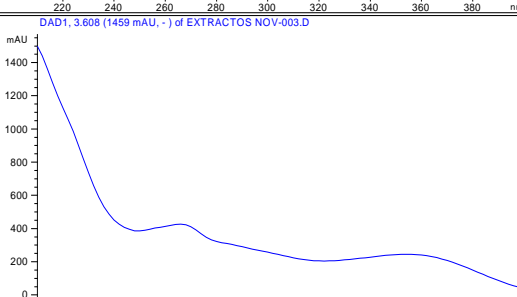
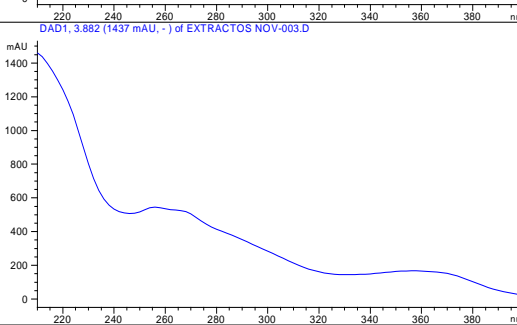
Figura 14. Cromatograma del extracto MOI diluido en hexano.

Cuadro 9. Compuestos detectados del extracto MOI diluido en hexano en GC-MS.

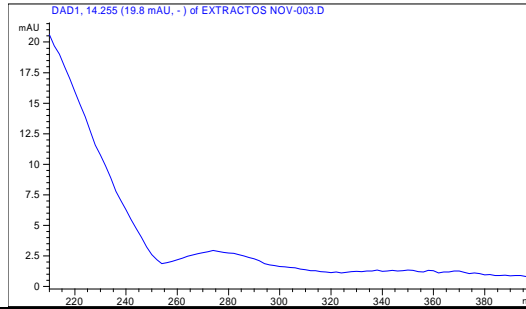
TR (Min)	Nombre	Fórmula	Abundancia %
11.273	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)		58.658

Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos

TR (Min)	Lambda max (nm)	Espectro UV	Tipo de compuesto
2.015	224, 274		Fenol Simple
2.355	220, 276		Fenol Simple
2.588	228, 278		Fenol Simple

3.002	219, 274, 362	 <p>DAD1, 2.588 (2745 mAU, -) of EXTRACTOS NOV-003.D</p> <p>The plot shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 2500) versus wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The curve has a primary peak at approximately 219 nm (mAU ~2600) and a secondary peak at approximately 274 nm (mAU ~1500).</p>	Fenol simple
3.255	266, 356	 <p>DAD1, 3.255 (2192 mAU, -) of EXTRACTOS NOV-003.D</p> <p>The plot shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 2000) versus wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The curve shows a peak at approximately 266 nm (mAU ~1800) and a secondary peak at approximately 356 nm (mAU ~400).</p>	Fenol simple
3.362	268, 356	 <p>DAD1, 3.362 (1990 mAU, -) of EXTRACTOS NOV-003.D</p> <p>The plot shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 1750) versus wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The curve shows a peak at approximately 268 nm (mAU ~1700) and a secondary peak at approximately 356 nm (mAU ~400).</p>	Fenol simple
3.608	268, 356	 <p>DAD1, 3.608 (1459 mAU, -) of EXTRACTOS NOV-003.D</p> <p>The plot shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 1400) versus wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The curve shows a peak at approximately 268 nm (mAU ~1400) and a secondary peak at approximately 356 nm (mAU ~250).</p>	Fenol simple
3.882	2656, 360	 <p>DAD1, 3.882 (1437 mAU, -) of EXTRACTOS NOV-003.D</p> <p>The plot shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 1400) versus wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The curve shows a peak at approximately 265 nm (mAU ~1400) and a secondary peak at approximately 360 nm (mAU ~150).</p>	Flavanol

14.255 276



Fenol simple

Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas. (HPLC-MS)

La figura 15 muestra el cromatograma del extracto MOP, el cual mostró contener ácido clorogénico al compararse con los picos del compuesto puro.

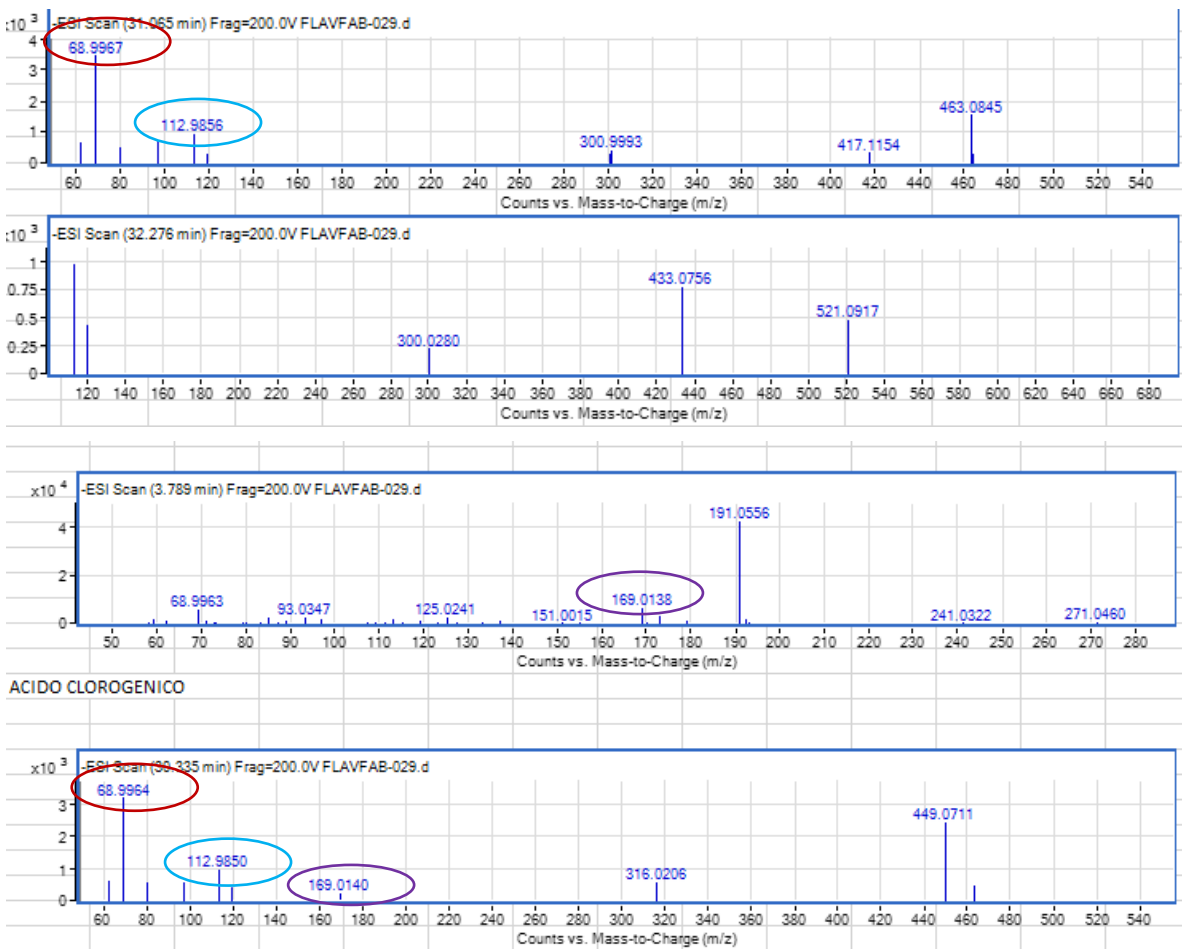


Figura 15. Cromatograma de MOP, donde se muestran los picos del extracto y los picos del ácido clorogénico como compuesto puro.

La figura 16 nos muestra el cromatograma del extracto MOI donde se encontraron dos compuestos, el Ácido clorogénico y la Luteolina.

