



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA**



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**INFORME FINAL**

PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**TÍTULO** : **Actividad Antioxidante “*in Vitro*” de las Hojas y Frutos de Morinda citrifolia Linn. Mediante el método de secuestro de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).**

**AUTORES** : **Bach. Giuliano Villacorta Villacorta  
Bach. Aileen Margaret Perez Valdez**

**ASESOR** : **Q.F. Frida Sosa Amay**

**IQUITOS – PERÚ**

**2011**

## RESUMEN

---

### **Actividad Antioxidante “*in Vitro*” de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn. Mediante el método de secuestro de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).**

*Villacorta Villacorta Giuliano G.; Pérez Valdez Aileen M.\**

---

La actividad antioxidante en muchas plantas es de gran importancia dado a que se pueden prevenir muchas enfermedades degenerativas como el cáncer a través de la reducción de radicales libres. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante a través de estudios de los polifenoles, DPPH; de los extractos metanólicos, acuoso y clorofórmico de las hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn. En los resultados obtenidos los Frutos de Noni fueron los que más concentración de Polifenoles totales obtuvieron con 26 434.94 mg de CTQ/100g. Las Hojas solo tuvieron 14 286.99 mg de CTQ/100g. En la determinación de vitaminas los Frutos obtuvieron 46.58 mcg de Vitamina C, 20.45 mcg de Vitamina A y 8.35 mcg de Vitamina E; mientras que las Hojas presentaron 1.36 de Vitamina C, 0.92 mcg de vitamina A, 0.71 mcg de vitamina E. Con respecto a los Minerales, los Frutos obtuvieron 0.67 mcg de Selenio, 0.12 mcg de cobre y 0.23 mcg de zinc; mientras que las Hojas presentaron 0.08mcg de Selenio, 0.14 mcg de cobre, 0.03mcg de Zinc. Tanto los Frutos como las Hojas presentaron una gran actividad antioxidante en sus extractos Acuoso y Metanólicos. El extracto Metanólico del Fruto de Noni, presentó un  $IC_{50}$  de  $0.239 \pm 0.003$  mg/ml, siendo el de mayor actividad antioxidante que el extracto metanólico de las hojas, que tuvieron  $0.265 \pm 0.008$  mg/ml. El extracto Acuoso del Fruto de Noni, presentó un  $IC_{50}$  de  $0.586 \pm 0.023$  mg/ml, presentando mayor actividad antioxidante que el extracto acuoso de las hojas, que tuvieron  $0.723 \pm 0.006$  mg/ml.

**Palabras clave:** *Actividad antioxidante,  $IC_{50}$ , polifenoles totales, plantas medicinales.*

---

\* Bachilleres en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana – UNAP.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>Nº de Página</b> <b>02</b>
<b>INDICE</b>	<b>03-06</b>
<b><u>CAPÍTULO I</u></b>	<b>07</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>08-09</b>
<b>2.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>10</b>
<b>3.- OBJETIVOS</b>	
<b>3.1.- objetivo general</b>	<b>11</b>
<b>3.2.- objetivos específicos</b>	<b>11</b>
<b><u>CAPÍTULO II</u></b>	<b>12</b>
<b>1.- MARCO TEÓRICO</b>	
<b>1.1.- Antecedentes</b>	<b>13</b>
<b>1.2.- Bases Teóricas</b>	<b>14</b>
 	<b>14</b>
<b>1.2.1.- Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante</b>	
<b>1.2.2.- Compuestos Polifenólicos como Antioxidantes</b>	<b>15</b>
<b>1.2.3.- Vitaminas como Antioxidante</b>	<b>16-18</b>
<b>1.2.4.- Minerales como antioxidante</b>	<b>18</b>

1.2.5.- Modelos “In Vitro” para el estudio de la Actividad Antioxidante	19
A) Método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).	19
B) Método ABTS (ácido 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).	20
C) Método DMPD (Dicloridrato de N, N-Dimetil-p-fenilendiamina).	21
D) Método de barrido de Radicales de Superóxido	22
E) Determinación del poder reductor	22
1.2.6.- <i>Morinda citrifolia</i> Linn. “Noni”	23-26
2.- DEFINICIONES OPERACIONALES	27-29
3.- HIPÓTESIS	29
<b><u>CAPÍTULO III</u></b>	<b>30</b>
1.- METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	31
1.1. Obtención de los extractos	32
1.2.- Método de DPPH	33
1.3.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	34
1.4.- ANALISIS DE VITAMINAS	35

1.5.- DETERMINACIÓN DE MINERALES	36
2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	37
3.- TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	38-40
4.- PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	41
4.1.- Recolección de las muestras Vegetales	42
4.2.- Recolección de Datos de los Ensayos	42
5.- ANÁLISIS DE DATOS	42
<b><u>CAPÍTULO IV</u></b>	<b>43</b>
<b>1.- RESULTADOS</b>	<b>44</b>
1.1.    DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	44
1.2.    PORCENTAJE DE INHIBICIÓN AL RADICAL DPPH	44
1.3.    VALORES DE IC50 DEL EXTRACTO METANOLICO	45
1.4.    1.4. VALORES DE IC50 DEL EXTRACTO ACUOSO	46
1.5.    1.5. DETERMINACIÓN DE VITAMINAS	46
1.6.    1.6 DETERMINACIÓN DE MINERALES	47
2.- DISCUSIÓN	47
3.- CONCLUSIONES	48

<b>4.- RECOMENDACIONES</b>	<b>49</b>
<b>5.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>50-54</b>
<b>6.- ANEXOS</b>	<b>59-68</b>

# **CAPITULO I**

## 1. INTRODUCCIÓN

La utilización de antirradicales permite que no se manifiesten especies reactivas oxigenadas (por esto se los denomina antioxidantes)<sup>3,4</sup>. Dentro de la naturaleza, las plantas nos ofrecen una oportunidad insuperable para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con diversas actividades<sup>5,6</sup>. Estas plantas están sometidas a una intensa radiación ultravioleta y una alta concentración de oxígeno en su entorno. Pero los efectos nocivos de los radicales libres producidos en estas condiciones, son neutralizados por antioxidantes naturales<sup>7</sup>.

Una de las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente desde la antigüedad, es el *Morinda citrifolia* Linn (Noni). Se reportan la utilización de raíz, hojas, flores, frutos en el tratamiento de diversas enfermedades; sin embargo existe poca información científica que valide el probable efecto antioxidante de las hojas y frutos de la especie mencionada, y teniendo en cuenta que la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo.

Las oxidaciones, que resultan indispensables para el funcionamiento del metabolismo humano, desempeñan también un importante papel en el proceso del envejecimiento celular. Noni (*Morinda Citrifolia*) es una planta que Desde hace mas de 2,000 años se ha usado con efectividad en Polinesia, La china, la India y otros lugares. El Noni migró con los habitantes de esa región a las islas del sur del Pacífico, Tahiti, Hawái y Malasia y a dondequiera que existe suelo volcánico sin contaminación. Los nativos de Hawái, Tahití y las islas del pacífico sur han utilizado el fruto, las flores, hojas y raíz durante esos 2000 años para preparar remedios efectivos contra muchas enfermedades. El hecho de que el zumo de noni actúe a nivel celular primario (polisacáridos y proteínas) explicaría por qué los polinesios lo usaban para una gran cantidad de estados de salud.

El funcionamiento óptimo de nuestro sistema inmune es básico para nuestro bienestar general; cada reacción bioquímica de nuestras células utiliza enzimas y todos los mecanismos de comunicación celular hacen uso de receptores celulares. Los



**fitonutrientes de la fruta noni** ejercen su acción a este nivel. De este modo se puede comprender su variedad de aplicaciones. Sabiendo esto, resulta imprescindible la validación científica de esta planta mediante múltiples estudios, que brinden a la población un mayor rango de seguridad en el empleo tradicional de esta especie.

Basándonos en la información etnomédica y fitoquímica sobre los principales compuestos químicos presentes en la especie en estudio, el motivo principal del presente trabajo de investigación es evaluar la actividad antioxidante e identificar la capacidad de secuestro de radicales libres, presente en los diferentes tipos de extractos de las hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn.; y así poder contribuir como un estudio primario para futuras investigaciones preclínicas y clínicas.

## 2. **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Una de las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente desde la antigüedad, es el *Morinda citrifolia* Linn (Noni). Se reportan la utilización de raíz, hojas, flores, frutos en el tratamiento de diversas enfermedades; sin embargo existe poca información científica que valide el probable efecto antioxidante de las hojas y frutos de la especie mencionada, y teniendo en cuenta que la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo.

El mecanismo por el cual los radicales libres producen sus efectos transcurre mediante reacciones radicalarias, este proceso es favorecido por la presencia de oxígeno y de luz ultravioleta. La utilización de antirradicales permite que no se manifiesten especies reactivas oxigenadas (por esto se los denomina antioxidantes) <sup>3,4</sup>. Dentro de la naturaleza, las plantas nos ofrecen una oportunidad insuperable para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con diversas actividades <sup>5,6</sup>. Estas plantas están sometidas a una intensa radiación ultravioleta y una alta concentración de oxígeno en su entorno. Pero los efectos nocivos de los radicales libres producidos en estas condiciones, son neutralizados por antioxidantes naturales.

La excesiva oxidación de biomoléculas da lugar a daños en el organismo, es así que un exceso de radicales libres está relacionado con una mayor incidencia de enfermedades degenerativas <sup>1</sup>, como cáncer, enfermedades cardíacas, artrosis, disfunción cerebral, aceleramiento del envejecimiento <sup>2</sup> etc.

Se plantea:

¿Presentará Actividad Antioxidante las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn?

### 3. **OBJETIVOS**

#### 3.1.- General

- Û Evaluar la Actividad Antioxidante “*in Vitro*” en los extractos de las Hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn.; mediante el método de secuestro de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

#### 3.2.- Específicos

- Û Obtener los extractos con solventes orgánicos de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn.
- Û Determinar la Concentración de Polifenoles Totales de los extractos de Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn., por espectrofotometría mediante el método de Folin – ciocalteu.
- Û Determinar el IC<sub>50</sub> en los extractos de Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn., por espectrofotometría mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).
- Û Analizar la Concentración de Vitaminas (A, C, E) en los extractos de Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn., por cromatografía de alta performance (HPLC).
- Û Determinar la Concentración de Minerales (Cobre, Selenio y Cinc) en los extractos de Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* Linn., por espectrofotometría de absorción atómica.

## **CAPITULO II**

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1. ANTECEDENTES

Las cualidades promovedoras de salud de *Morinda citrifolia* Linn. “Noni” han sido registradas a través de las generaciones entre los pueblos del Pacífico del Sur, Nueva Zelanda, Australia, Malasia, India y las Islas del Caribe; es una especie que en la medicina tradicional se le atribuye efectos relacionados con actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, antihelmíntica, analgésica, antiinflamatoria, hipotensora e inmunoestimulante <sup>9</sup>; se conoce entre algunos pueblos como Planta Calmante, Gran Morinda, Fruto de Queso, Árbol para dolor de cabeza y muchos más. Tenemos las siguientes referencias al respecto:

DENG S., *et al.* (2007) <sup>10</sup>, realizaron un estudio fitoquímico a los frutos de noni colectados en Tahití, lo que condujo al aislamiento de dos nuevos lignanos: el (+)-3, 4, 3', 4'-tetrahidroxi-9, 7'-alpha-epoxilignano-7 alpha, 9'-lactona (1) y el (+)-3, 3'-bisdemetiltanegool (2) y de siete compuestos conocidos, (-)-pinoresinol (3), (-)-3,3'-bisdemetilpinoresinol (4), quercetina (5), kaempferol (6), escopoletina (7), isoscopoletina (8), y vanillina. Los compuestos 1 – 8 mostraron inhibición al 5-lipoxigenasa y al 15-lipoxigenasa, con valores de IC<sub>50</sub> con rangos de 0.43 al 16.5 microM.

