

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Catherine Arteaga Larumbe

Matrícula : 208357542 Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica

Domicilio : Calle 6 de Enero #698, Col. La Laja. Acapulco, Guerrero. C.P. 39600

Teléfono : Celular : 5558187707

Correo Electrónico : catherinelarumbea@gmail.com CURP : AELC891211MGRRT06

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO POR LAS ACTIVIDADES ANTIINFLAMATORIA Y ANALGÉSICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE Morinda citrifolia L. (Rubiaceae).

Lugar donde se realizó el Servicio Social : DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS EDIFICIO N, LABORATORIO N015.

Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Entidad Federativa : Distrito Federal

Municipio : Coyoacán Localidad : Col. Villa Quietud

Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	14	3	2013		14	09	2013

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo Tipo: 2.- Interno

Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición

FIRMAS

Juan Francisco Palacios E.
Juan Francisco Palacios Espinosa 36434

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Catherine Arteaga Larumbe
Catherine Arteaga Larumbe
Alumno
Nombre, firma

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Alma Elena Ibarra Cazares
Alma Elena Ibarra Cazares
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

No. de páginas: 57

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos, Edificio N, Laboratorio N015.

Prácticas realizadas en: Departamento de Sistemas Biológicos, Edificio N, Laboratorio N015.

Proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

Contiene:

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Fotografías | <input checked="" type="checkbox"/> Ilustraciones |
| <input checked="" type="checkbox"/> Gráficas | <input type="checkbox"/> Mapas |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tablas | <input checked="" type="checkbox"/> Diagramas |
| <input type="checkbox"/> Trípticos | |

Vo.Bo. Asesor: Francisco Palacios E.

Fecha liberación texto completo: 20210300

NOTA: La versión digital de este reporte, solo podrá ser consultada en cualquier Unidad académica de la Universidad, incluyendo a Rectoría General



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
U
División de Ci

Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica I

Estudio fitoquímico biodirigido por las a
y analgésica de los extractos metanólic
Morinda citrifolia L. (R

Arteaga Larumbe, Catherine

Asesores

Interno: Palacios Espinosa Juan Francisco

Sistemas Biológicos
Química Farmacéutica Biológica

Estudio fitoquímico biodirigido por las actividades antiinflamatoria y analgésica de los extractos metanólico y a
Morinda citrifolia L. (Rubiaceae).

Arteaga Larumbe, Catherine 208357542

Interno: Palacios Espinosa Juan Francisco

08 de Marzo de 2021

57

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos, Edificio N, I

Departamento de Sistemas Biológicos, Edificio N, Laboratorio N015.

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

X
X
X

X
X

20210300

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO POR LAS ACTIVIDADES
ANTIINFLAMATORIA Y ANALGÉSICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y
ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae).

Catherine Arteaga Larumbe 208357542

ASESOR(ES): Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa.

Marzo, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO POR LAS ACTIVIDADES
ANTIINFLAMATORIA Y ANALGÉSICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y
ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae).

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

"Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos"

Alumno: Catherine Arteaga Larumbe. Matrícula: 208357542

Asesores(es): Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa.

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Departamento de Sistemas Biológico, Edificio "N", laboratorio N015.

Fechas de inicio y terminación del S.S. 14 de marzo de 2013 a 14 de septiembre de 2013

Marzo, 2021.

ÍNDICE

I. RESUMEN	5
II. ANTECEDENTES.....	6
II.1 Generalidades del dolor.....	6
II.1.1 Proceso nociceptivo.....	6
II.1.2 Dolor crónico.....	7
II.1.3 Estructuras cerebrales involucradas en modulación descendente de la nocicepción.	10
II.1.4 Sustancia gris periacueductal (PAG).....	10
II.1.5 <i>Locus ceruleus</i> (LC).....	11
II.1.6 Región rostral ventromedial bulbar.....	12
II.2 Modelos de dolor en animales.....	12
II.2.1 Modelos de dolor agudo.....	12
II.2.2 Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA	13
II.2.3 Modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético.....	14
II.3 Generalidades de la inflamación	14
II.3.1 Vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos	15
II.3.2 Emigración de las células fagocitarias	16
II.4 Medicina herbolaria.....	17
II.5 <i>Morinda citrifolia</i> Lin (Rubiaceae)	19
II.5.1 Antecedentes históricos.....	19
II.5.2 Clasificación taxonómica	19
II.5.3 Características botánicas	19
II.5.4 Flor	20
II.5.5 Frutos.....	20
II.5.6 Semillas	20
II.5.7 Componentes fitoquímicos.....	20
II.6 Efectos biológicos de <i>M. citrifolia</i> L.	32
II.6.1 Actividad antibacteriana.....	32
II.6.2 Actividad antiviral.....	32
II.6.3 Efectos anti-tuberculosos	32
II.6.4 Actividad antitumoral.....	33
II.6.5 Actividad antihelmíntica	33
II.6.6 Actividad analgésica	33