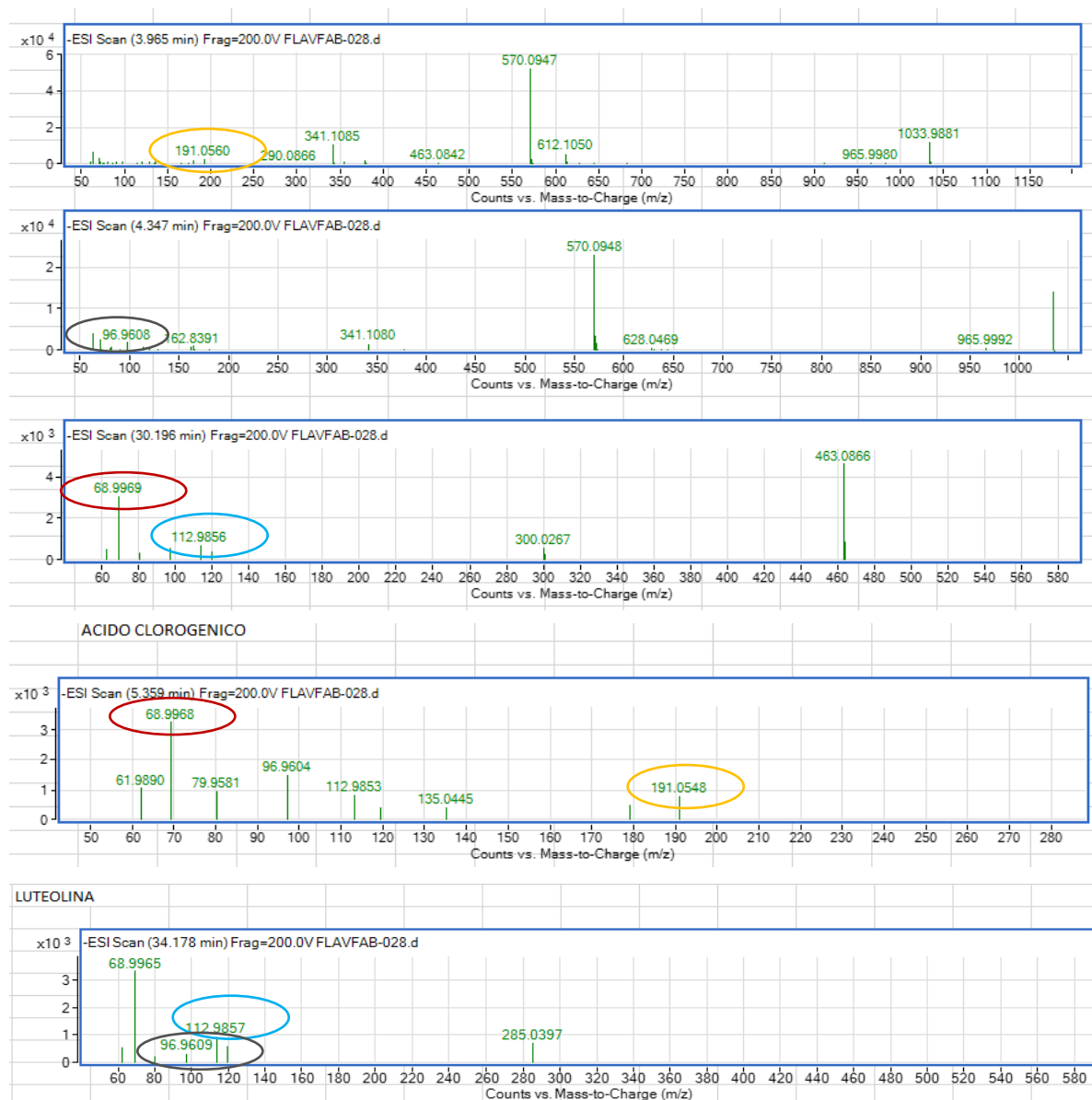


Figura 16. Cromatograma del extracto MOI, donde se muestran los picos del extracto comparados con los picos del ácido clorogénico y la luteolina como compuestos puros.

6. Evaluación de la Actividad Mutagénica por Prueba de Ames

Ambos extractos de Moringa fueron negativos para el ensayo de Ames con las cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 y TA102, puesto que el número de colonias revertantes de Histidina (His+) no superaron doble o más, de la reversión espontánea como se explica más adelante.

Cepa TA 98

En la figura 17 se presentan los resultados de la cepa TA98, donde las revertantes de His+ dieron un promedio total de 35.88, muy cercano al número dado por el disolvente o blanco (DMSO), que fue un promedio de 36.55.

El mutágeno utilizado para la TA98 fue Ácido Picrolónico, el cual nos dio un total de colonias revertantes de His+ de 141 para la concentración de 5 μg y de 253 para la concentración de 10 μg .

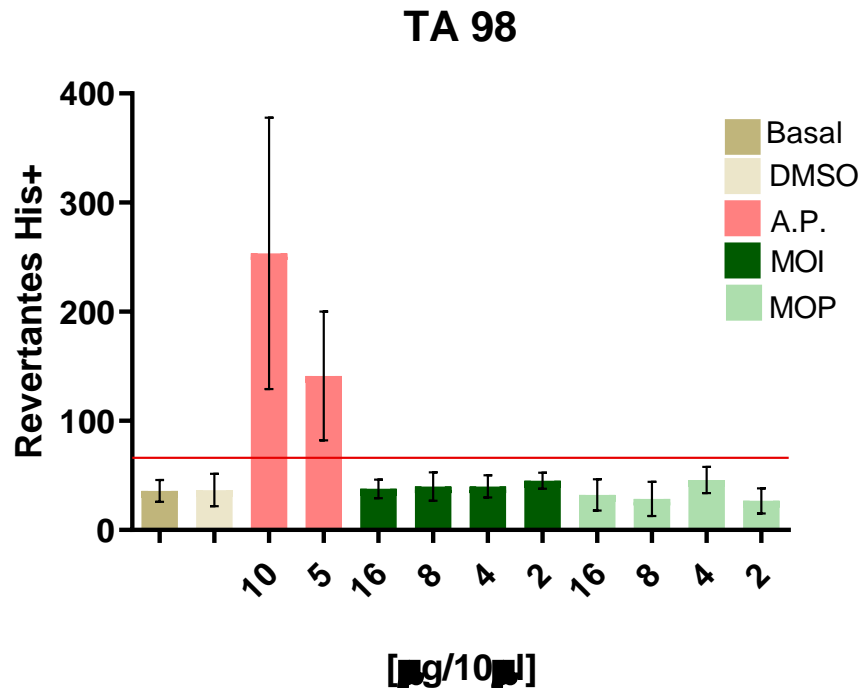


Figura 17. Número de colonias revertantes de His+ por concentración de extracto, R.E. 66+-, DMSO (blanco) y mutágeno AP (Ácido Picrolónico).

Respecto a las concentraciones de los dos extractos de *Moringa oleifera*, las colonias revertantes de His+ dieron un promedio general de 40 y ninguno rebasó el punto de corte de 66 colonias revertantes de His+ dadas por el grupo basal o la reversión espontánea por lo que no se considera mutagénico para esta cepa.

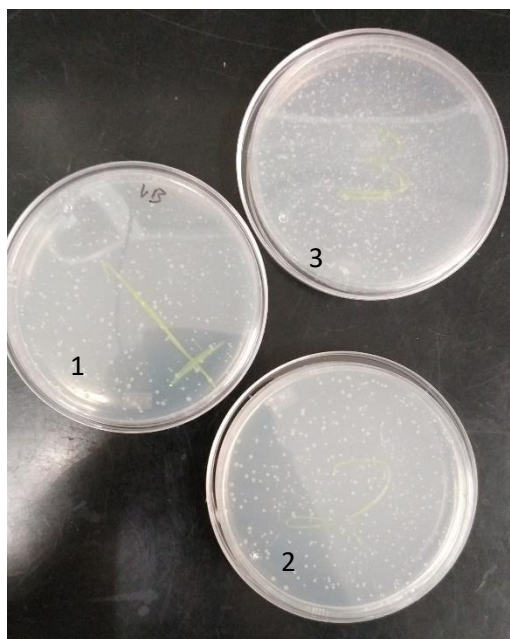


Figura 18. Colonias revertantes de Histidina (His+/-) en el grupo basal o reversión espontánea (1), el grupo con DMSO (2) y en presencia del mutágeno AP [10 μ g] (3) en la cepa TA 98.