TAKASHIMA J. *et al.* (2007) <sup>11</sup>, identificaron en las hojas del noni un nuevo glicósido iridoide: citrifosida, y una nueva antraquinona: 1, 5, 15-trimetilmorindol; además de 24 compuestos conocidos. La antraquinona no mostró actividad citotóxica significativa por sí mismo, pero presentó citotoxicidad cuando fue combinado con el factor de tumor relacionado al ligando inductor de apoptosis (TRIAL, siglas en inglés). Citrifosida no presentó ni actividad por sí misma, ni combinada con TRIAL.

MORÓN F. *et al.* (2004) <sup>9</sup>, realizaron un estudio con el objetivo de actualizar la información científica que puede avalar el uso médico de la especie, particularmente del fruto, se encontraron un total de 47 referencias. Sólo 5 avalaron, en modelos preclínicos

mayoritariamente *in vitro*, las actividades farmacológicas del fruto para los usos etnomédicos relacionados con el cáncer e inmunoestimulación, así como con el dolor y la inflamación, llegando a la conclusión de que la información científica disponible, no permite validar los usos y la seguridad del empleo tradicional de *Morinda citrifolia*.

HEINICKE R., (2001)<sup>12</sup>, descubrió la Xeronina extraída del fruto del Noni, que actúa para atar la energía existente en el agua de nuestro cuerpo (regulando y direccionando la forma de las proteínas), permitiendo que ellas obtengan la energía para transformarla en forma beneficiosa.

HIRAZUMI *et al.* (1992)<sup>13</sup>, dentro de la Universidad de Hawái, reportaron la actividad antineoplásica del fruto del Noni sobre cáncer de pulmón en ratones C57 Bl/6, El Noni demostró prolongar significativamente la vida de los ratones hasta en un 75 %. Se concluyó que suprime el crecimiento tumoral indirectamente, al estimular al sistema inmunológico.

HIRAMATSU *et al.* (1993)<sup>14</sup>, reportaron los efectos sobre las células K-Ras-NRK de el Damnacanthal, aislado de las raíces de Noni, que es un inhibidor de la función Ras. Se cree que el oncogene Ras está asociado con la transducción de señales en varios cánceres humanos, como los de pulmón, colon, páncreas y leucemia.

## **1.2. BASES TEÓRICAS**

### **1.2.1. Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante**

Existen muchas evidencias de que la oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos, inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, se relaciona con un aumento en la incidencia de las principales enfermedades degenerativas de los seres humanos. Por otro lado, también se ha acumulado abundante información sobre la capacidad de algunos componentes de los alimentos para disminuir o prevenir los procesos de oxidación celular.

El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Esas especies con oxígeno activo incluyen el radical superóxido ( $O_2\bullet$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) y el oxígeno singlete ( $1O_2$ ). Además, permanentemente estamos expuestos a radiaciones electromagnéticas que rompen el agua generando radicales  $OH\bullet$ .<sup>15</sup>

Debido a que los radicales libres se producen constantemente «in vivo» los humanos hemos desarrollado diversos mecanismos de defensa antioxidante como medio de protección. La enzima superóxido dismutasa remueve el ( $O_2\bullet$ ), convirtiéndolo en  $H_2O_2$ , el cual es transformado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en agua ( $H_2O$ ). Nuestro organismo también posee moléculas que remueven los radicales libres por reacción directa (no catalítica), tales como el glutatión reducido, los tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C).<sup>15,16</sup>

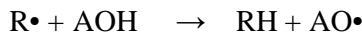
Cuando la defensa antioxidante no es totalmente eficiente, incrementa la formación de radicales libres en el organismo; a esto se denomina estrés oxidativo. Se dice que ha ocurrido un daño oxidativo cuando el exceso de radicales libres causa daño celular. Muchas sustancias tóxicas son capaces de producir radicales libres y de disminuir nuestra defensa antioxidante, aumentando el estrés oxidativo. El herbicida PARAQUAT<sup>®</sup>, el solvente tetracloruro de carbono y el paracetamol; son ejemplos de sustancias químicas que inducen estrés oxidativo. Se cree que muchos de los efectos colaterales de los medicamentos se relacionan con un aumento en el daño oxidativo.

Ante el estrés oxidativo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula. En las frutas y las legumbres se encuentran muchas sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando nuestra defensa antioxidante. Entre estas sustancias se encuentran los compuestos polifenólicos (presentes en hojas, frutos), el ácido ascórbico (vitamina C presente en frutos), los tocoferoles (vitamina E) presentes en semillas; los carotenoides y el elemento selenio.<sup>15</sup>

### 1.2.2. **Compuestos Polifenólicos como Antioxidantes**

Los compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal, encontrados en alimentos derivados de fuentes vegetales. Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo. Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, a los ácidos fenólicos y fenoles simples, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, ligninas entre otros, los mismos actúan generalmente como capturadores y estabilizadores de radicales libres, pudiendo producir quelación de metales aquéllos que poseen grupos carboxílicos en su estructura. También han sido reportados trabajos que atribuyen su acción antioxidante a la inhibición de enzimas prooxidantes como la lipooxigenasa.

El mecanismo de protección de los polifenoles (representado por AOH) ocurre en el estado inicial y más efectivamente durante el estado de propagación de la oxidación, por captura de los radicales libres (R•), inhibiendo de esta manera la reacción en cadena.



La transferencia de electrones desde el radical libre (R•) determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes (reductoras), como el ascorbato.<sup>16</sup>

### 1.2.3. **Vitaminas como Antioxidante**

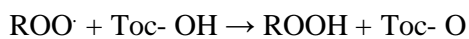
Las vitaminas antioxidantes, junto con el glutatión, conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo destructor de estos.

La vitamina E es un lípido isoprenoide sustituido, de la familia de los tocoferoles. Su forma biológicamente activa es el D – alfa tocoferol, cuyo hidroxilo fenólico en el anillo



de cromano es responsable de la reducción antioxidante. Esta vitamina es abundante en la yema de huevos, la leche entera, las vísceras de mamíferos y los aceites de pescados; el hombre debe ingerirla de modo esencial.

La actividad vitamínica E es una de las primeras barreras de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Los fosfolípidos de las membranas mitocondrial, del retículo endoplasmático y plasmática poseen afinidades para el alfa-tocoferol, por lo que está muy concentrado en estos sitios. Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones de cadena con radicales libres como resultado de su capacidad de transferir el hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre, quedando, a la vez, en la forma de radical libre fenoxi o fenoxilo, en reacciones intermedias no reversibles que presuponen la transformación de la vitamina hasta su producto final inocuo:



Aunque ya es conocido que la apropiación de vitamina E está en franca correlación con la disponibilidad para digerir y absorber lípidos debido a su naturaleza hidrofóbica (se ha comprobado la deficiencia de tocoferoles en procesos morbosos como la colestasis hepática y la fibrosis quística o en la resección intestinal), trabajos recientes demuestran la estrecha relación del incremento del requerimiento de esta vitamina con la ingestión de ácidos grasos insaturados, el envejecimiento y el padecimiento de patologías crónico-degenerativas como la aterosclerosis, el mal de Alzheimer o el carcinoma prostático.<sup>18,19,20</sup>

La vitamina C o L-ascorbato es un derivado ácido de la glucosa. Su obtención en la dieta es esencial para el hombre (y los primates en general, además de cobayos, murciélagos y algunas aves y peces).<sup>21,22</sup>

La Vitamina C, presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, lo que le permite, incluso, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas.

El mecanismo molecular de acción de la vitamina C, la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido, o de nitrosaminas durante la digestión; además, es el agente que reduce los radicales fenoxilo formados durante la actividad vitamínica E, restableciéndola.

La vitamina A es una vitamina liposoluble que combate las infecciones y las enfermedades, forma barreras de primera línea ayudando al tejido epitelial del organismo a crecer y repararse a sí mismo. Sin suficiente vitamina A, estas células se vuelven rígidas, secas y con probabilidad de bajar la guardia favoreciendo la entrada de gérmenes al organismo. Es esencial para tener ojos sanos.

El organismo constantemente reemplaza las células viejas y gastadas por otras nuevas y se necesita la vitamina A para producir células sanas de reemplazo. La única forma de obtenerla era por medio de alimentos de origen animal, productos lácteos que contienen retinoles de forma natural pero luego se descubrieron otra manera de obtener esta vitamina y fue comiendo alimentos de origen vegetal que contengan carotenos; estos pertenecen a la familia de los carotenoides vegetales. El organismo es capaz de transformarlo en vitamina A en el intestino delgado. Posee conjuntamente las propiedades de la vitamina A y de los antioxidantes que actúan sobre los radicales libres.<sup>23</sup>

Las vitaminas C y E, así como la A, clasifican como antioxidantes interruptores, porque actúan interrumpiendo la reacción en cadena de formación de radicales libres, atrapándolos y reduciéndolos, a diferencia de los antioxidantes preventivos (entre los que se encuentran las enzimas peroxidasas), que evitan la iniciación de la secuencia de reacciones.<sup>24</sup>

#### **1.2.4. Minerales como antioxidante**

Una importante línea de antioxidantes son los minerales como el selenio, cobre, el manganeso y el cinc; que junto a las enzimas constituyen un sistema eficaz a favor de la reducción de las concentraciones de los oxidantes más dañinos. La nutrición desempeña una función fundamental en cuanto a mantener las defensas enzimáticas del cuerpo

contra los radicales libres, y en la estructura o actividad catalítica de esas enzimas intervienen varios minerales esenciales, importantes para el buen funcionamiento del organismo.

Si el cuerpo no obtiene un suministro adecuado de esos minerales, esto puede dar por resultado que las defensas enzimáticas se deterioren, lo que a su vez puede llevar a que se contraiga una enfermedad; como por ejemplo es el selenio, que es requerido para la función pancreática normal, la cual es necesaria para la correcta digestión de los lípidos.

25

### **1.2.5. Modelos “In Vitro” para el estudio de la Actividad Antioxidante.**

Los métodos de medición de la actividad antioxidante “in Vitro” muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete, y fuentes de radicales libres.

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación.<sup>26.27</sup>

Siguiendo este principio, los métodos de ensayo más modernos para medir la actividad antioxidante mediante la capacidad de secuestro de radicales libres, son los ensayos de ABTS (ácido 2,2’azinobis-(3- etilbenzotiazolona)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).<sup>18</sup> Debemos mencionar que los principales métodos para la medición de la actividad antioxidante son medidos mediante absorbancia a diferente longitud de onda en el espectrofotómetro UV/VIS. Aunque éstos son los métodos más conocidos y utilizados por su relativa facilidad de desarrollo, existen otros métodos importantes para la determinación de la actividad antioxidante, los cuales se describen a continuación:

#### **A) Método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).**

En este ensayo desarrollado por Brand-Williams *et al*, evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.<sup>28</sup>

#### **B) Método ABTS (ácido 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).**

Según la metodología desarrollada por RE *et al*. y descrita por KUSKOSKI *et al.*, el radical  $ABTS^{\bullet+}$  se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}C$ ) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical  $ABTS^{\bullet+}$  se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ( $\pm 0,1$ ) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20  $\mu L$  de la muestra. A 980  $\mu L$  de dilución del radical  $ABTS^{\bullet+}$  así generado se le determina la absorbancia a 754 nm a  $30^{\circ}C$ , se añade 20  $\mu L$  de la muestra (dilución de antocianos) y luego de un minuto se mide de nuevo la absorbancia a 754 nm. Se mide la absorbancia de forma continua hasta transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, TROLOX<sup>®</sup>, se ensaya a una concentración de 0-15  $\mu M$  (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a TROLOX<sup>®</sup>) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso por tratarse de alimentos.<sup>29</sup>

### **C) Método DMPD (Dicloridrato de *N, N*-Dimetil-*p*-fenilendiamina).**

Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por FOGLIANO *et al.*. Este se basa en añadir 1 mL de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD•). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ( $\pm 0,1$ ), a 506 nm. Se añade 50  $\mu$ L de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a TROLOX (en mM o  $\mu$ M) o bien en VCE.<sup>29</sup>

### **D) Método de barrido de Radicales de Superóxido**

El método se basa en la capacidad de la muestra para inhibir la formación de formazon azul mediante el barrido de los radicales superóxido generados en el sistema riboflavina – luz - azul de nitrotetrazolio (NBT). El medio de reacción contiene 2.5 ml de tampón fosfato (pH 7.6), 100  $\mu$ l de riboflavina (20  $\mu$ g), 200  $\mu$ l de EDTA (12 mM), 100  $\mu$ l de NBT (0.1 mg) y distintas concentraciones de muestra en 100  $\mu$ l de metanol. Para iniciar la reacción, se ilumina la mezcla de reacción durante 5 minutos. La absorbancia se mide a 590 nm. El blanco se realiza de la misma manera, pero con 100 ml. de metanol en lugar de la sustancia de análisis. El IC<sub>50</sub> se calcula como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco. Como estándar se utiliza ácido ascórbico.<sup>27</sup>

### **E) Determinación del poder reductor**

El poder reductor se determina por el método de Oyaizu. Se mezclan las muestras con 5 ml de tampón fosfato (2 M, pH 6.6) y 5 ml de ferrocianuro potásico al 1%; a continuación, se incuba la mezcla a 50 °C durante 20 minutos, se añaden 5 ml de ácido tricloroacético al 10% y se centrifuga la mezcla a 4000 r.p.m. Seguidamente, se mezclan 5 ml de solución superior con 5 ml de agua destilada y 1 ml de cloruro férrico al 0.1%.