II.6.7 Actividad hipotensora	33
II.6.8 Actividad inmunológica	34
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVOS	34
IV.1 General.....	34
IV.2 Particulares.....	34
V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	35
V.1 Obtención y procesamiento del material vegetal	35
V.1.1 Preparación de los extractos metanólico (MCLM) y acuoso (MCLA).....	35
V.1.2 Fraccionamiento de los extractos	35
V.1.3 Fraccionamiento secundario	36
V.1.4 Fraccionamiento terciario	38
V.2 Evaluaciones toxicológicas y farmacológicas generales.....	40
V.2.1 Animales de experimentación.....	40
V.2.2 Toxicidad <i>in vivo</i> por la Prueba de Lorke	41
V.2.3 Prueba del edema auricular inducido por xilol o esteres de forbol (TPA) en ratones	41
V.2.4 Prueba de estiramiento abdominal inducido por ácido acético al 0.7%.....	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
VI.1 Evaluación de la toxicidad aguda.	43
VI.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo del edema auricular inducido con TPA en ratones.....	46
VI.3 Evaluación de la actividad analgésica en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético al 0.7%.	47
VII. CONCLUSIONES.....	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA	51

I. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad la preparación, estudio fitoquímico y evaluación biológica (antiinflamatoria y antinociceptiva) de dos extractos de alta polaridad (metanólico y acuoso), a partir de las hojas del Noni (*Morinda citrifolia* L.) de una colecta obtenida en Coyuquilla, Estado de Guerrero. El extracto acuoso se obtuvo por medio de una infusión de hojas secas y trituradas de *M. citrifolia* Linn, que finalmente fue liofilizada, mientras que el extracto metanólico se preparó por un proceso de maceración del material vegetal con disolvente grado reactivo.

Los extractos polares, se evaluaron empleando tres pruebas biológicas; estimación de la toxicidad aguda, prueba de edema auricular inducido con TPA y, prueba de estiramiento abdominal inducido con ácido acético al 0.7 %, todas realizadas en ratones CD-1 obtenidos del UPEAL-bioterio de la UAM Xochimilco. Posteriormente, el extracto más activo, se procedió a realizar su fraccionamiento por medio de cromatografía en columna abierta. El extracto metanólico presentó el mayor efecto analgésico y antiinflamatorio, realizando fraccionamientos sucesivos con la finalidad de identificar al o los compuestos responsables de estos efectos biológicos. A través de la cromatografía en capa fina (CCF) y con base en su similitud cromatográfica, se realizaron las reuniones de fracciones, dando 10 fracciones secundarias finales. Estas fueron evaluadas empleando el modelo de edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA, con la finalidad de determinar la fracción o fracciones que presentaran en mayor proporción las actividades biológicas antiinflamatoria y analgésica. Las fracciones IV y V mostraron un efecto antiinflamatorio más significativo en comparación con el control negativo que fue el vehículo (acetona).

II. ANTECEDENTES

II.1 GENERALIDADES DEL DOLOR

El dolor es una sensación emocional desagradable, que alerta al organismo de que algo no está bien. La sensación de dolor se percibe a través de la activación de nociceptores que se encuentran en diferentes partes del organismo ya sea en los órganos o tejidos, llevando la información nociceptiva al Sistema Nervioso Central (SNC).

El dolor puede ser clasificado en agudo y crónico. El dolor agudo es de menor duración, se puede focalizar y su causa es identificable. El dolor crónico es constante, y es característico de una enfermedad; no tiene propósito alguno para el organismo y produce desajustes psicológicos en los pacientes.

También puede ser clasificado por su etiología en nociceptivo y neuropático. El primero es consecuencia de la activación de nociceptores a nivel somático o visceral, mientras que el neuropático, se da por lesiones o alteraciones directas de los nervios del SNC o del Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Salas., 2007).

II.1.1 Proceso nociceptivo

Un estímulo nocivo ya sea químico, térmico, de presión o de cualquier otro factor que pueda producir dolor, es percibido por estructuras sensibles llamadas nociceptores, que son terminaciones nerviosas libres, formadas por proteínas variadas y especializadas, que se comportan como receptores de la información nociceptiva y la transmiten al SNC por fibras de tipo A δ y C. Estos receptores pueden ser canales iónicos (modifican el tránsito de iones dentro y fuera de la neurona) o receptores metabotrópicos (generan cambios en la síntesis de proteínas citoplásmicas). Los receptores vanilloides, que agrupan la información relacionada con la temperatura y los cambios de pH, pertenecen al grupo de los receptores iónicos, mientras que algunos receptores purinérgicos, es decir, sensibles a la unión de adenosintrifosfato (ATP), son metabotrópicos. Una vez estimulados, los nociceptores inducen cambios en la carga eléctrica de la membrana neuronal, consiguiendo la propagación del estímulo nervioso hasta el asta dorsal de la médula (figura 1). Allí se libera glutamato, un aminoácido excitador que se acopla a un receptor específico, denominado AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y localizado en una neurona postsináptica, transmitiendo la información hacia los centros superiores del SNC, hasta el tálamo y la corteza cerebral. En los núcleos superiores, las vías descendentes que llegan de nuevo al asta dorsal de la médula y liberan sustancias endógenas inhibitoras [fundamentalmente opioides endógenos y GABA (ácido gamma-aminobutírico)] son puestas en marcha. Estas sustancias inhibitoras actúan modificando la transmisión del estímulo, mediante la disminución de la liberación de glutamato y por otro lado hiperpolarizando la membrana de la neurona postsináptica. También intervienen interneuronas inhibitoras, que imitan y potencian el efecto inhibitor de las vías descendentes.