Cepa TA 100

Por otro lado, en la figura 19 se muestran los resultados de la cepa TA100, donde las colonias revertantes de His+ en la reversión espontánea dieron un promedio total de 233.4, mientras que para el disolvente o blanco (DMSO), se obtuvo un promedio de 252.6.

El mutágeno utilizado fue la metilnitronitrosoguanidina (MNNG), el cual dio una cuenta de revertantes de 1962.6 para la concentración de 5 μ g. El extracto MOI a una concentración de 8 μ g mostró 267.6 colonias revertantes de His+, siendo el extracto con el número mayor de revertantes.

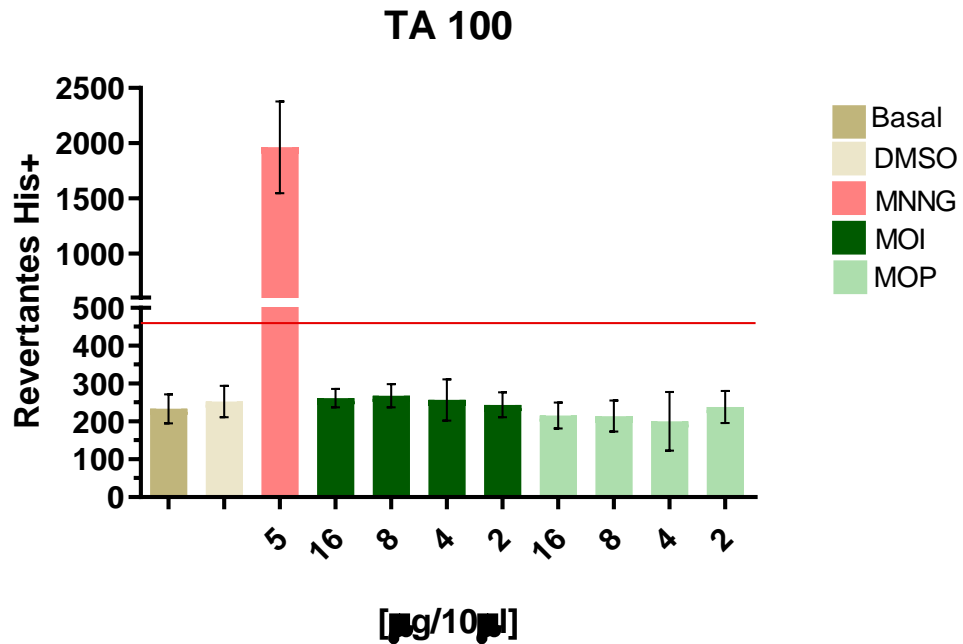


Figura 19. Número de colonias revertantes de Histidina+ por concentración de extracto, R.E. 466+-, DMSO (blanco) y mutágeno MNNG (metil nitroso guanidina).

El número de corte fue de 466 colonias revertantes de His+, por lo que ningún extracto a ninguna concentración se considera mutagénico para la cepa TA100.

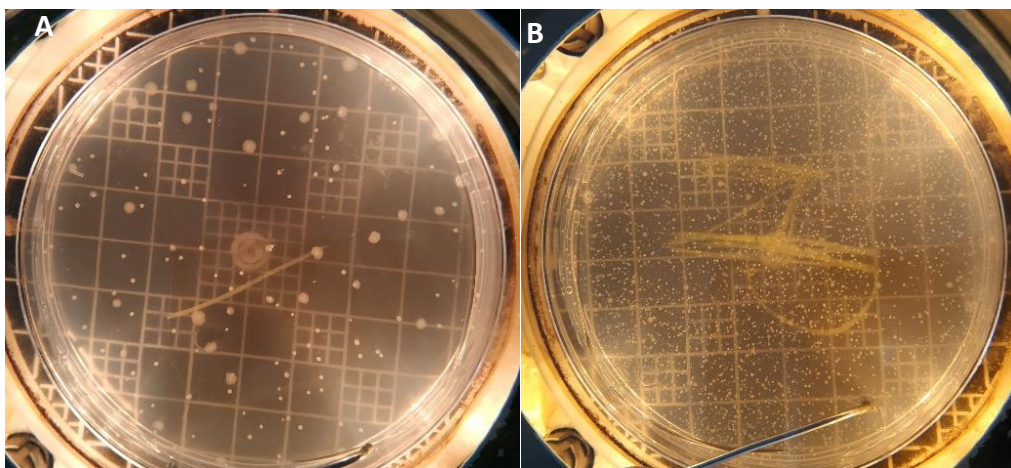


Figura 20. Colonias revertantes de Histidina (His+/-) en el grupo basal o reversión espontanea (A) y en presencia del mutágeno MNNG [5µg] (B) en la cepa TA 100.

Cepa TA 102

En la Figura 21 se muestran los resultados de la cepa TA 102. Las colonias revertantes de His+ en la reversión espontanea dieron en promedio un total de 517.66, valor cercano a 431.33 colonias revertantes de His+ dado por el disolvente (DMSO).

El mutágeno utilizado para esta dicha cepa fue la Mitomicina C (MMC), el cual dio un promedio total de colonias revertantes de His+ de 2166.55 para la concentración de 5µg y de 2573.33 para la concentración de 10µg.

En tanto, de los extractos probados, la concentración a la cual se obtuvo un mayor número de colonias revertantes de His+ fue en la concentración de 16 µg para ambos extractos

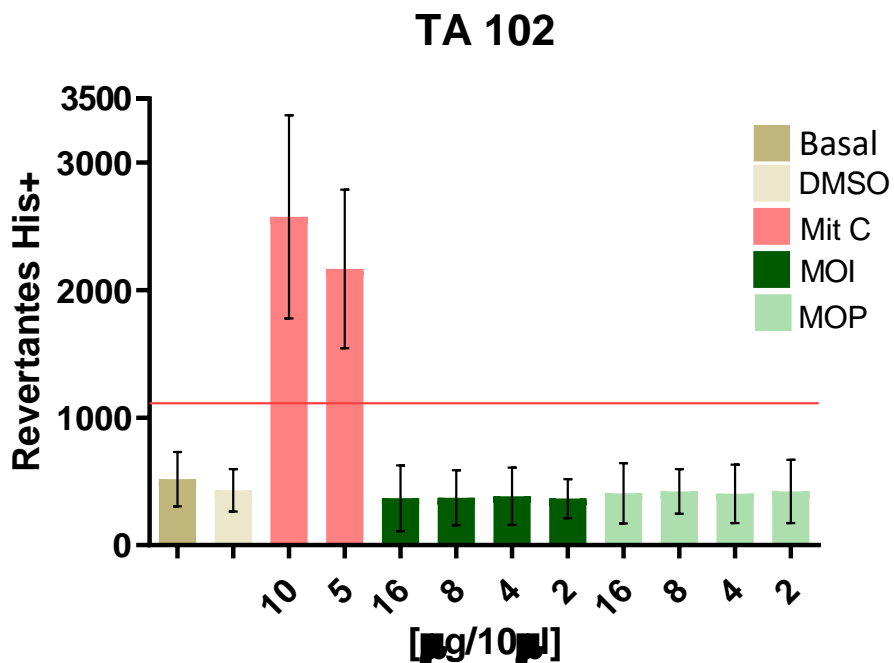


Figura 21. Número de colonias revertantes de Histidina+ por concentración de extracto, R.E. 1113+-, DMSO (blanco) y mutágeno MitC (Mitomicina C).