La absorbancia se mide a 700 nm. El aumento de absorbancia de la mezcla de reacción indica un aumento de poder reductor. Como estándar se utiliza ácido ascórbico (0.3 mg).<sup>27</sup>

#### 1.2.6. *Morinda citrifolia* Linn. “Noni”

##### **Clasificación Taxonómica**

Reino	:	Vegetal
Clase	:	Angiospermae
Sub-Clase	:	Dicotyledoneae
Orden	:	Tubiflorae
Familia	:	RUBIACEAE
Género	:	<i>Morinda</i>
Especie	:	<i>citrifolia</i>

**Clasificación: Parra M., et al., Manual de plantas medicinales.<sup>30</sup>**

##### **Descripción Botánica**

Conocida popularmente como “Noni”, “Indian Mulberry”, “Ba Ji Tian”, “Nono”, “Nonu”, “Fruta de Queso”, “mengkudu”, “Náu.”, “Gran morinda”; pertenece a la familia Rubiaceae, conocida en diferentes culturas de diferentes partes del mundo, esta especie crece generalmente en regiones costeras al nivel del mar y también en bosques tropicales.<sup>31</sup>

Arbusto verde de hasta 6 m de altura, con la corteza pálida y lisa. Hojas opuestas, de estrecha a anchamente elípticas, de color verde brillante, con estípulas grandes. Flores aromáticas; tienen el cáliz truncado y la corola tubular, de color blanco. Fruto de masa casi esférica, verdosa, de 2,5-3,5 cm. de diámetro, con la superficie cubierta de pequeñas protuberancias.<sup>30</sup>

Históricamente, los indígenas Polinesios de donde es oriunda esta especie, utilizaban la planta completa para una cantidad de beneficios terapéuticos. Los primeros estudios de

la planta documentan que los usos tradicionales iban desde el empleo de la raíz como agente reductor de la fiebre, hasta ayudar a controlar la diabetes, así como la aplicación de las hojas en heridas y úlceras. <sup>9</sup>

### **Información etnomédica**

Las cualidades promovedoras de salud de Noni han sido registradas a través de las generaciones entre los pueblos del Pacífico del Sur, Nueva Zelanda, Australia, Malasia, India y las Islas del Caribe. Se conoce entre algunos pueblos como Planta Calmante, Gran Morinda, Fruto de Queso, Árbol para dolor de cabeza y muchos más. Se ha demostrado que al igual que la sábila (Aloe vera), Kelp, Papaya, Pycnogenol(TM), el extracto de la planta del Noni mejora la salud en una gran variedad de afecciones.

Las investigaciones señalan que el noni estimula el sistema inmunológico, regulando la función celular y la regeneración de las células dañadas. El hecho de que el noni actúe al nivel celular más básico y fundamental puede explicar por qué sirve para una gran variedad de afecciones. El Dr. Richard Dicks, médico clínico de New Jersey, nos dice: "Estamos empezando a darnos cuenta de que debemos volver a lo básico en lo que a nuestros cuerpos se refiere. Y esto se reduce a que quemamos nutrientes o quemamos tu propio cuerpo. El Noni te salva el cuerpo porque le proporciona los nutrientes que necesita".

El Dr. Schechter, director del Instituto de Medicina Natural de California, reporta que existe abundante información que respalda los beneficios para la salud que se atribuyen al noni y sus usos tradicionales. Su trabajo sustenta lo que los Kahunas (curanderos tradicionales de Hawaii) han sabido y utilizado para su beneficio por miles de años. Confirmó en una entrevista que los resultados positivos obtenidos por médicos que usan noni coinciden con los resultados que han obtenido médicos clínicos naturópatas. El Dr. Schechter ha tratado cientos de pacientes con noni y le ha impresionado sobremanera la variedad de enfermedades que han respondido al noni. A continuación se presenta una sinopsis de algunos datos importantes de las investigaciones clínicas del Dr. Schechter:

- El noni estimula la producción de las células T del sistema inmunológico. Las células T desempeñan un papel central en la lucha contra las enfermedades.
- El noni actúa para fortalecer la función del sistema inmunológico inclusive la producción de macrófagos y/o linfocitos, que constituyen un componente vital de las defensas naturales del organismo.
- El noni combate muchos tipos de bacterias. El noni surte efectos únicos contra el dolor
- El noni inhibe la función precancerosa y el crecimiento de tumores cancerosos al permitirle a las células anormales funcionar más normalmente.
- El Dr. Schechter dice: "Como terapeuta clínico, he visto que el noni produce beneficios terapéuticos significativos, incluso profundos, de prevención y autoayuda, en una variada gama de problemas de salud."

### **Estudios Fitoquímicos**

Diferentes estudios fitoquímicos reportan, que la familia Rubiaceae, presentan compuestos como: alcaloides, flavonoides, antocianos, iridoides, heterosidos di y tri-terpenoides, cumarinas, antraquinonas, catequinas, algunas especies como *Morinda* acumulan selenio.<sup>32.33</sup>

El estudio del tamizaje fitoquímico realizado por Rodríguez *et al.* ; al fruto verde y maduro, aplicando diferentes ensayos precisó que en la composición fitoquímica de la planta estaban presentes, fundamentalmente, triterpenos y/o esteroides, aminoácidos, carbohidratos reductores, alcaloides y flavonoides.<sup>34</sup>

Águila B. *et al.*, realizaron el tamizaje fitoquímico de las hojas de *Morinda citrifolia* L, según técnicas de la Universidad de La Habana empleando como solvente éter etílico, etanol y agua, resultando del tamizaje la presencia de flavonoides, lactonas



sesquiterpénicas en el extracto alcohólico, alcaloides, triterpenos y esteroides, saponinas, taninos y fenoles, quinonas y azúcares reductores.<sup>35</sup>

### **Estudios farmacológicos**

En el 2000, Wang publicó los resultados del estudio sobre la posibilidad que el Noni tenga un efecto preventivo sobre el cáncer en la etapa de inicio de la carcinogénesis. Los datos preliminares sugieren que un tratamiento preparatorio de una semana con el Noni en agua potable a una concentración del 10% pudo reducir la formación del aducto DMBA-ADN (marcador del cáncer en desarrollo) en ratas.<sup>36</sup>

En el 2004, Sabana C, *et al.*, realizaron el estudio del fruto de Noni sobre la glicemia en *Rattus rattus* var. *Albinus* hiperglicémicas y eritrocitos de *Homo sapiens*.; logrando como resultado la disminución de la glucosa, indicando que probablemente los componentes que presenta dicha especie, estarían ejerciendo acción en la disminución de glucosa en sangre, orina y en eritrocitos.<sup>37</sup>

En 1998, Tosa *et al.*, estudiaron las actividades biológicas de las antraquinonas damnacantal, rubiadina, nor-damnacantal, morindona y lucidita 3-O-primeverodisa presentes en el zumo de los frutos de Noni. Los resultados de este estudio demuestran que estas sustancias en particular muestran una poderosa capacidad de mitigar el crecimiento tumoral inhibiendo importantes enzimas necesarias para estos.<sup>38</sup>

## **2. DEFINICIONES OPERACIONALES**

### **Variable Independiente.**

- 1.- Extractos Acuosa, Etanólicos y Clorofórmicos de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* L. “Noni”

### **Indicador:**

- Pesos de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* L. “Noni”

### **Variable Dependiente.**

- 1.- Actividad antioxidante de extractos de Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia* L. “Noni”

### **Indicadores:**

- Tiempo de secuestro de los radicales libres.
- Absorbancia medida en el espectrofotómetro UV/VIS.
- Capacidad de secuestro y/o inhibición de los radicales libres.

**OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>ESCALA</b>
<p>Extractos Acuosos, Metanólicos y Clorofórmicos de las Hojas y Frutos de <i>Morinda citrifolia</i> L. "Noni"</p>	<p>El Noni cultivado en la Región Loreto, es un arbusto de gran altura, corteza pálida y lisa, hojas anchamente elípticas de color verde brillante, flores aromáticas de color blanco y fruto de masa casi esférica</p>	<p>Los extractos fueron obtenidos por maceración con H<sub>2</sub>O, CHCl<sub>3</sub> y MeOH indistintamente de las partes vegetales durante 24 horas. Posterior filtrado, concentrado en rotavapor (extractos CHCl<sub>3</sub> y MeOH), y liofilización (extracto acuoso) a -40° y a una presión 1,33 x 10<sup>-3</sup></p>	<p>Polifenoles, Vitaminas (A, C, E) y Minerales (Cobre, Selenio, Cinc) presentes en las hojas y frutos de <i>Morinda citrifolia</i> L. "Noni"</p>	<p>Intervalar - Tipo: Cuantitativo</p>

### OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
<p>Actividad antioxidante de extractos de Hojas y Frutos de <i>Morinda citrifolia</i> L.</p>	<p>Capacidad de inhibición, secuestro o captura de radicales libres.</p>	<p>Actividad antioxidante de las moléculas responsables contenidas en cada muestra de extracto.</p>	<p>Se preparan las soluciones stock, a partir de estas, se toman alícuotas que son colocadas en cubetas de poliestireno, el cual es medido por espectrofotometría a 515 nm. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales libres por un antioxidante, la absorbancia disminuye.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo de secuestro de los radicales libres.</li> <li>• Absorbancia medida en el espectrotómetro UV/VIS.</li> <li>• Capacidad de secuestro y/o inhibición de los radicales libres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intervalar - Tipo: Cuantitativo</li> <li>• Intervalar - Tipo: Cuantitativo</li> <li>• Intervalar - Tipo: Cuantitativo</li> </ul>

### 3. **HIPOTESIS**

Los extractos de los frutos de *Morinda citrifolia* L. “Noni” presentan mayor Actividad Antioxidante que los extractos de las hojas.

## **CAPITULO III**

## 1. MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

- Tipo de estudio

*Experimental-Analítico:* se realizará comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control.

*Prospectivo:* en el registro de la información se tomarán en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.