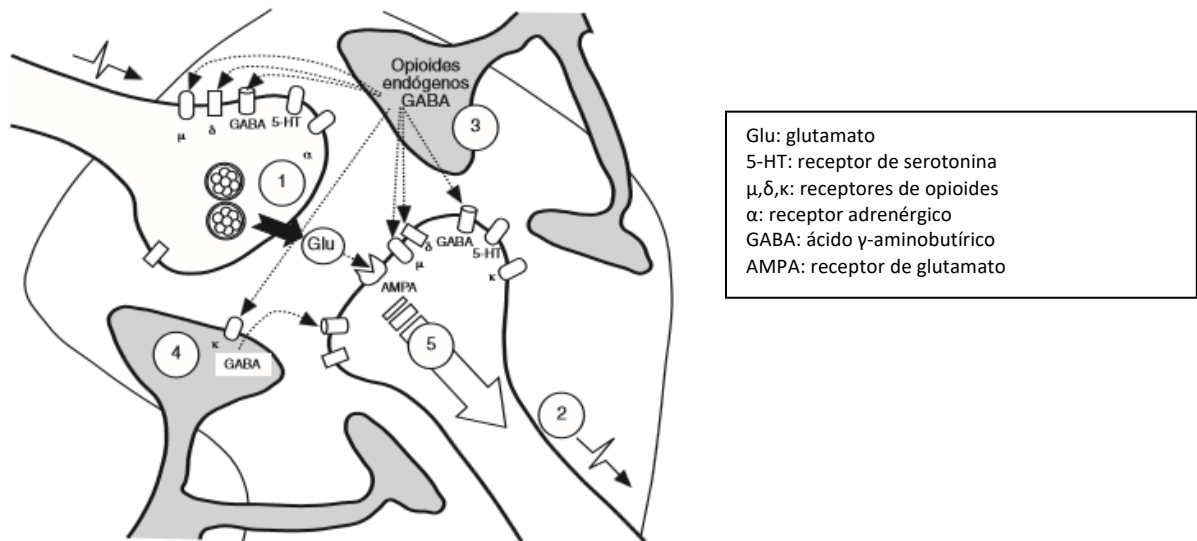


Figura 1. Modulación de la información nociceptiva en la asta dorsal de la médula espinal. La flecha negra indica liberación y las flechas punteadas, unión a receptor. 1: liberación de glutamato; 2: transmisión a los centros superiores; 3: liberación de sustancias inhibitoras desde las vías ascendentes; 4: liberación de sustancias inhibitoras desde las interneuronas; 5: transmisión de la señal modulada al sistema nervioso central (Tomada y modificada de: Salas, 2007).

II.1.2 Dolor crónico

Cuando existe dolor crónico, la “lógica dolorosa” se desvanece y no hay relación entre el estímulo doloroso y la respuesta que causa en el SNC: se genera una amplificación de la señal nociceptiva, que se conoce como sensibilización neuronal, por lo que la información transmitida al cerebro origina una reacción dolorosa desproporcionada, y se produce tanto a nivel periférico como a nivel central.

Sensibilización periférica

Al haber dolor crónico, sea inflamatorio o neuropático, la periferia manda información nociceptiva hacia el asta dorsal de la médula, y la propia neurona envía, desde su soma, vesículas que liberan tanto sustancia P como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP); al ser liberadas en la periferia, se unen a receptores localizados en distintas células relacionadas con el proceso inflamatorio, como son neutrófilos, mastocitos y basófilos, causando la liberación de una serie de sustancias proinflamatorias (citocinas, bradicinina, histamina) (figura 2). Además, se favorece la síntesis de otras, como las ciclooxigenasas (COX), que promueven la síntesis de prostaglandinas y eicosanoides. También se liberan factores tróficos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF). También se ha descrito que los neutrófilos pueden liberar pequeñas cantidades de opioides endógenos en un intento de regular la respuesta nociceptiva que se produce en la periferia. Todo este “caldo inflamatorio” produce cambios de pH, liberación de ATP de las células lesionadas, síntesis y liberación de óxido nítrico (NO), etc., generando la amplificación de la señal hacia la médula espinal y los centros superiores, originando lo que se conoce como sensibilización periférica, que contribuye de forma integral al mantenimiento del dolor crónico.