El extracto MOP obtuvo un promedio de 422.11 colonias, mientras que extracto MOI tuvo un promedio de 467.71 colonias. Esto, de igual manera, nos indica que ninguno

de los dos extractos es mutagénico para esta cepa ya que el punto de corte fue de 1113 colonias revertantes de His+.

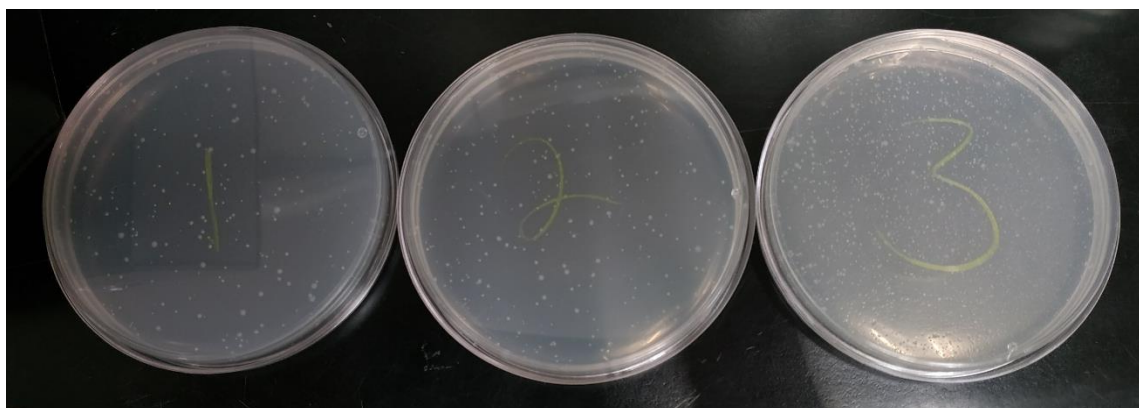


Figura 22. Colonias revertantes de Histidina (His+/-) en 1: Grupo Basal, 2: DMSO (blanco) y 3: mutágeno MitC [10 µg].

El cuadro 10 nos muestra el número promedio de colonias revertantes de His+ en cada cepa comparada con el número promedio de colonias revertantes de His+ del grupo control (C-) para obtener el IF el cual, si da un resultado mayor a dos, nos dice que los extractos son mutágenos.

Cuadro 10. Promedios de las colonias revertantes de His+ en *S. typhimurium* dados por los extractos MOI y MOP a concentraciones de 16 a 2 µg.

	TA 98		TA 100		TA 102	
[µg/µL]	IF	His+	IF	His+	IF	His+
C-	1	35.8	1	233.4	1	517.6
C+	7.07821229	253.4	8.40874036	1962.6	4.97159969	2573.3
MOI16	1.05307263	37.7	1.12039417	261.5	0.71039413	367.7
MOI8	1.10893855	39.7	1.14652956	267.6	0.7187017	372
MOI4	1.11173184	39.8	1.09982862	256.7	0.74034003	383.2
MOI2	1.26256983	45.2	1.04584404	244.1	0.70440495	364.6
MOP16	0.89664804	32.1	0.92416452	215.7	0.78593509	406.8
MOP8	0.79608939	28.5	0.91773779	214.2	0.81549459	422.1
MOP4	1.27653631	45.7	0.85904027	200.5	0.77801391	402.7
MOP2	0.74301676	26.6	1.0218509	238.5	0.81414219	421.4

IF (Induction Fold) = número de revertantes de His+ de las cajas problema/ número de revertantes de His+ del control negativo.

C-, control negativo; C+, control positivo.

MOI (Moringa de Invernadero)

MOP (Moringa en Polvo comercial)

DISCUSIÓN

La medicina tradicional, actualmente, ha resurgido y es reconocida como un recurso fundamental para la salud de las personas que ha sido transmitida por generaciones (Barranco y Batista, 2013). Representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de plantas medicinales que los indígenas han resguardado y tiene un valor incalculable fortaleciendo y preservando su identidad. En ocasiones, la medicina tradicional ha representado la única opción de prevención y curación de enfermedades para habitantes de algunas comunidades indígenas debido al difícil acceso al sistema de salud que los gobiernos no han podido garantizar y es por ello que se deben aumentar las actividades de investigación y desarrollo para mejorar la calidad y seguridad, así como reglamentar y controlar la publicidad de la medicina tradicional (Jiménez, 2017). La farmacognosia se encarga del estudio de la composición y los efectos de los principios activos (sustancia responsable de la acción farmacológica) y sustancias naturales de origen vegetal y animal (Villar del Fresno, 1999; Cañigüeral, et al, 2003).

Los extractos que se analizaron en este estudio se obtuvieron a partir de polvo comercial de un supermercado y de plantas cultivadas en invernadero de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, esto para comparar las maneras en que la gente suele consumir la moringa.

En un nuestro ensayo anterior se obtuvieron extractos a partir de solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etilo y metanol), donde se cuantificaron fenoles, flavonoides, alcaloides y actividad antioxidante. Los resultados con mayor potencial fueron los obtenidos con el extracto metanólico, esto debido a la polaridad de los compuestos de interés, por lo que la comparación de los ensayos y análisis en este proyecto se hicieron a partir de extractos metanólicos de la moringa en polvo comercial (MOP) y la moringa cultivada en invernadero (MOI).

En la prueba cualitativa de metabolitos secundarios se obtuvo positivo en ambos extractos a la presencia de Alcaloides (reactivo de Dragendroff), Flavonoides (método de Dowd) y fenoles (con FeCl_3), lo que corresponde a lo reportado por Das P. et al., (2020); Sharma, et al., (2011) y Linares, et al., (2018), que mencionan la

presencia de dichos metabolitos anteriormente en los extractos metanólicos de *M. oleifera*.

Gracias a los resultados obtenidos en el análisis cualitativo de metabolitos secundarios, se dio lugar a la cuantificación de estos, los cuales, se reporta tienen actividad benéfica para ciertas enfermedades en donde la moringa podría jugar un papel importante como ayudante a estos diferentes tratamientos.

En primera instancia se cuantificaron fenoles y flavonoides, los cuales son conocidos como antioxidantes naturales y pertenecen al grupo de los polifenoles. Los antioxidantes juegan un papel antagonista en el deterioro producido por los radicales libres (Valko et al., 2006). Éstos últimos son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos e inestables (Avello y Suwalsky, 2006). Los radicales libres son responsables del daño celular y se asocian a muchas patologías del ser humano incluyendo el cáncer, la diabetes, isquemia, enfermedades inflamatorias, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento (Moskovitz et al., 2002; Tomás-Barberán, 2003).

Los fenoles y flavonoides se caracterizan por tener en su estructura molecular uno o varios anillos fenólicos. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales como el crecimiento y la reproducción, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y otros estímulos (hídrico, luminoso, etc.), procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación. Son compuestos polares por lo que su extracción es generalmente con mezclas de alcoholes, con agua u otros solventes polares (Pérez, 2003; Tomás-Barberán, 2003; Hipólito, 2007; Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009; Quiñones, et al., 2012; Leone, et al., 2015a; García, et al., 2015). Los fenoles simples son compuestos que tienen dos o tres grupos hidroxilo en el anillo aromático. Además de tener propiedades antioxidantes, también son antibióticos, antiparasitarios y citotóxicos (Peñarrieta, et al., 2014).

Los flavonoides, son el subgrupo más abundante dentro de los polifenoles. Su estructura química está compuesta por dos anillos fenólicos (A y B), ligados por un anillo C de pirano heterocíclico. Poseen propiedades antiinflamatorias,

antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, apoptóticas, antitumorales, antiasmáticas, efectos vasodilatadores y actividad antioxidante. En las plantas, son los compuestos responsables del color de las flores y frutas (Pérez, 2003; Quiñones, et al. 2012; Mierziak, et al., 2014; Peñarrieta, et al., 2014).