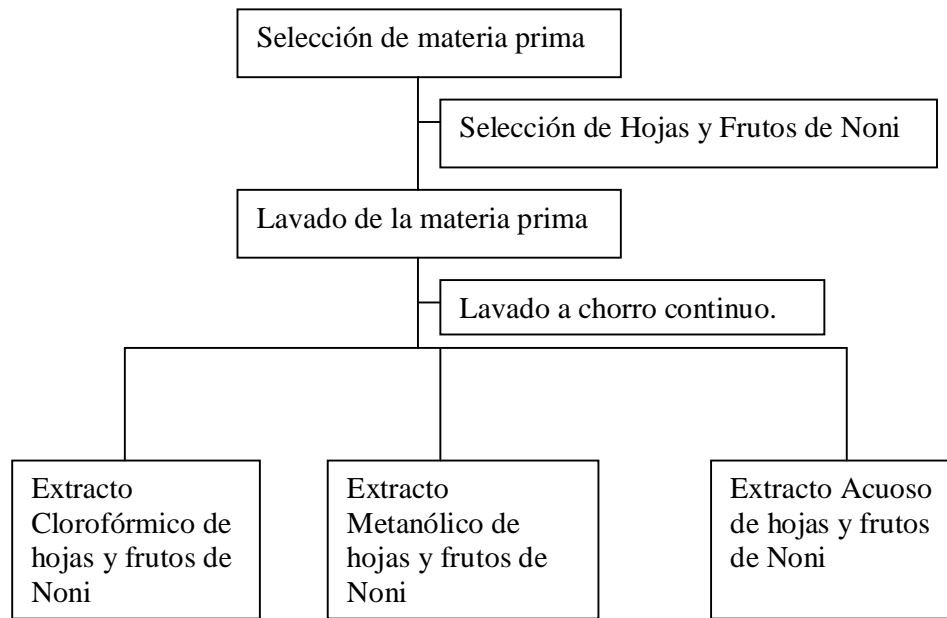
*Longitudinal:* se estudiarán las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

- Diseño de investigación

Ensayo preclínico “In Vitro”, con grupos elegidos al azar, bajo condiciones controladas.

La distribución de los grupos de estudio será según el siguiente esquema de tratamiento:

**1.1. Obtención de los extractos**



- Macerar 50 g. de M.P. en 500 ml. de Cloroformo x 24 h

- Filtración en papel filtro

- Extracción del solvente por rotavapor

- Dilución en concentraciones determinadas

- Envasado y rotulado

- Macerar 50 g. de M.P. en 500 ml de Metanol x 24 h

- Filtración en papel filtro

- Extracción del solvente por rotavapor.

- Dilución en concentraciones determinadas

- Envasado y rotulado

- Macerar 50 g. de M.P, en 500 ml de agua destilada x 24 h

- Filtración en papel filtro

- Extracción del solvente por liofilización

- Determinación en concentraciones determinadas.

- Envasado y rotulado



## 1.2. Método de DPPH

**Grupos experimentales:** Extractos acuosos, Metanólicos y clorofórmicos de las hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn.

**Grupo control positivo:** Ácido Ascórbico Q.P.

**Técnica operatoria:** Se prepararon soluciones stock en agua destilada desionizada:

Ø 10 ml de solución 1 mM DPPH en 95% Etanol.

Ø 10 ml de solución 1 mM Ácido Ascórbico.

A partir de la solución stock se preparó 20 ml de 100  $\mu$ M DPPH en 95% etanol. Al mismo tiempo, preparamos concentraciones crecientes de ácido ascórbico a partir de la solución stock. Las concentraciones de las muestras son 40x de la concentración final. Agregamos 25  $\mu$ L de muestra a 975  $\mu$ L de la solución de 100  $\mu$ M DPPH en una cubeta de poliestireno.

La inhibición de los radicales libres DPPH<sup>\*</sup> se determinó por la decoloración de la solución de violeta a amarillo, el cual fue medido por espectrofotometría a 515 nm. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales libres por un antioxidante, la absorbancia disminuye.

La disminución de la absorbancia entre la solución de DPPH y el compuesto experimental es directamente proporcional a la concentración del antioxidante y el tiempo de reacción.

Para calcular la capacidad de secuestro de radicales DPPH<sup>\*</sup> por un compuesto desconocido se utilizó la siguiente expresión:

$$PI = [(A_{control} + A_{muestra(t)}) / A_{control}] \times 100$$

**Donde:**

**A<sub>control</sub>:** Absorbancia del control.

$A_{\text{muestra (t)}}$ : Absorbancia del compuesto experimental en tiempo t.

$$IC_{50} = C_1 - \Delta C$$

**Donde:**

$$\Delta C = [(C_1 - C_2) \times (PI_1 - 50)] / (PI_1 - PI_2)$$

En el que:  $PI_1$  y  $PI_2$  corresponden a los valores de porcentajes de inhibición inmediatamente superiores e inferiores al 50% de inhibición y  $C_1$  y  $C_2$  corresponden a las concentraciones en las que se producen  $PI_1$  y  $PI_2$ , respectivamente.

### **1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

**Técnica operatoria:** A 2 g de muestra, previamente secada y molida, se añadió 20 ml de Metanol, se calentó en baño maría por 10 minutos a 60° C y se filtró en caliente, obteniéndose así la fracción total a una concentración de 100 mg/ml.

Se preparó una solución stock de 50 mM de Catequina y a partir de ella disoluciones de 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml y 0 mg/ml para construir la curva estándar. Posteriormente se agregó 1.58 ml de agua milipore a 20 ul de los estándares, a las muestras (por triplicado) y al control (agua milipore) respectivamente; luego se volteó. Se agregó 100ul de la solución de Folin Ciocalteu, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizó la reacción agregando 300 ul de una solución de Carbonato de Sodio al 20%, dejando reposar por 2 horas, tiempo en el que hay una reacción completa.

De cada uno de los tubos se colocó 1 ml, en la cubeta de poliestireno, se procedió a leer la absorbancia por espectrofotometría a 700 nm.

#### **1.4. ANALISIS DE VITAMINAS**

##### *Análisis de Vitamina A*

**Técnica operatoria:** Se pesó 20 g. de muestra seca, se colocó en el balón de base plana, Adicionamos 70 ml de alcohol y se sometió a reflujo con agitación. Se saponificó con 20 ml de KOH 50% por 30 min. con agitación, se enjuagó con agua y se filtró al vacío. Se colocó en una pera de separación con BHT o ácido Ascórbico y se adicionó hexano, se separa la fase orgánica. Se llevó a sequedad en rotavapor con baño de agua a 40° C. El residuo se diluyó a 10 ml con metanol y se filtró (filtro de 0,2 µm). La fase móvil es metanol al 100% grado HPLC. La muestra obtenida se analiza en HPLC.

##### *Análisis de Vitamina C*

**Técnica operatoria:** Se pesó 100 mg. de la muestra y se diluyó en 100 ml de ácido metafosfórico 4,5 % cc. Para la fase móvil se preparó 600 ml. de agua nanopura y se acidula con ácido sulfúrico concentrado, hasta alcanzar un pH 2,2 (2 o 3 gotas). La muestra obtenida se analiza en HPLC.

##### *Análisis de Vitamina E*

**Técnica operatoria:** Se pesó 20 g. de muestra seca, se colocó en el balón de base plana, luego se adicionó 70 ml de alcohol y se sometió a reflujo con agitación. Se saponificó con 20 ml de KOH 50% por 30 min. con agitación, se enjuagó con agua y filtró al vacío. Se colocó en una pera de separación con BHT o ácido Ascórbico y se adicionó hexano, se separó la fase orgánica. Se llevó a sequedad en rotavapor con baño de agua a 40° C. El residuo se diluyó a 10 ml con metanol y se filtró (filtro de 0,2 µm). Para la fase móvil se preparó una mezcla de metanol y agua (v + v). La muestra obtenida se analizó en HPLC.

## **1.5. DETERMINACIÓN DE MINERALES**

**Técnica operatoria:** Se colocó la cantidad necesaria de muestra en un crisol para el análisis en la mufla y así se obtuvo la muestra seca por incineración.

Se trató las cenizas con 5-10 ml de HCl 6N hasta mojarlas totalmente y a continuación desecamos cuidadosamente sobre placa caliente a temperatura moderada, luego se añadió HCl 3N y se calentó el crisol sobre la placa caliente hasta que la solución comience a hervir, se enfrió y filtró a través de papel filtro hacia un matraz, reteniendo en el crisol la mayor cantidad posible de sólidos.

Posteriormente se añadió 10 ml de HCl 3N al crisol y se calentó hasta que la solución comience a hervir, se enfrió y filtró hacia el matraz, luego se procedió a lavar el crisol al menos tres veces y filtramos los lavados hacia el matraz, se lavó el papel filtro y recogió los lavados en el matraz. Se enfrió y diluyó el contenido del matraz hasta la señal de enrase con agua.

Se realizó el mismo procedimiento para cada uno de los minerales en estudio (Cobre, Selenio, Cinc)

Posteriormente se puso en marcha el equipo de Absorción atómica y se midió primeramente las soluciones de calibración y las soluciones en blanco de los reactivos. Mientras se están midiendo las muestras se comprobó periódicamente que los valores de calibración permanezcan constantes.

## 2. POBLACIÓN Y MUESTRA

- **Población vegetal:** Hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn. que se encuentran en el Fundo “La Coruña” ubicado en el Km. 1 de la Carretera a Santa Clara, Iquitos-Perú.
- **Muestra vegetal:** Se emplearon aproximadamente 500 g. de hojas y 500 g. de frutos de *Morinda citrifolia* Linn., que se recolectaron del Fundo “La Coruña” y macerados con los solventes orgánicos (cloroformo, etanol y agua) en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, con sede en la ciudad de Iquitos.

### **Criterios de inclusión**

- Hojas verdes en buen estado.
- Frutos maduros en buen estado.

### 3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

<b>Reactivos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).</li><li>- Ácido ascórbico Q.P.</li><li>- Agua destilada desionizada (ddH<sub>2</sub>O)</li><li>- Folin-ciocalteu.</li><li>- Ácido metafosfórico</li><li>- Agua nanopura</li><li>- Ácido sulfúrico cc.</li><li>- Hexano Q.P.</li><li>- Metanol grado HPLC</li><li>- Hidróxido de potasio Q.P.</li><li>- Ascorbato de sodio Q.P.</li><li>- Sulfuro de sodio hepta o nona-hidratado</li><li>- Fenolftaleína</li><li>- 2-propanol</li><li>- Vitamina A (totalmente transformado en acetato)</li><li>- Vitamina A (totalmente transformado en palmitato)</li><li>- Sulfato de sodio anhidro</li><li>- Metanol Q.P.</li><li>- Acetato de DL-(alfa)-tocoferol</li><li>- DL-(alfa)-tocoferol</li><li>- Carbonato de Sodio 20 %.</li><li>- Etanol 95 %.</li><li>- Ácido protocatéquico.</li><li>- Cloroformo Q.P.</li><li>- Etanol Q.P.</li><li>- Patrón de referencia de Cobre para Absorción Atómica.</li><li>- Patrón de referencia de Selenio para Absorción Atómica.</li><li>- Patrón de referencia de Selenio para Absorción Atómica.</li></ul>

- Agua destilada.

### **Materiales de Laboratorio**

- Matraz de Erlenmayer 500 ml.
- Fiolas (10 – 250 ml)
- Filtros PURADIS 25 AS de 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman)
- Filtros de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman)
- Balones de 250 – 500 ml de fondo plano esmerilado con tapa color ámbar
- Balones aforados de 5 – 500 ml con tapa color ámbar
- Pera de decantación de 500 – 1000 ml color ámbar
- Balones en forma de pera de 250 ml esmerilado con aforado color ámbar
- Condensador de Allihn o similar de 300 mm color ámbar
- Probeta de 1000 ml
- Jeringas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  HPLC. columna: C18
- Refrigerante a Allihn o similar de 300 mm, esmerilado de 29,2/32 y adaptador para alimentación de gas.
- Cronómetro digital.
- Guantes quirúrgicos N° 7 ½
- Micropipeta de 0 – 1000uL.
- Tips descartables.
- Espátula mediana.
- Marcador de vidrio
- Mascarillas descartables.
- Papel toalla.
- Papel filtro
- Tijeras
- Cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4.5 cm).
- Pipetas 1 - 10 ml
- Embudos de vidrio.
- Buretas 50 ml.
- Lámpara de Cátodo hueco para Cobre.
- Lámpara de Cátodo hueco para Selenio.

- Lámpara de Cátodo hueco para Cinc.
<b>Material Vegetal</b>
- Hojas y Frutos de <i>Morinda citrifolia</i> Linn. “Noni”

#### 4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

<b>Equipos</b>
- Espectrofotómetro UV/VIS – Thermo Electron Corporation Génesis 6
- HPLC – columna LiChrocart RP18, UV-
- Rotavapor – Buchi.
- Estufa - Thermolyne modelo 9000
- Baño maría equipado con agitador magnético – Scorpion Scientific.
- Aparato de extracción - Scorpion Scientific.
- Centrifuga refrigerada - Beckman, Avanti j-25.
- Campana de Seguridad – Terra Universal.
- Vorteador - Scorpion Scientific.
- Balanza analítica - Mettler Toledo AG 204
- Cámara fotográfica Digital – Nikon
- Equipo de Absorción Atómica – Varian Spectra AA220
- Mufla – Barnsterd Thernolune.