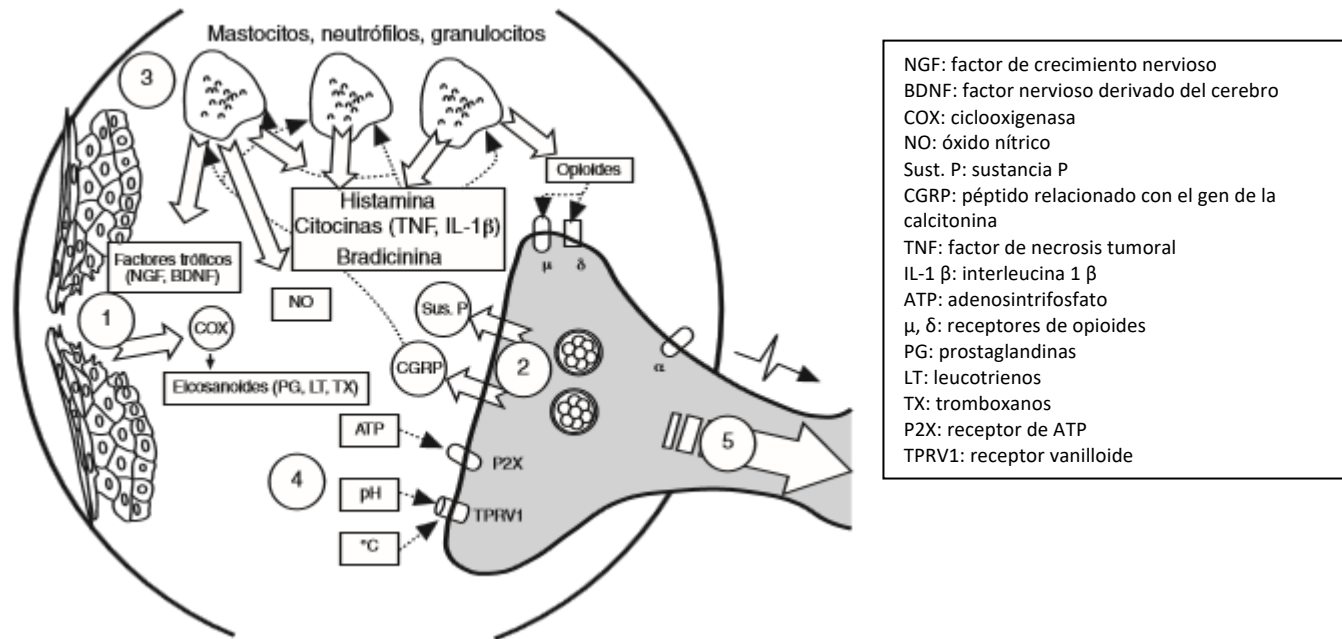


Figura 2. Sensibilización periférica en situaciones de dolor crónico. Las flechas blancas indican liberación y las punteadas, unión a receptor; 1: la lesión origina el envío de información a la asta dorsal; 2: liberación de sustancia P y CGRP; 3: liberación de sustancias pronociceptivas e inflamatorias desde los mastocitos y los neutrófilos; 4: activación de los receptores vanilloides y sensibles a ATP; 5: transmisión de la señal amplificada al sistema nervioso central (Tomada y modificada de: Salas, 2007).

Sensibilización central

Al llegar la señal ampliada desde la periferia, hay un incremento en la liberación de glutamato, que se une a los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), y más tarde al receptor metabotrópico del glutamato. Al activarse, contribuyen a despolarizar la neurona postsináptica, y a generar una serie de cambios intracelulares, con expresión de oncogenes, síntesis de proteínas, activación enzimática (proteincinasas, COX, etc.), que aumentarán la señal nociceptiva. En respuesta a la sensibilización periférica, las vías aferentes primarias también liberan sustancia P (sólo es liberada en dolores crónicos), que se une a los receptores para neurocininas, llamados receptores NK. Entre otros fenómenos adaptativos que se producen en la neurona postsináptica, está el aumento de la síntesis de COX y NO, que son capaces de difundir hacia la neurona presináptica, donde producen un incremento de la señal, el NO activando la liberación de la sustancia P y las COX favoreciendo la síntesis de prostaglandina (PG) E₂, que es una importante sustancia algógena. Cuando hay dolor crónico se produce una reorganización de la estructura neuronal: aparecen ramificaciones colaterales axónicas que incrementan la cantidad de señal nociceptiva aferente (lo que aumenta la liberación de glutamato al espacio intersináptico). Por otro lado, se describe una pérdida de eficacia de la inhibición producida por las vías descendentes, con disminución de la liberación de opioides endógenos, e incluso degeneración celular de dichas neuronas descendentes, lo que de forma indirecta amplifica también la señal nociceptiva que se envía a los centros superiores (figura 3). Todos estos cambios incrementan de forma muy importante y mantenida la señal nociceptiva que se produce en la asta dorsal de la médula, y producen sensibilización central. Las principales manifestaciones clínicas de la sensibilización nerviosa son los fenómenos de hiperalgesia y

alodinia, es decir, una respuesta exagerada tanto a estímulos nociceptivos (hiperalgesia) como a estímulos que en condiciones normales no desencadenarían ninguna respuesta dolorosa (alodinia) (Goicoechea y Martín, 2006).