Kumar, et al., (2017) y Kou, et al., (2018), mencionan que existe una alta concentración de estos metabolitos en extracto metanólico y etanólico, las cuales cuentan con funciones beneficiosas para la salud, como por ejemplo una buena actividad antioxidante, neuroprotectora, antidiabética, actividad cardiovascular y actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, entre otras.

El extracto con mayor concentración de fenoles y flavonoides fue el extracto MOP con 288.2 mg eAG/g y 12.47 mg eQ/g respectivamente, mientras que el extracto MOI obtuvo 34.4 mg eAG / g de Fenoles Totales y 2.94 mg eQ / g de Flavonoides Totales, esto puede atribuirse a que la moringa comercial probablemente este enriquecida con otras sustancias las cuales pudieran presentar compuestos químicos parecidos a los fenoles. Ademiluyi et al., (2018), en extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* cultivada en una plantación local en la metrópoli de Akure, Nigeria, cuantificaron metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides a partir de muestras secadas por diferentes métodos en donde la concentración de fenoles fue de 68.75 mg eAG/g para el extracto liofilizado, 59.38 mg eAG/g para el secado al aire, 50 mg eAG/g para el secado al sol y 46.88 mg eAG/g para el extracto secado al horno. De igual forma, Das et al., (2020), en extracto hidroalcohólico de hojas de *Moringa oleifera*, estimaron el contenido de fenoles totales en 23 mg eAG/g y Rocchetti, et al., (2020), en extracto metanólico de hojas de *Moringa oleifera*, cuantificaron polifenoles por clases obteniendo un total de 31.84 mg / g de equivalentes de fenoles, de los cuales el ácido gálico y el clorogénico son los ácidos fenólicos más abundantes. Waterman, et al., (2014) en extracto acuoso de hoja *Moringa oleifera*, reportó un 3.82% de polifenoles totales, de los cuales rutina, ácido clorogénico y quercetina fueron los más predominantes similar al 3.4% dado por el extracto MOI. Leone, et al., (2015b), en polvo de hoja,

reportaron un contenido de Flavonoides totales de 1.29 mg eQ/g, cercano al valor de MOI de 2.94 mg eQ/g.

La mayoría de los resultados reportados se acercan más al obtenido por el extracto MOI. Por otro lado, Cabrera-Carrión, et al., (2017), en extracto acuoso de hojas preparado a partir de 10g de polvo de hojas en 40ml de agua destilada a 95 °C, reportaron el contenido de fenoles entre valores de 7.36 y 19.27 mg eAG/g, mucho menores a los reportados en este estudio, pero la concentración de flavonoides la reportaron entre 11.83 y 34.85 mg/g, lo que es más aproximado al resultado del extracto MOI.

Esto nos indica que el extracto de MOP probablemente es enriquecido debido a su proceso de industrialización o cuenta con material vegetal de otras plantas, por lo que el uso del extracto MOI es el más seguro dado que se tiene la certeza de ser obtenido con base a hojas de nuestra planta de estudio (*M. oleifera*).

La actividad antioxidante fue determinada por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) donde se cuantificó la concentración antioxidante media (CA₅₀). El extracto MOP obtuvo una CA₅₀ de 13.98 ppm, mientras que el extracto MOI presentó una CA₅₀ de 73.47 ppm. Esto responde positivamente a las concentraciones obtenidas anteriormente en la cuantificación de fenoles y flavonoides. Sharma, et al., (2011), en polvo de vainas de *Moringa oleifera*, reportaron una fuerte actividad antioxidante evaluada por el mismo método reportando una CA₅₀ de 50.6 ppm. Xu et al., (2019), en extracto etanólico de polvo de hojas de *M. oleifera* recolectadas de una granja en Machakos, Kenia con tierra negra, mucha agua en junio y secadas al sol, reportaron una IC₅₀ de 1.87 mg/ml por el mismo ensayo.

Los flavonoides tienen un esqueleto de 15 carbonos con estructura C₆-C₃-C₆ que consta de dos anillos de benceno (A y B) unido a través de un anillo de pirano heterocíclico (C) (figura 43). Tienen una serie de grupos hidroxilo que suelen estar unidos a los anillos en las posiciones 3, 5, 7, 2, 3', 4' y 5'. (Rivas y García, 2002; Kumar y Pandey, 2013).

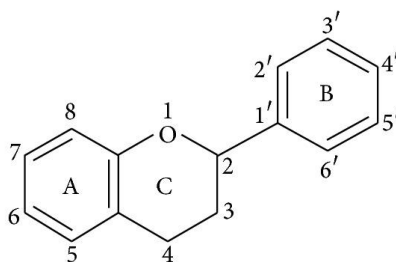


Figura 23. Estructura química de un flavonoide.

Tienen papel como agentes reductores y antioxidantes, son termodinámicamente capaces de prevenir la formación de radicales libres o actuar como captadores de éstos una vez formados (Rice-Evans, et al., 1996; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Son antioxidantes donadores de hidrogeno gracias a las propiedades reductoras de los múltiples grupos hidroxilos unidos a los anillos aromáticos y pueden deslocalizar el radical resultante dentro de su estructura (Rice-Evans., 1999). Entonces, la máxima eficacia para la eliminación de radicales requiere el grupo 3-OH unido al doble enlace 2,3 y adyacente al 4-carbonilo del anillo C. La configuración de hidroxilo del anillo B es el determinante más significativo de la captación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) mediante la donación de átomos de hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo (OH^\bullet), peroxilo (ROO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y peroxinitrito (ONOO^-) estabilizándolos (Halliwell, 1990; Guohua, et al. 1997; Kumar y Pandey, 2013).

Los criterios de efectividad para eliminación de radicales según Rice-Evans et al., son:

1. La presencia de la estructura 3',4'-*o*-dihidroxi en el anillo B, confiere mayor estabilidad al radical formado y participa en la deslocalización de electrones.
2. La existencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 7 del anillo A.
3. Los grupos 3 y 5 OH con función 4-oxo en los anillos A y C y el doble enlace entre las posiciones 2,3 son necesarios para el máximo potencial de eliminación de radicales (Rice-Evans, et al., 1996).

La conjugación entre los anillos A y B permite un efecto de resonancia del núcleo aromático que proporciona estabilidad al radical flavonoide. Debido a la oxidación en el anillo B de los flavonoides que tienen un grupo catecol, se forma un radical de o-semiquinona bastante estable y muy buen captador de radicales libres (Rice-Evans, et al., 1996; Kumar y Pandey, 2013).

Aunque la capacidad antioxidante de MOP fue mejor no podemos atribuirle tal resultado a la especie de *M. oleifera* que analizamos en este escrito, sin embargo, como producto comercial podemos decir que es un buen suplemento para contrarrestar los daños oxidativos. El extracto que más se acercó a la CA₅₀ a lo reportado anteriormente es el extracto de MOI.

Los alcaloides son compuestos orgánicos de origen natural, con al menos un átomo de nitrógeno, derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, solubles en agua, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes (Arango, 2008; Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, suelen ser muy tóxicos, sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Se cuantificaron alcaloides totales teniendo en cuenta a Paul y Didia (2012), que alimentaron con extracto metanólico de raíz a cobayos reportando una distorsión en cortes histológicos de hígado y riñones atribuidos a alguno de estos metabolitos secundarios, como la moringina y moringinina (Paul y Didia, 2012). La moringina se ha comprobado que tiene actividad como un estimulante cardíaco, broncodilatador y desestresante muscular (Kirtikal y Basu, 1975; Velázquez-Zavala et al., 2016).