#### **4.1. Recolección de las muestras vegetales**

Fueron recolectados del Fundo “La Coruña”, ubicado en la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto, a orillas del río Amazonas, Selva Baja, a una altura de 116msnm, latitud sur de 03° 45’ 18’’ y longitud oeste de 73° 14’ 00’’ aproximadamente, en una zona de vida considerada Bosque Húmedo Tropical, con terreno de tipo franco arenoso, ligeramente ácido y buen contenido de materia orgánica. Presenta una temperatura media anual de 26° C y una precipitación fluvial de 2,727 mm al año.

Para la identificación de la muestra vegetal, se utilizó como patrones de comparación las plantas herborizadas del Herbarium del Instituto de Medicina Tradicional – EsSALUD y de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Además en la recolección de las muestras vegetales se consideró los siguientes factores:

- Edad de la planta.
- Estado vegetativo.
- Temporada de recolección.

#### **4.2. Recolección de datos de la Actividad Antioxidante**

Se utilizó la observación directa, medición y registro de la absorbancia para identificar la capacidad de secuestro de los radicales libres que son expresados como IC<sub>50</sub>; previamente se identificó la concentración total de polifenoles mediante la medición de la absorbancia; además se realizó el análisis de Vitaminas (A, C, E) mediante HPLC y la determinación de Minerales mediante absorción atómica. Los datos obtenidos fueron registrados en fichas de recolección de datos (ver Anexo)

## 5. **ANÁLISIS DE DATOS**

Los resultados obtenidos en el ensayo, se expresaron en términos de valores resultantes de la siguiente manera:

- ✓ Porcentaje de inhibición ( $IC_{50}$ ) obtenidos mediante los valores de absorbancia y titulación de las muestras en estudio.
- ✓ Se calculó la media y desviación estándar como medidas de tendencia central, que son presentados mediante tablas y gráficas.
- ✓ Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .
- ✓ Todo el procedimiento se realizó con el programa SPSS versión 18.0

## **CAPITULO IV**

## 2. RESULTADOS

### 2.1. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de polifenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu, fueron expresados como equivalentes a Catequina (CTQ) por cada 100g de extracto bruto, y son representados en el Cuadro N° 01; Observándose la alta concentración de estos compuestos dentro del fruto con 26 434.94 mg de CTQ/100g y en las hojas con 14 286.99 mg de CTQ/100g. (Ver gráfico N° 01 en el Anexo)

**CUADRO N° 01. Concentración de Polifenoles Totales en las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia L.***

<b>Muestra</b>	<b>Polifenoles Totales (mg de CTQ/100g) ± DESVEST</b>
<b>Fruto Noni</b>	26 434.94 ± 0.255
<b>Hojas Noni</b>	14 286.99 ± 0.158

### 2.2. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN AL RADICAL DPPH

De acuerdo al cuadro N° 02, donde se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos por las Hojas y Frutos, se observa que el extracto clorofórmico al ser evaluados a una concentración de 2.5 mg/ml (1g/10 ml de solvente), no supera el 50% de Inhibición, caso contrario a los extractos metanólicos y acuosos, en donde se aprecia un alto porcentaje de inhibición a los radicales libres producidos por el reactivo DPPH, siendo los frutos con 94,47% y 91.97% los porcentajes más altos. (Ver las figuras 01, 02 y 03 en el Anexo).

**CUADRO N° 02.- Porcentaje de inhibición al radical DPPH de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia L***

MUESTRAS	% INHIBICION ± DESVEST		
	Extracto Clorofórmico	Extracto Metanólico	Extracto Acuoso
<b>Fruto Noni</b>	49.02 ± 0.006	<b>94.47 ± 0.275</b>	<b>91.97 ± 0.129</b>
<b>Hojas Noni</b>	26.34 ± 0.211	<b>90.36 ± 0.264</b>	<b>87.33 ± 0.126</b>

**2.3. VALORES DE IC50 DEL EXTRACTO METANOLICO**

En el Cuadro N° 03, se muestran los valores de IC<sub>50</sub> que representan la concentración a la que los extractos metanólicos de las Hojas y Frutos, llegaron a obtener el 50 % de inhibición de radicales libres en el ensayo *in Vitro*.

**CUADRO N° 03.- Valores de IC<sub>50</sub> de los extractos metanólicos de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia L***

Muestras	IC 50
	mg/ml ± DESVEST
<b>Frutos Noni</b>	0.586 ± 0.023
<b>Hojas Noni</b>	0.723 ± 0.006

#### 2.4. VALORES DE IC50 DEL EXTRACTO ACUOSO

En el Cuadro N° 04, se muestran los valores de IC<sub>50</sub> que representan la concentración a la que los extractos Acuosos de las Hojas y Frutos, llegaron a obtener el 50 % de inhibición de radicales libres en el ensayo *in Vitro*.

**CUADRO N° 04.- Valores de IC<sub>50</sub> de los extractos Acuosos de las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia L.***

Muestras	IC 50
	mg/ml ± DESVEST
Frutos Noni	0.239 ± 0.003
Hojas Noni	0.265 ± 0.008

#### 2.5. DETERMINACIÓN DE VITAMINAS

En el cuadro N° 05, se encuentran los valores de las vitaminas A, E y C obtenida en las Hojas y Frutos, destacando la alta cantidad de Vitamina C que presentan los frutos (46.58 mcg), seguido de la Vitamina A con 20.45 mcg.

**CUADRO N° 05.- Valores de las Vitamina A, E y C**

Muestras	Vitamina A (mcg)	Vitamina E (mcg)	Vitamina C (mcg)
Frutos Noni	20.45	8.35	46.58
Hojas Noni	0.92	0.71	1.36

## 2.6. DETERMINACIÓN DE MINERALES

El cuadro N° 06, muestra los valores de la determinación de los principales minerales que presentan las Hojas y Frutos de *Morinda citrifolia L.* destacando los frutos con más presencia de todos estos minerales en comparación con las Hojas.

**CUADRO N° 06.- Valores de las Minerales Cobre, Selenio y Zinc**

<b>Muestras</b>	<b>Cobre (mcg)</b>	<b>Selenio (mcg)</b>	<b>Zinc (mcg)</b>
<b>Frutos Noni</b>	0.12	0.67	0.23
<b>Hojas Noni</b>	0.14	0.08	0.03

### 3. DISCUSION

En cuanto a la determinación de los Polifenoles Totales, GULICIN, I. (2003) sugirió que estos compuestos fenólicos tienen una importante acción en la estabilización de la oxidación lipídica, han sido asociados con la actividad antioxidante y tienen efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y carcinogénesis en humanos, ya AGUILA, B. (2004), realizó un tamizaje fitoquímico preliminar de las Hojas de Noni, encontrando la alta presencia de flavonoides, fenoles, glicósidos y saponinas; respaldando la importante cantidad de Polifenoles obtenidos en las Hojas dentro del estudio. ELKINS (1997), encontró en el Fruto de Noni la mayor cantidad de compuestos con efecto terapéutico, entre ellas a los ácidos grasos, aceites esenciales y los compuestos fenólicos confirmándose así, el por qué los frutos superan en cantidad a las hojas, en la concentración de estos metabolitos.

El porcentaje de Inhibición al radical DPPH de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso a concentración de 2.5 mg/ml, se expresan a través de una curva de dosis – respuesta relativa al decrecimiento del porcentaje de DPPH en la solución en función del tiempo (ver Figura 4, 5, 6,7). Observándose que tanto el extracto Metanólico y Acuoso aprovecharon prácticamente al máximo el consumo de DPPH en el primer minuto, con un porcentaje de DPPH en la solución menor que 50%. Caso contrario a lo que se observa en el extracto clorofórmico, que no mostro aumento significativo del consumo de DPPH en el mismo tiempo total de la observación. Debido a este comportamiento, se procedió a evaluar el  $IC_{50}$  Tanto del extracto metanólico ( $0.586 \pm 0.023$  mg/ml para los frutos y  $0.723 \pm 0.006$  mg/ml para las Hojas), como del extracto Acuoso ( $0.239 \pm 0.003$  mg/ml para el Fruto y  $0.265 \pm 0.008$  mg/ml).

La alta concentración de vitamina C encontrada en los Frutos (46.58 mcg), confirma lo ya estudiado por ELKINS (1997), quien además, afirma que esta vitamina junto a los ácidos caprílico y caproíco, aceites esenciales, glucosa y el alcaloide Xeronina, son los que le otorgan al fruto las propiedades que se les atribuye. Importante también la presencia de las Vitaminas A y E tanto en los Frutos como en las Hojas.



El mineral selenio, si bien no se encontró lo reportado por PINO, N (2006), que fue de 1.08 mcg, resulta importante su presencia, ya que este mineral reduce el daño oxidativo inducido por radicales libres y la consecuente peroxidación lipídica, reduciendo de esta manera los riesgos de padecer cáncer.

#### **4. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye:

Los Frutos de Noni fueron los que más concentración de Polifenoles totales obtuvieron con 26 434.94 mg de CTQ/100g. Las Hojas solo tuvieron 14 286.99 mg de CTQ/100g.

Los Frutos obtuvieron 46.58 mcg de Vitamina C, 20.45 mcg de Vitamina A y 8.35 mcg de Vitamina E; mientras que las Hojas presentaron 1.36 de Vitamina C, 0.92 mcg de vitamina A, 0.71 mcg de vitamina E.

Con respecto a los Minerales, los Frutos obtuvieron 0.67 mcg de Selenio, 0.12 mcg de cobre y 0.23 mcg de zinc; mientras que las Hojas presentaron 0.08mcg de Selenio, 0.14 mcg de cobre, 0.03mcg de Zinc.

Tanto los Frutos como las Hojas presentaron una gran actividad antioxidante en sus extractos Acuosa y Metanólicos.

El extracto Metanólico del Fruto de Noni, presento un  $IC_{50}$  de  $0.239 \pm 0.003$  mg/ml, siendo el de mayor actividad antioxidante que el extracto metanólico de las hojas, que tuvieron  $0.265 \pm 0.008$  mg/ml.

El extracto Acuoso del Fruto de Noni, presento un  $IC_{50}$  de  $0.586 \pm 0.023$  mg/ml, presentando mayor actividad antioxidante que el extracto acuoso de las hojas, que tuvieron  $0.723 \pm 0.006$  mg/ml.

## **5. RECOMENDACIONES**

Considerando la importancia de este estudio dado a que el efecto antioxidante es de suma importancia dado a los diversos procesos patológicos degenerativos de las células causada por los radicales sobre todo en la enfermedad del cáncer es de suma importancia continuar estudios como este y así evaluar la acción antioxidante.

## 6. **BIBLIOGRAFIA**

1. Pratico D., Delanty N. Oxidative injury, in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. 2000. *Am J. Med.* 577-585.
2. Finkel T., Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. 2000. *Nature*. Pag: 239-247.
3. Visioli F. *et al.* Diet prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. 2000. Res.* 419-425.
4. Eterthon K. *et al.* Bioactive compounds foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. 2002.
5. Simmonds M. Novel drugs from botanical sources. 2003. *Drug Discov. Today*. 721-722.
6. Monge A. *et al.* Medicinal chemistry in the development of societies. Biodiversity and natural products. 2000. *Eur. J. Med. Chem.* 1121-1125.
7. Koleva I. *et al.* Screening plant extracts for antioxidant activity a comparative study on three testing methods. 2002. *Phytochem. Anal* 133: 8-17.
8. García M. Plantas medicinales científicamente validadas [artículo en internet]. En: II Congreso de ciencias "Exploraciones fuera y dentro del Aula". Costa Rica; 2000 Agosto. Disponible en:  
<http://www.cientec.or.cr/ciencias/articulos.html>
9. Morón F., Morón D. Mito y realidad de *Morinda citrifolia* L. (Noni). *Rev Cubana Plant Med* [artículo en internet] 2004. Disponible en :  
[http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol9\\_3\\_04/pla02304.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol9_3_04/pla02304.htm)
10. DENG S, PALU K, WEST BJ, SU CX, ZHOU BN, JENSEN JC. 2007. *Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (Morinda citrifolia)*

*collected in Tahiti*. Research and Development Department, Tahitian Noni International. Utah USA.