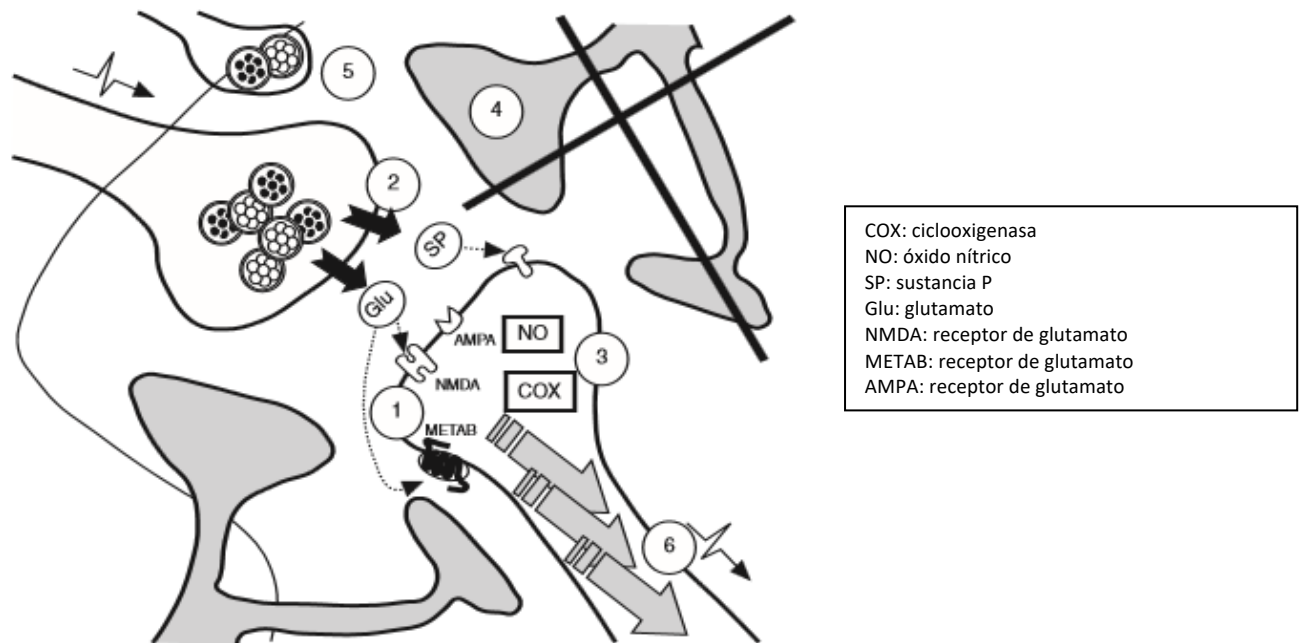


Figura 3. Sensibilización central en la asta dorsal de la médula en situaciones de dolor crónico. Las flechas blancas indican liberación y las punteadas, unión a receptor de glutamato. 1: liberación de glutamato y unión a receptores específicos (NMDA y METAB); 2: liberación de sustancia P; 3: liberación de sustancias pronociceptivas (NO, COX); 4: inhibición de las vías moduladoras centrales; 5: desarrollo de nuevas colaterales axónicas; 6: transmisión de la señal amplificada al sistema nervioso central (Tomada y modificada de: Salas, 2007).

Modulación

Existe relación entre estímulo nocivo y manifestación de dolor, que depende de factores como la excitación, la atención y la expectación, que son influenciados por señales que ayudan a determinar la respuesta apropiada al estímulo nocivo.

La transmisión nociceptiva es centrípeta y ascendente, mientras que el sistema inhibitor endógeno es descendente y centrífugo. Por lo que la analgesia no sólo interrumpe la transmisión nociceptiva, sino que controla y limita esta transmisión para evitar el caos y la inestabilidad que puede producirse de solo existir mecanismos excitatorios.

Las vías que integran el circuito neuronal que regula la transferencia de la información nociceptiva ascendente, abarcan al tronco encefálico en el control de la transmisión a nivel de la asta dorsal de la médula espinal. El resultado de la modulación descendente se puede realizar sobre la sinapsis entre la fibra aferente primaria y la neurona de proyección, o sobre la sinapsis entre las interneuronas y las neuronas de proyección, impidiendo o facilitando la liberación de neurotransmisores del aferente primario o modulando al receptor en la neurona postsináptica.

II.1.3 Estructuras cerebrales involucradas en modulación descendente de la nocicepción

Diversas estructuras supraespinales están involucradas en la modulación descendente de la nocicepción, unas en forma directa, enviando proyecciones hacia la médula espinal o indirectamente proyectando fibras sobre otras regiones del tronco cerebral que se proyectan a las neuronas de la asta dorsal espinal.

Estas estructuras contienen la sustancia gris periacueductal (PAG) a nivel del mesencéfalo, y en la protuberancia el *locus coeruleus* (LC). En la región rostral ventro medial del bulbo raquídeo (RVM); los núcleos del rafe, núcleo *para-gigantocefalar* lateral, *alfa-gigantocefalar*. Estructuras del diencefalo, tálamo e hipotálamo también participan en la modulación de la información nociceptiva.