El extracto MOP obtuvo 3.7 mg eA/g y MOI 11.25 mg eA/g, valor muy por encima de lo reportado por Cabrera-Carrión, et al., (2017), en extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera*, quienes determinaron, por el mismo método, una concentración de entre 0.58 y 0.77 mg eA/g. Se sabe que de forma natural las plantas secretan alcaloides como defensa contra herbívoros e insectos, por lo que la concentración

elevada de estos metabolitos puede deberse al lugar de cultivo, época del año y posibles plagas. (Coley, 1988; Cabrera-Carrión, et al., 2017; Pinto, et al., 2019).

En cuanto a los análisis de la composición química de los extractos se encontraron compuestos ya reportados. Rocchetti et al., (2020), en extracto metanólico de hojas de *Moringa oleifera* encontraron que el ácido gálico y el clorogénico son los polifenoles más abundantes, mientras que Waterman et al., (2014), en extracto acuoso de hoja de *Moringa oleifera*, encontraron que el ácido clorogénico y quercetina fueron los más predominantes. En la HPLC-MS se encontraron dos compuestos de importancia médica, la luteolina y el ácido clorogénico reportados en la *M. oleifera* por Leone, et al., (2015b), en polvo de hoja cultivada en Chad, Saharaui y Haití. La luteolina es un flavonoide presente en varias plantas que tiene propiedades antimicrobianas, tiene un uso potencial como conservante natural de alimentos (Qian, et al., 2020).

Las actividades farmacológicas observadas en plantas medicinales a menudo se relacionan con los constituyentes de los ácidos clorogénicos. El ácido clorogénico pertenece al grupo de los polifenoles biológicamente activo. Es el isómero más abundante entre los isómeros de ácido cafeoilquínico, es el éster del ácido cafeico y el ácido quínico (Morishita y Ohnishi, 2001; Upadhyay y Mohan, 2013). Presenta actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antihipertensiva, antimicrobiana, antiobesogénica y antidiabética (Chun-Wai et al., 2012; Meng et al., 2013; Upadhyay y Mohan, 2013; Santana-Gálvez et al., 2017; Naveed et al., 2018).

Por último, se evaluó la Actividad Mutagénica por el ensayo de Ames. Los ensayos de mutagénesis están de forma obligatoria en los dos niveles más bajos de pruebas toxicológicas de los tres que el Real Decreto 363/1995 menciona (regula la notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas). En el nivel básico se deben llevar a cabo ensayos que detecten mutaciones génicas en células procariontes (*Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*) (Herrero y de la Peña, 2005)

En cuanto al ensayo de Ames, las revertantes obtenidas en la cepa TA 98, para la reversión espontánea (R.E.) o grupo basal fue de 33 y ninguna concentración de

ambos extractos rebasó el punto de corte (66 Rev. His+). El mutágeno utilizado fue Ácido Picrolónico (AP). Cuyo mecanismo se da por unión covalente a los restos de bases del DNA induciendo así el desplazamiento de bases produciendo las mutaciones en el marco de lectura (Rosenkranz y Stein, 1975).

En la cepa TA 100 la R.E. fue de 233 Rev. His+, el punto de corte obtenido fue de 466 Rev. His+ y ningún extracto rebaso dicho punto de corte. El mutágeno utilizado fue Metil nitroso guanidina (MNNG). Su efecto mutagénico se debe a la metilación de ácidos nucleicos, transfiriendo el grupo metilo como unidad intacta (Haerlin, et al., 1970).

Por último, la cepa TA 102 tuvo una R.E. de 517 Rev. His+ y un punto de corte de 1113 Rev. His+. Ninguno de los extractos a las diferentes concentraciones probadas mostró ser mutagénico. El mutágeno utilizado como control positivo fue Mitomicina C (MitC), el cual se ha demostrado su efecto mutagénico en la fase S de células vegetales (Dubinina y Kurashova, 1986).

Ashraf, et al., (2018), del extracto etanólico de hoja de *M. oleifera* a concentraciones seriadas de 200 a 0.02 µg/ml, mostró ser seguro para el consumo, puesto que en las cepas TA98 y TA100 no se observó actividad mutagénica.

Rolim et al., (2011), en extracto acuoso de polvo de semilla de *M. oleifera*, hicieron el mismo ensayo en las cepas TA 97, TA 98, TA 100 y Ro TA 102 con extracto de semilla a concentraciones de 0.2 a 1.5 µg/µL, donde las concentraciones de 0.6 a 1.5 µg/µL fueron mutagénicas para las cepas TA 100 y TA 102 al tener un IF mayor a 2. Grabow, et al., (1985), en polvo de semillas de *M. oleifera*, reportaron que concentraciones seriadas de hasta 1 000 mg/L de polvo de cotiledón de semilla no son mutagénicas para este ensayo.

En este trabajo se comparó el perfil fitoquímico entre la planta de moringa y el polvo comercial de moringa. Este último fue importante analizar puesto que la gente suele comprar en los supermercados el producto como suplemento a tratamientos contra enfermedades como diabetes o hipertensión. Así entonces, observamos que la concentración de metabolitos cambia en gran medida por el lugar y la manera de

cultivo de *M. oleifera*, pues al comparar el polvo comercial y los árboles de invernadero la concentración de metabolitos no coincide.

De igual manera, la prueba de toxicidad de Ames no había sido reportada en extracto metanólico de hoja en las cepas TA98, TA100 y TA102, siendo que éste extracto es el que más ha sido reportado en pruebas con animales y estudios fitoquímicos.

CONCLUSIONES

- El extracto de MOP fue el que obtuvo un mayor rendimiento con un 16.9 %.
- Ambos extractos dieron positivo a las pruebas cualitativas de metabolitos secundarios, siendo el extracto de MOP el que mayores concentraciones obtuvo para fenoles y flavonoides, mientras que para alcaloides MOI obtuvo mayor concentración.
- Ambos extractos presentaron una buena capacidad antioxidante.
- Los compuestos detectados por GC-MS fueron diferentes para ambos extractos.
- En el análisis de HPLC-MS de ambos extractos se demostró la presencia de Luteolina y Ácido clorogénico, ambos de importancia médica.
- En la evaluación de la Actividad Mutagénica por el ensayo de Ames, ninguno de los extractos fue mutagénico para las cepas TA98, TA100 y TA102 de *S. typhimurium* a concentraciones de 160, 80, 40 y 20 μ l.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ademiluyi, A., Aladeselu, O., Oboh, G. y Boligon, A. 2018. Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory properties of Moringa (*Moringa oleifera*) leaf. Food Science y Nutrition. 6 (8): 2123-2133.

2. Ames, B. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in: Maron, D. y Ames, B. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113: 173-215.
3. Ames, B., Lee, K. y Durston, W. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proceedings of national academy of sciences. 70 (3): 782-786.
4. Arango, G. 2008. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia.
5. Ashraf, M., Shahzad, S., Rafique, S. y Altaf, I. 2018. Mutagenic potential of ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves by AMES *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Proceedings Shaikh Zayed postgraduate medical institute. 32 (2): 49-53.
6. APG, (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III, Botanical journal of the Linnean society, 161 (2): 105–121.
7. Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
8. Avello, M. y Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Universidad de Concepción. Chile, Atenea 494. 161-172.
9. Balbir, M. 2005. Trees for Life. St. Louis, Wichita. 29pp.
10. Barranco, L. y Bastida, I. 2013. Contribución social de la medicina tradicional y natural en la salud pública cubana. Humanidades Médicas. 13 (3), 713-727.
11. Barrueco, C., Guadaño A., Caballo C., Herrera, H., Valcarce, E. y de la Peña, E. 1999. Evaluación mutagénica y genotóxica de los productos químicos. 1998. En: Evaluación Mutagénica y Genotóxica, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Sociedad española de mutagénesis ambiental (SEMA). de la Peña, E., Burguete, I. y Guadaño, A. 1999. Madrid. 271-288.