11. TAKASHIMA J, IKEDA Y, KOMIYAMA K, HAYASHI M, KISHIDA A, OHSAKI A. 2007. *New constituents from the leaves of Morinda citrifolia*. Pharmaceuticals Research Division, Mitsubishi Pharma Corporation, Yokohama, Japan.
12. Heinicke R. The Xeronine system: a new cellular mechanism that explains the health promoting action of NONI and Bromelian. Direct Source Publishing.2001.Disponible en: <http://www.kinastchile.cl/plantas3.htm>
13. Hirazumi *et al.*,. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. Proc West Pharmacol Soc 1994. [artículo en internet] Disponible en : <http://www.chinaphar.com/1671-4083/23/1127.htm>
14. Hiramatsu *et al.* Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. 1993. Disponible en : <http://www.chinaphar.com/1671-4083/23/1127.htm>
15. Murillo E., Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. [artículo en internet]. Disponible en: <http://www.alfa-editores.com/bebidas/Junio-Julio%2006/Actividad.pdf>
16. González M. *et al.*, Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. [artículo en internet] Disponible en : [http://www.cervezaysalud.com/estudio\\_8.pdf](http://www.cervezaysalud.com/estudio_8.pdf)
17. Universidad nacional del nordeste – Facultad de Agroindustrias. [resumen en internet]Argentina. 2003. Disponible en : <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/08-Exactas/E-054.pdf>

18. Thomas D, Vitamins in health and aging. Clin Geriatric. Med 2004, 259-74.
19. Penn M. *et al.*, Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease. Lancet 2003, 2017-23.
20. Butterfield D. *et al.*, Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. J Nut Biochem 2002, 444-61.
21. Zamora J., Antioxidantes: Micronutrientes en la lucha por la salud. Rev Chil Nutr. [artículo en internet] 2007. Disponible en :  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182007000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182007000100002&script=sci_arttext)
22. 1999 Julio. Disponible en : [http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/5\\_3\\_2.html](http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/5_3_2.html)
23. Benítez D., Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. Rev Cubana Invest Biomed [artículo en internet] 2006. Disponible en :[http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol25\\_2\\_06/ibi10206.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol25_2_06/ibi10206.htm)
24. Efectos de los antioxidantes en el envejecimiento celular. [artículo en internet] Disponible en:<http://www.monografias.com/trabajos36/antioxidantes/antioxidantes2.shtml#mineral>.
25. International coffee organization positively coffee programme. [artículo en internet] Disponible en:  
<http://www.positivelycoffee.org/docs/public/resources/PCW%20A-OX%20S%20WAT%20final.pdf>
26. Mosquera O. *et al.*, Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. [artículo en internet] 2005. Disponible en:  
<http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/82044231-234.pdf>

27. Bafna A., Mishra S. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. [artículo en internet] Disponible en : <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1310955>
28. Rivero A., Betancort J. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. [artículo en internet] 2006. Disponible en : [http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-VI-3.pdf](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-3.pdf)
29. Kuskoski E. *et al.*, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpas de frutos. [artículo en internet] Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>
30. Parra M., *et al.*, Manual de plantas medicinales. [artículo en internet] Disponible en: <http://www.unesur.edu.ve/unidades/gencon/extension/agricola/Manual%20plantas%20medicinales.pdf>
31. Centro médico adoptógeno. [artículo en internet] Disponible en: <http://www.adaptogeno.com/productos/noni.asp>
32. Pino N., Botánica y screening fitoquímico de doce plantas usadas en medicina tradicional en el Departamento del Chocó, Colombia. [artículo en internet] Disponible en: [http://www.itson.mx/drn/Revista/Vol\\_2\\_2006/Art\\_8\\_Pino-Ben%C3%ADtez.pdf](http://www.itson.mx/drn/Revista/Vol_2_2006/Art_8_Pino-Ben%C3%ADtez.pdf)
33. Biblioteca digital de la universidad de chile. Sistema de servicios de información y biblioteca(SISIB) [artículo en internet] Disponible en: [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/apbot-farm2d/evanswc01/18g.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbot-farm2d/evanswc01/18g.html)
34. Rodríguez *et al.* .Evaluación preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de *Morinda citrifolia* L.Rev Cub Plant Med. 2005. [artículo en internet] Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962005000300002&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962005000300002&lng=pt&nrm=iso)

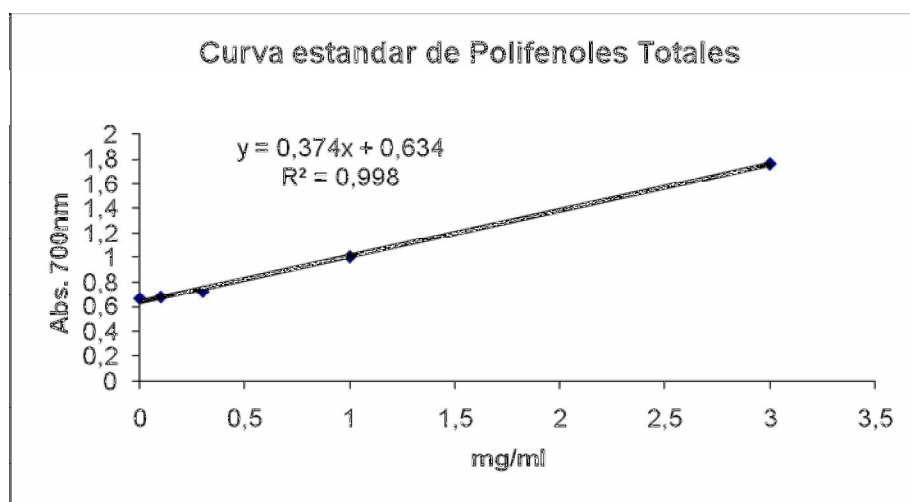
35. Águila B. *et al.* *Morinda citrifolia*. Estudio Farmacognóstico y Fitoquímico preliminar del follaje de diferentes zonas de Cuba. *Rev Cub Farm.* 2004; (Supl Esp) [artículo en internet] Disponible en:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol38\\_4\\_04/far07405.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol38_4_04/far07405.htm).
36. Tosa, H. *et al.*, Antraquinones from *Neonauclea calycina* and their inhibitory activity against DNA topoisomerase II. 1998 [artículo en internet] Disponible en: <http://www.energysil.com/El%20noni,%20propiedades%20y%20uso.pdf>
37. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional de Trujillo, informes semestrales 2004. [artículo en internet] Disponible en:  
<http://www.unitru.edu.pe/oficinas/ogprodein/fac/farmacia.pdf>
38. Revisión científica de la literatura sobre *Morinda citrifolia* L. [artículo en internet] Disponible en: <http://naturdoc.googlepages.com/NONI.pdf>

# ANEXOS



**Gráfico N° 01. CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

mg/ml	Abs. 700 nm
Control	0
Estándares	
0	0,661
0,1	0,675
0,3	0,720
1	1,003
3	1,763



El gráfico indica la concentración de Polifenoles expresadas por los estándares en esa determinada longitud de onda; dando lugar a la ecuación de la línea de tendencia o regresión, en la que “y” representa a cualquier otro punto de absorbancia a 700 nm, y “x” a la Concentración de Polifenoles que expresa el punto “y”.

**Cuadro N° 1**

Muestra	Lecturas	Concentración	Promedio	FD	Cantidad	des est	Error est.	Cant. De Polif.
	Abs. 700 nm	mg/ml	mg/ml		mg/ml			mg/100g
Hojas Noni	1,073	1,174	1,429	100	142,870	0,255349	0,147426	14286,99
	1,264	1,684						
	1,168	1,428						

Muestra	Lecturas	Concentración	Promedio	FD	Cantidad	des est	error est.	Cant. De Polif.
	Abs. 700 nm	mg/ml	mg/ml		mg/ml			mg/100g
Frutos Noni	1,576	2,519	2,643	100	264,349	0,157784	0,091097	26434,94
	1,689	2,821						
	1,603	2,591						

Figura N° 01. Capacidad de Inhibición del Extracto Clorofórmico en 2.5 mg/ml.

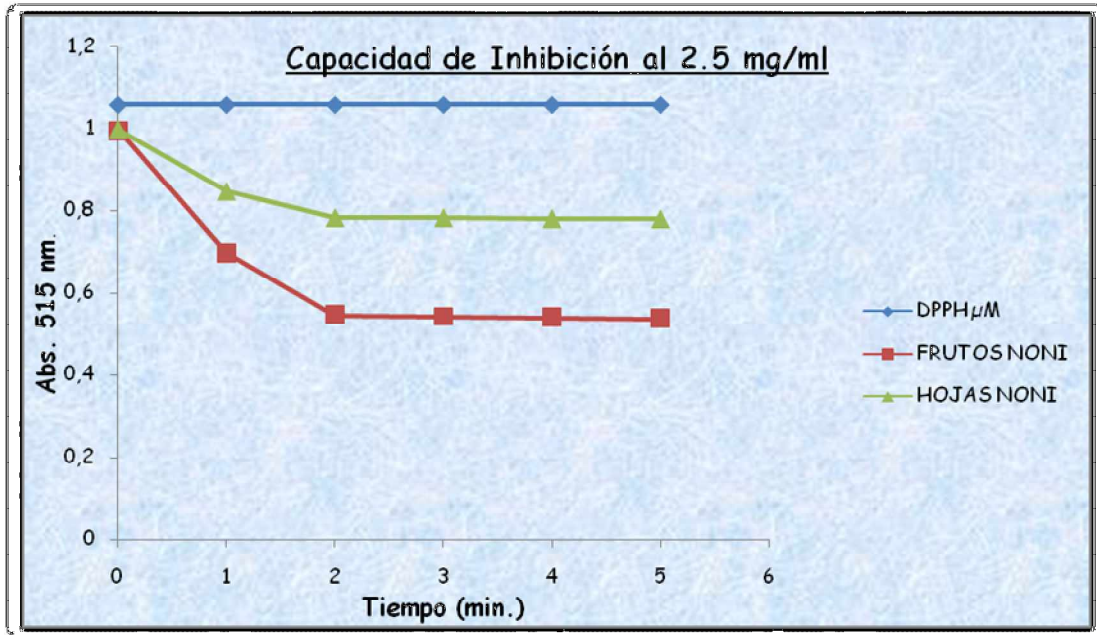


Figura N° 02. Capacidad de Inhibición del Extracto Metanólico en 2.5 mg/ml.