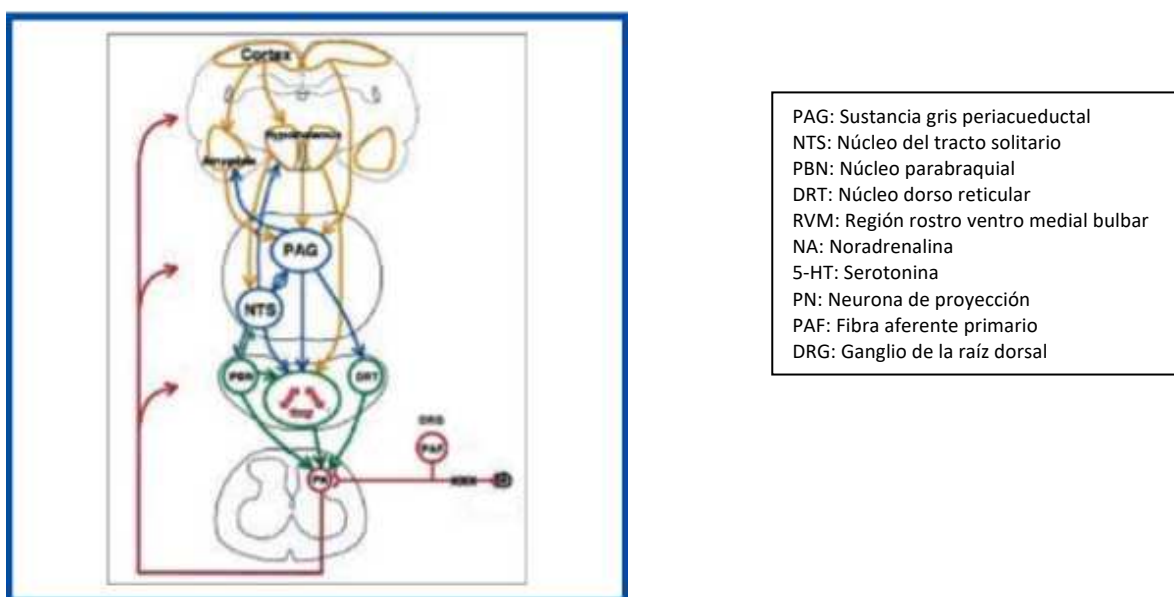


Figura 4. Interrelación entre estructuras cerebrales involucradas en el inicio y la modulación del control descendente de la información nociceptiva (Tomada y modificada de: Goicoechea y Martín, 2006).

II.1.4 Sustancia gris periacueductal (PAG)

La estimulación focal de la sustancia gris periacueductal inhibe los reflejos inducidos por la estimulación nociva. El estímulo eléctrico activaría circuitos neuronales bloqueando en parte, la transmisión de la información nociceptiva desde la médula espinal. Esta analgesia parece ser específica y no se asocia con una inhibición generalizada de la información sensorial ascendente, ya que se mantiene la respuesta al tacto, la presión y la temperatura del área anestesiada.

Las agrupaciones neuronales de la PAG están organizadas en columnas longitudinales que constituyen las reacciones defensivas, la analgesia y la regulación autonómica, ajustando blancos específicos en el circuito neuronal columnar.

La PAG recibe proyecciones neuronales de las láminas I, II y V del asta dorsal, así como de varias áreas cerebrales implicadas en funciones sensoriales, afectivas, motivacionales de la corteza; y de núcleos localizados en el diencefalo (núcleo talámico-parafascicular, núcleo dorsal premamilar, núcleo dorsomedial y ventromedial hipotalámico, parte ventral del hipotálamo anterior, núcleo arcuato) y del tronco encefálico (formación reticular, núcleo del *rafe magnus*, *locus coeruleus*, núcleo ventral parabraquial). Otras aferencias provienen del área preóptica medial, septum lateral y corteza cingulada anterior.

Las fibras que se originan en la región de la PAG, proyectan sobre estructuras en el tronco encefálico y parecen hacerlo sobre la asta dorsal de la médula espinal; uno de los destinos de las proyecciones sobre el tronco encefálico es el área rostral y medial del *locus coeruleus* en la protuberancia.

La estimulación de la PAG con pulsos eléctricos induce una marcada actividad neuronal en estas áreas, sin embargo, la estimulación del área ventrolateral de la PAG produce una marcada inhibición de la descarga neuronal del *locus coeruleus*.

Otra de las proyecciones de la PAG es sobre núcleos de la región rostro ventral medial del bulbo raquídeo (RVM). En animales de experimentación, al usar técnicas de marcaje, se observa que fibras de la PAG terminan en el *núcleo para-gigantocelular*. La estimulación de la PAG incrementa la actividad neuronal en el núcleo del *rafemagnus*, en particular en neuronas serotoninérgicas.