12. Bonal, R., Rivera, R. y Bolívar, M. 2012. *Moringa oleifera*: una opción saludable para el bienestar. Artículo de revisión. Revista médica de Santiago de Cuba. 16 (10): 1596.
13. Cabrera-Carrión, J., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cuncarrión, J., García, P. y Rojas, L. 2017. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam en función de su edad y altura. Bioagro. 29 (1): 53-60.
14. Canett-Romero, R., Arvayo-Mata, K. y Ruvalcaba-Garfias, V. 2014. Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleifera* y sus posibles daños. Revista de Ciencias biológicas y de la salud. Universidad de Sonora. 16 (2): 36-43.
15. Cañigueral, S., Dellacassa, E. y Bandoni, A. 2003. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? Acta farmacéutica bonaerense. 22 (3): 265-279.
16. Chelliah, R., Ramakrishnan, S. y Antony, U. 2017. Nutritional quality of *Moringa oleifera* for its bioactivity and antibacterial properties. International food research journal. 24 (2): 825-833.
17. Chun-Wai, W., Candy, W., Wing-Kwan, P., Marcus, W., Ching-Yee, K., Robbie, Y., Peter, Y. y Shun-Wan, C. 2012. Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypocholesterolemic rats induced with high-cholesterol diet. Phytotherapy research. 27 (4): 545-551.
18. Coley, P. 1988. Effects of plant growth rate and leaf time on the amount and type of antiherbivore defense. Oecologia. 74 (4): 531-536.
19. Das, P., Abu-Yousef, I., Majdalawieh, A., Narasimhan, S. y Poltronieri, P. 2020. Green synthesis of encapsulated copper nanoparticles using a hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* Leaves and assessment of their antioxidant and antimicrobial activities. Molecules. 25 (3), 555.
20. Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, México. 281pp.

21. Dubinina, L. y Kurashova, Z. 1986. [Mitomycin C-induced mutagenesis]. *Genetika*. 22 (10) 2444-2451.
22. Farmacopea Argentina. 2013. 7° ed. Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica. (4)
23. Freiburger, C., Vanderjagt, D., Pastuszyn, A., Glew, R., Mounkaila, G., Millson, M. y Glew, R. 1998. Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from. *Plant Foods for Human Nutrition*. 53 (1): 57-69.
24. Foidl, N., Mayorga, L., Vásquez, W. 1999. Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado. En *Agroforestería para la alimentación animal en Latinoamérica*. Estudio FAO: Producción y sanidad animal. Nicaragua. 143:341.
25. Foidl, N., Makkar, H., Becker, K. 2001. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. What development potential for Moringa products? Dar es Salaam, Tanzania.
26. Folkard, G. y Sutherland, J. 1996. *Moringa oleifera* un árbol con enormes potencialidades. *Agroforestería en las Américas*. 8 (3): 5-8
27. García, J. y Suárez, M. 2003. *Tacuinum sanitatis*. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78 (2), 123-125.
28. García, M. 2003. Producción de semillas forestales de especies forrajeras enfatizados en sistemas silvopastoriles. INAFOR. En *características y potencialidades de Moringa oleifera*, Lam. Una alternativa para la alimentación animal. Pérez, A. Sánchez, T., Armengol, N. y Reyes, F. 2010. *Pastos y Forrajes*. 33 (4).
29. García, E., Fernández, I. y Fuentes, A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universitat Politècnica de València, Departamento de Tecnología de Alimentos. Valencia, España.
30. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Ohta t., Venitt, S., et al. 1994. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays.

- Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 312 (3): 217-233.
31. Geilfus, F. 1994. El árbol al servicio del agricultor: manual de agroforestería para el desarrollo rural. Vol 2. Centro agrónomo tropical de investigación y enseñanza, (CATIE). Costa Rica.
 32. Grabow, W., Slabbert, J., Morgan, W. y Jahn S. 1985. Toxicity and mutagenicity evaluation of water coagulated with *Moringa oleifera* seed preparations using fish, protozoan, bacterial, coliphage, enzyme and Ames *Salmonella* assays. Water SA. 11 (1): 9-14.
 33. Guohua, C., Emin, S., Ronald, L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine. 22 (5): 749-760.
 34. Haerlin, R., Süßmuth, R. y Lingens, F. 1970. Mechanism of Mutagenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG) V. Methylation of DNA by N-trideuteriomethyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine (D₃-MNNG). FEBS Letters, 9 (3), 175-176.
 35. Halliwell, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Radical Research Communications. 9 (1): 1-32.
 36. Herrero, O. y de la Peña, E. 2005. Evaluación de mutagenicidad y genotoxicidad. Centro de Ciencias Medioambientales, laboratorio de genotoxicología y mutagénesis ambiental. Madrid, España.
 37. Hipólito, J. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. Scientia et Technuca Año XIII. 33. 13-18
 38. Hubrecht, R. y Carter, E. 2019. The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. Animals (Basel). 9 (10): 754.
 39. Jaiswal, D., Lunar, P., Mehta, S., Chatterji, S., Shukla, S., Kumar, D., Sharma, G., Sharma B., Khair, S. Watal, G. 2013. Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress Asian Pacific. Journal of tropical medicine. 6 (6): 426-432.
 40. Jiménez, A. 2017. Medicina Tradicional. Uno Más. Comisión Nacional de Arbitraje Médico. 30-31.

41. Kirtikal, K. y Basu, B. 1975. Indian medicinal plants in potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E. y Puls, J. 2013. Pastos y Forrajes. 36 (2): 137-149.
42. Kou, X., Li, B., Olayanju, J., Drake, J. y Chen, N. 2018. Nutraceutical of pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. Nutrients. 10 (3): 343.
43. Kramer, P. 1998. Genetic toxicology. Journal of pharmacy and pharmacology. 50 (4): 395-405.
44. Kumari, J. 2010. Hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica* in type 2 Diabetes Mellitus. The Bioscan. 5 (2): 211-214.
45. Kumar, S. y Pandey, A. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal. 2013, 162750.
46. Kumar, B., Kumar, H. y Gidwani, B. 2017. Phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. Journal of pharmacopuncture. 20 (3): 194-200
47. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J. y Bertoli, S. 2015a. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An overview. Molecular Sciences. 16: 12791-12835.
48. Leone, A., Fiorillo, G., Criscuoli, F., Ravasenghi, S., Santagostinim L., Fico, G., Bertoli, S. 2015b. Nutritional characterization and phenolic profiling of *Moringa oleifera* leaves grown in Chad, Sahrawi refugee camps, and Haiti. International journal of molecular science. 16: 18923-18937.
49. Linares, E. y Bye, R. 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and Adjacent United States. Journal of Ethnopharmacology. 19 (2): 153-83.
50. Linares, C., Quiñones-Gálvez, J., Pérez, A., Carvajal, C., Rivas., M., Cid, G., Pérez, L., González, S., Capdesuñer, Y. 2018. Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. Biotecnología Vegetal. 18 (1): 47-56.

51. Lozoya, X. 1987. Medicina tradicional y atención primaria, centro de investigaciones y estudios superiores en antropología social México, cuadernos de la casa chata. 159: 83-94.
52. Malki, A., Abdulrahman, L., Haddad, A. 2015. The Antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on Streptozotocin Induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. Biological Medicine Research International. 13.
53. Maron, D. y Ames, B. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation research. 113: 173-215.
54. McCann, J., Spingarn, N., Kabori, J. y Ames, B. 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proceedings of the National Academy of Sciences. 72 (3): 979-983
55. Mendoza, I., Fernández, N., Ettiene, G. y Díaz, A. 2000. Uso de la *Moringa oleifera* en la potabilización de las aguas. Ciencia. (2) 8: 235-242.
56. Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J. y Hu, Y. 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-11.
57. Mera-Alegria, C., Gutiérrez-Salamanca, M., Montes-Rojas, C. y Paz-Concha, J. 2016. Efecto de la *Moringa oleifera* en el tratamiento de aguas residuales en el Cauca, Colombia. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. 14 (2): 100-109.
58. Mierziak, J., Kostyn, K. y Kulma, A. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. Molecules. 19: 16240-16265.
59. Mora, J. y Gacharná, N. 2015. El árbol milagroso: *Moringa oleifera*. Universidad de La Salle. Biodiversidad. Colombia.
60. Morishita, H. y Ohnishi, M. 2001. Absorption, metabolism, and biological activities of chlorogenic acids and related compounds. Studies in Natural Products Chemistry. 25: 919-953.
61. Moskovitz, J., Yim, M. y Chock, P. 2002. Free radicals and disease. Archives of Biochemistry and Biophysics. 397, (2): 354-359.