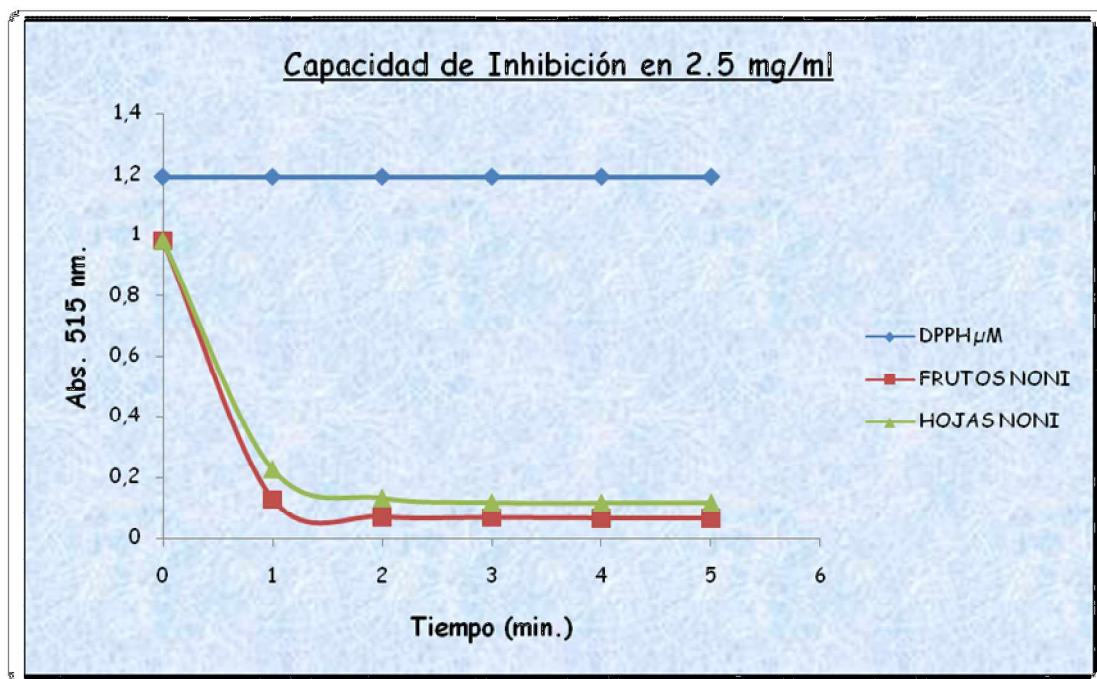
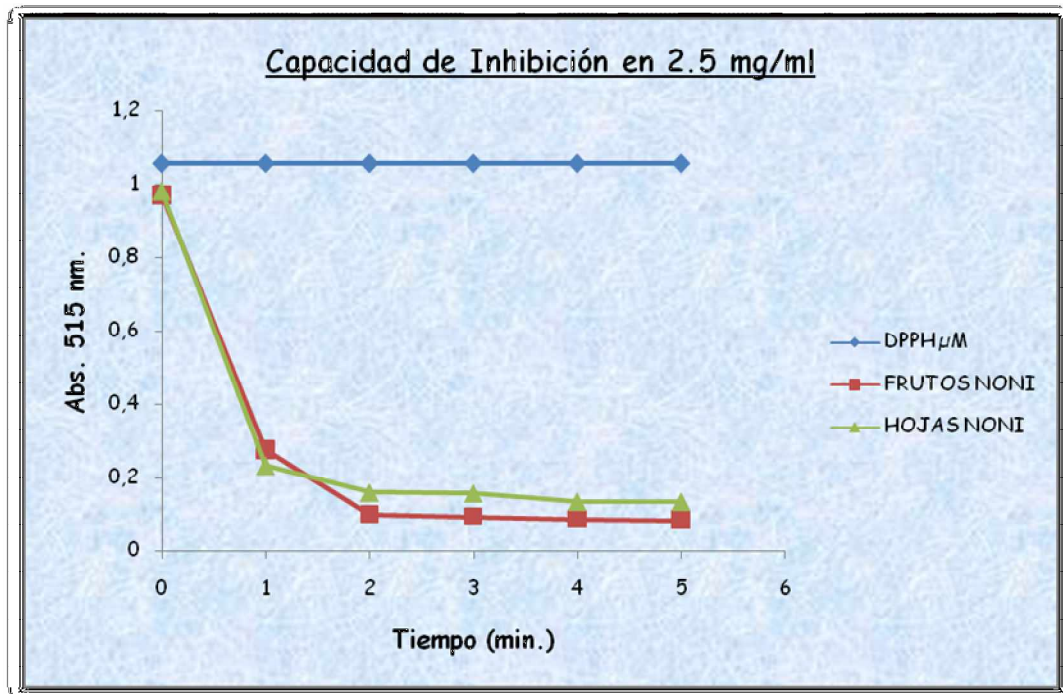


Figura N° 03. Capacidad de Inhibición del Extracto Acuoso en 2.5 mg/ml.



**MÉTODO DE DPPH**

**EXTRACTO METANÓLICO DEL NONI**

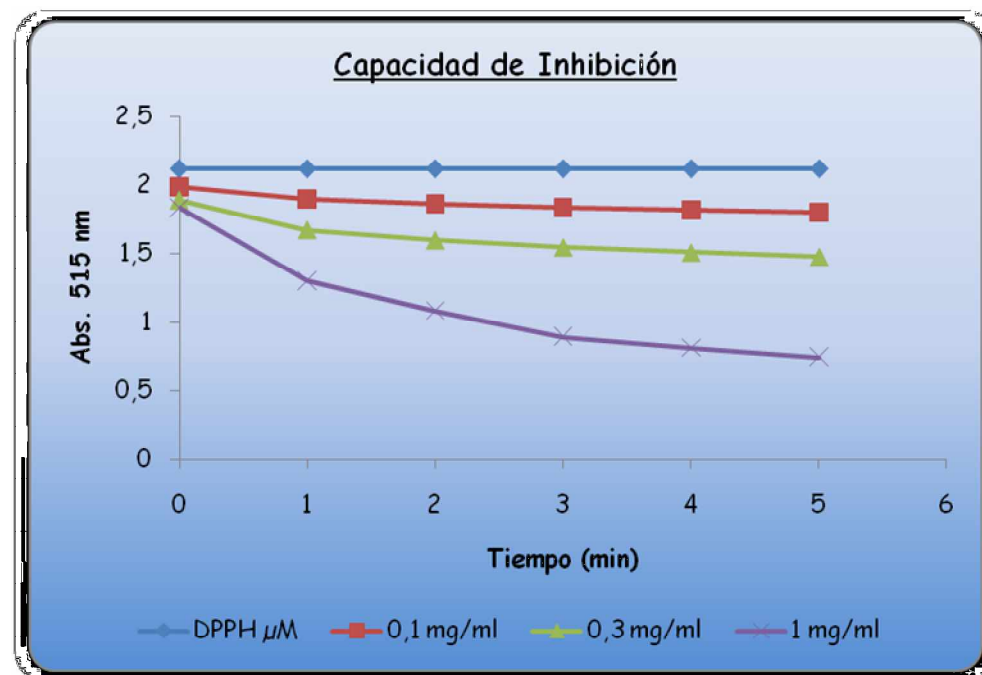
**Cuadro N° 2**

MUESTRAS	DPPH	Extracto metanólico del Fruto del Noni												
		0,1 mg/mL				0,3 mg/mL				Promedio	1 mg/mL			
		1	2	3	Promedio	1	2	3		1	2	3	Promedio	
NONI HOJAS	2,012	1,811	1,818	1,822	1,817	1,754	1,728	1,783	1,755	1,698	1,724	1,736	1,719	
	2,012	1,757	1,761	1,765	1,761	1,527	1,514	1,521	1,521	0,991	0,92	0,915	0,942	
	2,012	1,738	1,741	1,746	1,742	1,48	1,462	1,469	1,470	0,882	0,805	0,799	0,829	
	2,012	1,728	1,728	1,732	1,729	1,447	1,428	1,437	1,437	0,799	0,72	0,715	0,745	
	2,012	1,714	1,718	1,723	1,718	1,425	1,403	1,413	1,414	0,743	0,662	0,654	0,686	
	2,012	1,706	1,71	1,714	1,710	1,405	1,384	1,395	1,395	0,695	0,617	0,607	0,640	
	2,012	1,699	1,703	1,706	1,703	1,389	1,368	1,379	1,379	0,656	0,581	0,567	0,601	
	2,012	1,692	1,697	1,7	1,696	1,376	1,354	1,364	1,365	0,623	0,543	0,534	0,567	
	2,012	1,686	1,692	1,695	1,691	1,365	1,342	1,352	1,353	0,596	0,514	0,507	0,539	
	2,012	1,681	1,687	1,692	1,687	1,356	1,332	1,342	1,343	0,571	0,49	0,483	0,515	
2,012	1,677	1,683	1,687	1,682	1,345	1,322	1,332	1,333	0,551	0,468	0,462	0,494		
Promedio		1,681	1,687	1,691		1,355	1,332	1,342		0,573	0,491	0,484		
% Inhibición		16,434725	16,136514	15,937707		32,637508	33,797217	33,300199		71,537442	75,612989	75,944334		
Promedio		<b>16,1696488</b>				<b>33,2449746</b>				<b>74,3649216</b>				
Desv Est (SD)		0,25016019				0,58182316				2,45426729				
Error Est (SE)		0,14443005				0,33591576				1,41697188				

**Cuadro N° 3**

	DPPH $\mu$ M	0,1 mg/ml	0,3 mg/ml	1 mg/ml
0	2,12	1,985	1,892	1,837
1	2,12	1,895	1,675	1,3
2	2,12	1,86	1,598	1,082
3	2,12	1,836	1,546	0,895
4	2,12	1,817	1,507	0,809
5	2,12	1,802	1,476	0,743

**Figura N° 04**



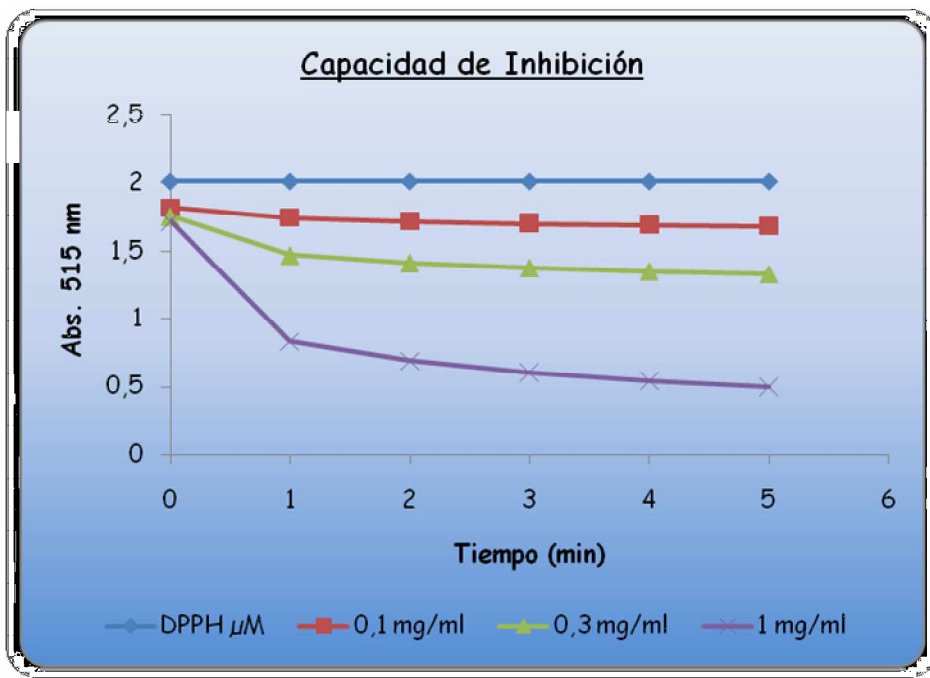
**Cuadro N° 4**

Extracto metanólico de las Hojas del Noni													
MUESTRAS	DPPH	0,1 mg/mL			Promedi o	0,3 mg/mL			Promedi o	1 mg/mL			Promedi o
		1	2	3		1	2	3		1	2	3	
NONI FRUTOS	2,12	1,989	1,977	1,988	1,985	1,884	1,893	1,9	1,892	1,886	1,824	1,801	1,837
	2,12	1,929	1,916	1,925	1,923	1,738	1,748	1,736	1,741	1,625	1,45	1,349	1,475
	2,12	1,899	1,889	1,897	1,895	1,678	1,679	1,668	1,675	1,488	1,231	1,18	1,300
	2,12	1,881	1,868	1,877	1,875	1,634	1,631	1,627	1,631	1,371	1,098	1,074	1,181
	2,12	1,866	1,853	1,862	1,860	1,603	1,597	1,594	1,598	1,235	1,014	0,996	1,082
	2,12	1,852	1,84	1,85	1,847	1,577	1,56	1,566	1,568	1,034	0,949	0,93	0,971
	2,12	1,841	1,829	1,838	1,836	1,555	1,539	1,543	1,546	0,91	0,897	0,879	0,895
	2,12	1,832	1,819	1,828	1,826	1,534	1,519	1,523	1,525	0,859	0,854	0,837	0,850
	2,12	1,823	1,809	1,819	1,817	1,515	1,501	1,505	1,507	0,817	0,809	0,8	0,809
	2,12	1,815	1,802	1,811	1,809	1,499	1,484	1,487	1,490	0,78	0,775	0,769	0,775
2,12	1,807	1,794	1,804	1,802	1,485	1,469	1,473	1,476	0,749	0,745	0,736	0,743	
Promedio		1,815	1,802	1,811		1,500	1,485	1,488		0,782	0,776	0,768	
% Inhibición		14,38679 2	15,015723 8	14,55974 8		29,26100 6	29,968553 7	29,79559 7		63,11320 8	63,380503 2	63,75786 2	
Promedio		<b>14,654088</b> 1				<b>29,675052</b> 4				<b>63,417190</b> 8			
Desv Est (SD)		0,3249053 2				0,3688551 9				0,3238891 9			
Error Est (SE)		0,1875841 7				0,2129585 9				0,1869975 1			