Debido a las escasas fibras directas desde la PAG a la médula espinal, su acción moduladora descendente parece realizarse a través de los núcleos localizados en la región RVM. Las fibras de estos núcleos descienden junto con las de la PAG que proyectan sobre la médula espinal, en el funículo dorsolateral (DLF), aunque algunas lo pueden hacer por el funículo ventrolateral y establecen conexiones inhibitorias con neuronas de las láminas I, II y V de la asta dorsal.

Experimentalmente, se ha encontrado una alta densidad de receptores opiáceos en la sustancia PAG, así como en otras estructuras supraespinales. Los principales receptores se han identificado como mu (μ), delta (Δ), kappa (κ). En la PAG estos receptores se localizan en diversas regiones, esto sugiere una respuesta antinociceptiva selectiva y mecanismos de modulación para un tipo particular de dolor.

II.1.5 Locus coeruleus (LC)

El *locus coeruleus* al ser una estructura bilateral adyacente al cuarto ventrículo a nivel de la protuberancia, percibe las mayores proyecciones de los núcleos *paragigantocelular* y del núcleo *prepósito hipogloso*, ambos en el bulbo raquídeo. No recibe directamente fibras de la PAG, pero puede ser influenciado por ésta, a través de la *vía paragigantocelular*.

El LC es considerado el mayor núcleo noradrenérgico implicado en el control descendente del dolor. La actividad celular del LC está bajo control de autorreceptores α_2 presinápticos, estos receptores están modulados por la noradrenalina (NA), es decir, cuando los receptores α_2 presinápticos reconocen la NA, dificultan su liberación. Por lo tanto, los agonistas α y los agentes opiáceos producen analgesia, mientras que agentes inhibidores de la descarga celular tendrán una acción

hiperalgésica. La estimulación eléctrica del LC provoca despolarización de aquellas motoneuronas de la médula espinal, que son parcialmente bloqueadas por el antagonista 1 adrenérgicos.

II.1.6 Región rostral ventromedial bulbar

La región rostral ventromedial bulbar (RVM), contiene en la línea media el núcleo *rafe magnus* (NRM) y en la porción adyacente de la formación reticular el *núcleo gigantocelular para alfa* y el *núcleo paragigantocelular lateralis*. La RVM alberga proyecciones de la PAG; mientras que las fibras eferentes de la RVM se extienden bilateralmente a todos los niveles de la médula espinal, en una mayor proporción sobre las neuronas de la asta dorsal. Las neuronas serotoninérgicas de la región RVM proyectan sobre las neuronas de las capas I y II en la misma asta.

El circuito neuronal entre la PAG y la RVM es definitivo en el mecanismo de modulación descendente del dolor. Las proyecciones de PAG sobre la RVM son críticas para que la PAG pueda ejercer su control descendente sobre las neuronas nociceptivas de la asta.

La activación de los diferentes núcleos localizados en la RVM ejerce su acción moduladora sobre la transmisión nociceptiva en la médula espinal, produciendo antinocicepción ante un estímulo nocivo (Salas, 2007).

II.2 MODELOS DE DOLOR EN ANIMALES

Los modelos de dolor en animales permiten que la investigación básica genere información de importancia en referencia al conocimiento del sistema nociceptivo. Debido a que el dolor en el ser humano es complejo, es difícil elaborar algún modelo que pueda valorar cada uno de sus diferentes aspectos; a causa de ello, los modelos experimentales solo estudian aspectos concretos y específicos en diversas condiciones experimentales.

Debe tenerse en cuenta que, al no tener la capacidad para conocer las sensaciones del animal de experimentación, deben estudiarse las posibles reacciones a los diferentes tipos de estimulación nociceptiva. En este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se evalúa la reacción de un animal a un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida, para usarse en circunstancias fisiológicas o patológicas. Sin embargo, es necesario tener una visión crítica de los modelos, ya que en el animal se valora fundamentalmente la dimensión somática de la respuesta nociceptiva a un estímulo nocivo, mientras que no podemos valorar la dimensión afectivo-emocional inherente al dolor en el ser humano y probablemente en los animales.

II.2.1 Modelos de dolor agudo

Encontrar nuevos tratamientos para el alivio del dolor justifica la utilización de los modelos en animales. Bajo el lema de modelos de dolor agudo enmarcamos los modelos que utilizan un estímulo físico o químico que tienen como fin determinar una latencia de respuesta del animal a dicho estímulo y tienen un desarrollo temporal breve. Entre ellos tenemos el test de la placa caliente (hotplate test), el de retirada de la cola (tailflick test) y el de inmersión de la cola en agua caliente (tail immersion test), que usan un estímulo térmico; el test de presión de la pata (paw pressure test)

o de la cola (tail pressure test) en la rata, que usan un estímulo mecánico; el test de estimulación eléctrica de la cola (electric stimulation of the tail), que usa un estímulo eléctrico; el test del ácido acético (abdominal constriction test) y el test de la formalina (formalin test), que usan un estímulo químico. Utilizando estos modelos, conocemos el umbral nociceptivo del animal, de manera que los parámetros determinados son consecuencia del mecanismo clásico del dolor como reflejo dentro de un marco fisiológico.