62. Mortelmans, K. y Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 455 (20): 29-60.
63. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A., Khan, G., Shumzaid, M. Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L. y XiaoHui, Z. 2018. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine y Pharmacotherapy*. 97, 67-74.
64. Ndong, M., Uehara, M., Katsumata, S. y Suzuki, K. 2007. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. (3) 40: 229–233.
65. Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer M. y Duez, P. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 112. 476-481.
66. Olson, M. 2002. Intergeneric relationships within the Caricaceae–Moringaceae clade (Brassicales), and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *International Journal of Plant Sciences* 163: 51–65.
67. Olson, M. 2010. *Flora of North America*. Committee. Universidad de Oxford, New York.
68. Olson, M., Fahey, J. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de biodiversidad*. México 82 (4).
69. Omodanisi, E. I., Aboua, Y. G., Chegou, N. N., Oguntibeju, O. O. 2017. Hepatoprotective, antihyperlipidemic, and anti-inflammatory activity of *Moringa oleifera* in diabetic-induced damage in male Wistar Rats. *Pharmacognosy Research*. 9 (2): 182–187
70. OMS. 2003a. *Medicina tradicional: Informe de la Secretaría*. 56° Asamblea Mundial de la Salud. Recuperado en: http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA56/sa5618.pdf

- 71.OMS. 2003b. Salud mundial: retos actuales. Recuperado de: <https://www.who.int/whr/2003/en/Chapter1-es.pdf?ua=1>.
- 72.OMS. 2014. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2014 – 2023. Recuperado de: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- 73.OMS. 2020. Medicina tradicional: definiciones. Recuperado de: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- 74.Paul, C. y Didia, B. 2012. The effect of methanolic extract of *Moringa oleifera* Lam roots on the histology of kidney and liver of Guinea pigs. Asian Journal of Medical Sciences, 4 (1): 55-66.
- 75.Pérez, G. 2003. Los Flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 22 (1): 48-57.
- 76.Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. y Bravo, J. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. Revista Boliviana de Química. 31 (2): 68-81.
77. Pinto, C., Torrico-Bazoberry, D., Penna, M., Cossio-Rodríguez, R., Cocroft, R., Appel, H., Niemeyer, H. 2019. Chemical responses of *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) Induced by vibrational signals of generalist herbivore. Journal of Chemical Ecology. 45 (8): 708-714.
- 78.Porrás-Loaiza, A. y López-Malo, A. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 3 (1): 121-134.
- 79.Qian, W., Liu, M., Fu, Y., Zhang, J., Liu, W., Li, J., Li, X., Li, Y. y Wang T. 2020. Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. Microbial Pathogenesis. 142: 104056
- 80.Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 27 (1): 76-89.

81. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan, P.K. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany*. 34 (3): 276-283.
82. Ramamoorthy, P. y Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Moringa citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2(1): 70-80.
83. Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo de 1995, por el que se regula la notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (BOE núm. 133, 5/6/95).
84. Rice-Evans, C., Miller, N. y Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (7): 933-956.
85. Rice-Evans, C. 1999. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. 239-253.
86. Rocchetti, G., Pagnossa, J., Blasi, F., Cossignani, L., Hilsdorf, P., Zengin, G., Montesano, D., Cocconcelli, P. y Lucini, L. 2020. Phenolic profiling and in vitro bioactivity of *Moringa oleifera* leaves as affected by different extraction solvents. *Food Research International*. 127.
87. Rolim, L., Marcêdo, M., Sisenando, H., Napoleao, T., Felzenszwalb, I., Aiub, C., Coelho, L., Medeiros, S. y Paiva, P. 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. *Food Science*. 76 (2): 53-58.
88. Rosenkranz, H. y Stein, A. 1975. Picrolonic acid: a novel frameshift mutagen. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 28 (1): 127-129.
89. Rondón, M., Fernández, E., Díaz, Y. Tabio, D., Piloto-Rodríguez, R., Rodríguez, S. 2017. Obtención de biodiésel a partir de aceites de origen vegetal, "*Moringa oleifera*". Universidad Tecnológica de La Habana José A. Echeverría, CUJAE. La Habana, Cuba.

90. Rusel, W. y Burch, R. 1959. The principles of human experimental technique. Methuen, London.UK
91. Saini, R. Sivanesan, I. y Keum, Y. 2016. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 Biotech. 6(2): 203.
92. Sandoval, A. 2008. Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurium*. Prueba de Ames. Ensayos aplicables a más de una matriz. 319-341.
93. Santamaría, F. y Balderrabano, J. 2016. Extractos de hojas de *Moringa oleifera* en la prevención y tratamiento de la diabetes mellitus. Artículo de revisión. Revista Cubana de Medicina Natural y Tradicional. 1 (2).
94. Santillán, M. 2013. Beneficios nutritivos y medicinales de la moringa. Ciencia UNAM. DGDC-UNAM
95. Santos-Buelga, C. y Scalbert, A. 2002. Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80 (7): 1094-1117.
96. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. y Verdian-rizi, M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai Journal Pharmacology Science. 32, 17-20.
97. Shanabruch, W y Walker, G. 1980 Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA⁺ lexA⁺*-dependent mutagenesis. Molecular and General Genetics MGG. 179: 289-297.
98. Sharma, V., Paliwal, R., Pracheta y Sharma, S. 2011. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. pods. Journal of Pharmacy Research. 4 (2): 554-557.
99. Singleton, V. Orthofer, R. y Lamuela-Reventós, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. (299): 152-178.

100. Sreelatha, S. y Padma, P. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64, 303.
101. Stead, A., Hasselblad, V., Creason, J. y Claxton L. 1981 Modeling the Ames test. *Mutation Research*. 85: 13-27
102. Stokes W., Schechtman, L. y Colina, R. 2002. The interagency coordinating committee on the validation of alternative methods (ICCVAM): A review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European center for the validation of alternative methods (ECVAM). *SAGE Journals*. 30 (2): 23-32.
103. Tomás-Barberán, F. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 10 (2): 41-53.
104. Upadhyay, R. y Mohan, R. 2013. An outlook on chlorogenic acids- occurrence, chemistry, technology and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53 (9): 968-984.
105. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M. y Telser, J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*. 39: 44-84.
106. Velázquez-Zavala. M., Peón-Escalante, E., Zepeda-Bautista, R. y Jiménez-Arellanes, M. 2016. *Moringa (Moringa oleifera Lam.)*: potential uses in agriculture, industry and medicine. *Revista Chapingo, serie Horticultura*. 22 (2): 95-116.
107. Vergara-Jiménez, M., Mused, M., Fernández, M. 2017. Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*. 6 (4): 91
108. Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S., Delgado-Rodríguez, A. y Amador-Muñoz, O. 1998. Mutagenicidad de las aeropartículas. *Vertientes, Revista especializada en Ciencias de la Salud, Suplemento Especial*. 1 (1): 3-14.

109. Villar del Fresno, A. 1999. Farmacognosia general. Síntesis S.A. Madrid, España.
110. Villasana, A. 2008. Ensayo de Mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurium*. Prueba de Ames. En: Ecología (ed.). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. 319-344.
111. Waterman, C., Cheng, D., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Dreifus, J., Ann, M. y Raskin, I. 2014. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*. Phytochemistry. 103, 114-122.
112. Xu, Y., Chen, G. y Guo, M. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids. Antioxidants. 8 (8): 296.