**Cuadro N° 5**

	DPPH $\mu$ M	0,1 mg/ml	0,3 mg/ml	1 mg/ml
0	2,012	1,817	1,755	1,719
1	2,012	1,742	1,47	0,829
2	2,012	1,718	1,414	0,686
3	2,012	1,703	1,379	0,601
4	2,012	1,691	1,353	0,539
5	2,012	1,682	1,333	0,494

**Figura N° 05**



**EXTRACTO ACUOSO DEL NONI**

**Cuadro N° 6**

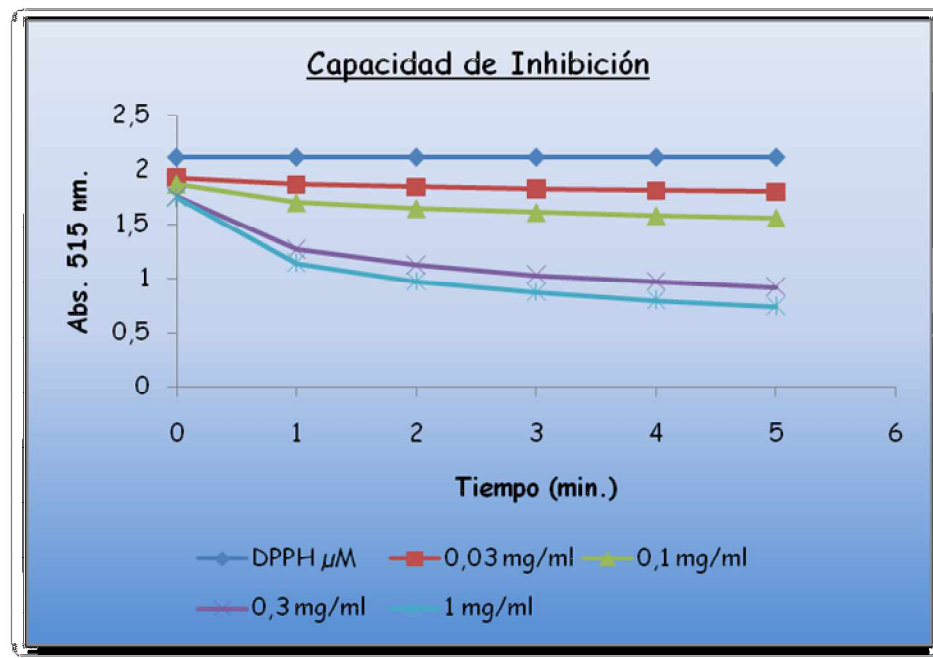
MUESTRAS	DPP H	Extracto Acuoso de los Frutos de NONI											
		0,1 mg/mL				0,3 mg/mL				1 mg/mL			
		1	2	3	Promedi o	1	2	3	Promedi o	1	2	3	Promedi o
<b>FRUTOS NONI</b>	<b>2,012</b>	1,749	1,745	1,868	1,787	1,864	1,861	1,859	1,861	1,795	1,786	1,791	1,791
	<b>2,012</b>	1,639	1,626	1,634	1,633	1,239	1,234	1,243	1,239	1,286	1,279	1,295	1,287
	<b>2,012</b>	1,596	1,581	1,589	1,589	1,109	1,111	1,124	1,115	0,985	0,973	0,977	0,978
	<b>2,012</b>	1,569	1,552	1,557	1,559	1,029	1,029	1,044	1,034	0,976	0,97	0,968	0,971
	<b>2,012</b>	1,548	1,529	1,539	1,539	0,969	0,969	0,985	0,974	0,893	0,895	0,893	0,894
	<b>2,012</b>	1,532	1,509	1,52	1,520	0,92	0,918	0,934	0,924	0,802	0,807	0,799	0,803
	<b>2,012</b>	1,519	1,496	1,507	1,507	0,879	0,877	0,897	0,884	0,775	0,771	0,769	0,772
	<b>2,012</b>	1,508	1,484	1,495	1,496	0,845	0,841	0,863	0,850	0,763	0,765	0,762	0,763
	<b>2,012</b>	1,499	1,476	1,484	1,486	0,816	0,812	0,835	0,821	0,763	0,765	0,757	0,762
	<b>2,012</b>	1,492	1,468	1,477	1,479	0,792	0,787	0,81	0,796	0,756	0,762	0,751	0,756
<b>2,012</b>	1,486	1,463	1,468	1,472	0,768	0,766	0,789	0,774	0,756	0,762	0,756	0,758	
Promedio		1,492	1,469	1,476		0,792	0,788	0,811		0,758	0,763	0,755	
% Inhibición		25,82836 3	26,988072	26,62359 2		60,63618 3	60,818423	59,67528 2		62,30947 6	62,077535	62,49171 6	
Promedio		<b>26,480008 8</b>				<b>60,376629 1</b>				<b>62,292909</b>			
Desv Est (SD)		0,5930370 6				0,6141816 1				0,2075872 1			
Error Est (SE)		0,3423901				0,3545979 2				0,1198505 3			



**Cuadro N° 7**

	DPPH $\mu\text{M}$	0,03 mg/ml	0,1 mg/ml	0,3 mg/ml	1 mg/ml
0	2,12	1,931	1,871	1,76	1,753
1	2,12	1,868	1,705	1,273	1,147
2	2,12	1,844	1,651	1,129	0,975
3	2,12	1,826	1,614	1,039	0,875
4	2,12	1,813	1,587	0,976	0,803
5	2,12	1,802	1,564	0,925	0,747

**Figura N° 06**



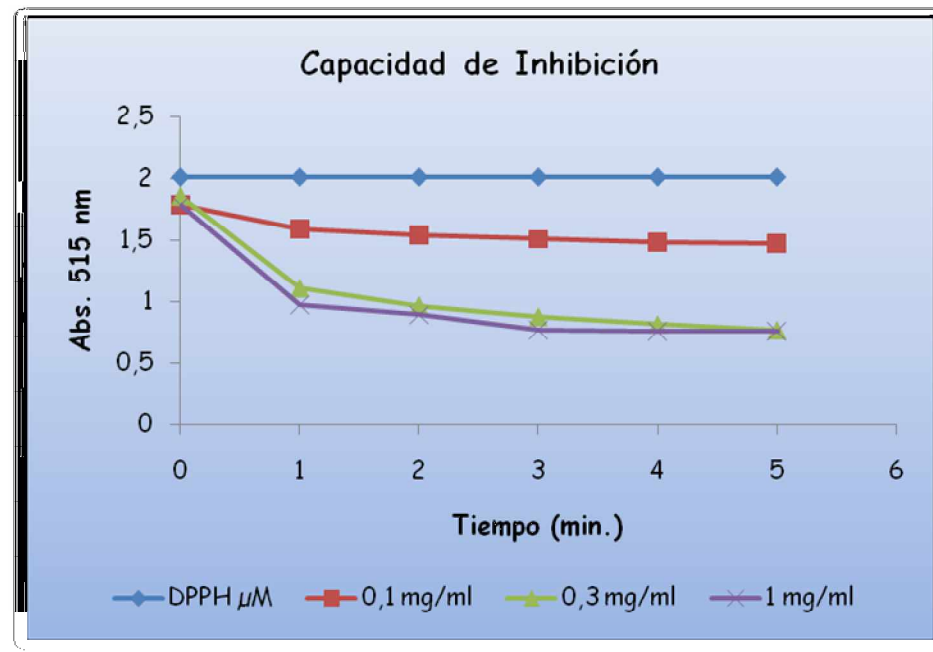
**Cuadro N° 8**

MUESTRAS	DPPH	Extracto Acuoso de las Hojas de NONI															Promedio
		0,03 mg/mL				0,1 mg/mL				0,3 mg/mL				1 mg/MI			
		1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio	1	2	3	
HOJAS NONI	2,12	1,97	1,886	1,937	1,931	1,843	1,894	1,877	1,871	1,758	1,684	1,837	1,760	1,745	1,76	1,781	1,753
	2,12	1,914	1,848	1,896	1,886	1,721	1,769	1,763	1,751	1,39	1,381	1,428	1,400	1,332	1,268	1,297	1,300
	2,12	1,896	1,83	1,878	1,868	1,674	1,724	1,718	1,705	1,254	1,269	1,296	1,273	1,19	1,103	1,134	1,147
	2,12	1,883	1,817	1,864	1,855	1,644	1,694	1,688	1,675	1,17	1,191	1,208	1,190	1,099	0,995	0,993	1,047
	2,12	1,872	1,807	1,853	1,844	1,619	1,67	1,665	1,651	1,107	1,132	1,149	1,129	1,032	0,918	0,916	0,975
	2,12	1,864	1,798	1,843	1,835	1,599	1,65	1,645	1,631	1,055	1,089	1,1	1,081	0,977	0,861	0,896	0,919
	2,12	1,854	1,789	1,835	1,826	1,581	1,633	1,628	1,614	1,014	1,044	1,06	1,039	0,934	0,815	0,863	0,875
	2,12	1,847	1,782	1,829	1,819	1,566	1,619	1,613	1,599	0,98	1,01	1,026	1,005	0,897	0,774	0,805	0,836
	2,12	1,842	1,776	1,822	1,813	1,553	1,606	1,601	1,587	0,949	0,982	0,996	0,976	0,865	0,74	0,782	0,803
	2,12	1,836	1,771	1,817	1,808	1,541	1,594	1,589	1,575	0,923	0,957	0,967	0,949	0,836	0,71	0,732	0,773
2,12	1,83	1,766	1,811	1,802	1,53	1,585	1,578	1,564	0,899	0,934	0,943	0,925	0,81	0,683	0,699	0,747	
Promedio		1,836	1,771	1,817		1,541	1,595	1,589		0,924	0,958	0,969		0,837	0,711	0,738	
% Inhibición		13,396 226	16,462 264	14,308 176		27,295 597	24,764 151	25,031 447		56,430 818	54,827 044	54,308 176		60,518 868	66,462 264	65,204 403	
Promedio		<b>14,722 2222</b>				<b>25,697 065</b>				<b>55,188 6792</b>				<b>64,061 8449</b>			
Desv Est (SD)		1,5743 9591				1,3908 06				1,1065 653				3,1321 0283			
Error Est (SE)		0,9089 779				0,8029 8222				0,6388 7578				1,8083 2041			

**Cuadro N° 9**

	DPPH $\mu$ M	0,1 mg/ml	0,3 mg/ml	1 mg/ml
0	2,012	1,787	1,861	1,791
1	2,012	1,589	1,115	0,978
2	2,012	1,539	0,974	0,894
3	2,012	1,507	0,884	0,772
4	2,012	1,486	0,821	0,762
5	2,012	1,472	0,774	0,758

**Figura N° 07**



**MINERALES**

**Cuadro N° 10**

Muestras	Peso Crisol	Peso Crisol + Ceniza	Peso Muestra	% CENIZA	CONC. Cu	CONC. Se	CONC. Zn
	W1	W2	W3		mg	mg	mg
FRUTO NONI	14,2567	14,3767	2	6,0	,0.12	0.67	0.23
HOJAS NONI	13,8942	14,0002	2	5,4	0.14	0.08	0.003