En los modelos de dolor agudo se requiere que los estímulos nocivos, tengan unas características concretas para conseguir resultados homogéneos y fiables. En general, para todos los tipos de estímulos nocivos la respuesta varía en función de la intensidad y la duración de la estimulación. Un caso especial se presenta con los estímulos químicos, ya que producen una estimulación lenta que el animal no puede evitar, como sucede en los modelos térmicos, mecánicos o eléctricos. Por ello, para evitar un excesivo sufrimiento de los animales, se los sacrifica una vez realizado el test correspondiente (Micó et al, 2006).

II.2.2 Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA

El TPA es un poderoso agente flogógeno y promotor de tumores que se encuentra en el aceite de croton (*Croton tiglium L.*). La administración tópica de TPA induce un edema agudo con infiltración leucocitaria. El TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa C (PKC), dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La enzima es activada por diacilglicerol (DAG), mediador liberado a partir de fosfolípidos de inositol de la membrana. El TPA y otros ésteres del forbol cuando se intercalan en la membrana pueden actuar como sustitutos del DAG, activando la PKC de forma más permanente que el mediador endógeno, ya que el TPA es difícilmente degradable. La PKC activada actúa a diferentes niveles, incluyendo la liberación de AA, formación de prostanoïdes, incremento de radicales libres y síntesis de diversas proteínas proinflamatorias.

Tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación entre 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor como consecuencia de la extravasación de líquido, siendo el edema máximo a las 6-8 h. Transcurridas 12-14 h el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 h. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de leucocitos PMN a las células endoteliales entre 4-6 h, y migración hacia el tejido y de granulación de mastocitos a partir de las 6 h. Al cabo de 6-24 h comienza el acúmulo de leucocitos en la dermis que dan lugar a abscesos subcorneales a las 48-72h. Por último, tras 48-96h se observa hiperplasia en la membrana basal epidérmica, debida al incremento del número de células en división.

El estudio bioquímico demuestra un incremento de AMPc, PGE_2 y $PGE_{2\alpha}$, además de actividad de la enzima ornitín descarboxilasa (ODC) y de síntesis proteica. Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como Indometacina, aunque los inhibidores de la COX, LOX y PLA_2 dan buenos resultados, además de corticoides y antihistamínicos. La ventaja del método es la rapidez y poca muestra necesaria para desarrollar un estudio e incluso una curva dosis-efecto. El principal inconveniente radica en la falta de selectividad, ya que un elevado número de fármacos y sustancias objeto de análisis suelen dar

resultados positivos en este test. Otro problema adicional es que el fármaco se administra junto con el irritante, lo que permitiría conocer un grado de protección, no de curación real (Yuegin, 2007).

II.2.3 Modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético

El estiramiento abdominal es un método químico utilizado para inducir dolor de origen periférico mediante la inyección de principios irritantes como fenilquinona o ácido acético en ratones. La actividad analgésica del compuesto de ensayo se deduce con la disminución en la frecuencia de estiramientos. Las manifestaciones de estiramientos abdominales en ratones fueron descritas por primera vez como un arqueamiento de la espalda, la extensión de las extremidades posteriores y la contracción de la musculatura abdominal. La respuesta de estiramiento se considera como una prueba reflexiva y sin homólogos clínicos, ya que no se puede realizar en humanos y las sensaciones implicadas son desconocidas.

Los estiramientos generados por la administración parenteral de ácido acético en ratones son debidos al dolor profundo de naturaleza endógena que se repiten durante un período prolongado de tiempo. Debido a la naturaleza irritante, estos principios también son propensos a inducir lesiones. Los estiramientos son una respuesta abierta al intenso dolor inducido por principios irritantes a través de nociceptores y se caracteriza por episodios de retracción del abdomen y el estiramiento de las extremidades posteriores. Las señales transmitidas en el SNC en respuesta al dolor debido a la irritación, causa la liberación de mediadores tales como las prostaglandinas que contribuyen a una mayor sensibilidad en los nociceptores (Gawade, 2012).

El número acumulado de estiramientos que manifiesta cada ratón se registradurante 30 minutos, en periodos de 5 minutos hasta completar el tiempo requerido, inmediatamente después de la inyección de ácido acético. Estos datos se expresan en un curso temporal para observar los cambios en el máximo número de estiramientos inducidos, y en una curva de dosis-respuesta para determinar la dosis significativa del compuesto antinociceptivo de ensayo (Martínez et al., 2013).

II.3 GENERALIDADES DE LA INFLAMACIÓN

Cuando las células son dañadas por microorganismos, agentes infecciosos o agentes químicos, la lesión resultante constituye una forma de estrés. La respuesta dada por el tejido lesionado al estrés recibe el nombre de **inflamación**. Se trata de una respuesta defensiva del organismo que suele caracterizarse por cuatro síntomas: **enrojecimiento, dolor, aumento de la temperatura y tumefacción (rubor, dolor, calor y tumor)**. Un quinto síntoma puede ser la **pérdida de función** de la zona lesionada, que depende de la localización y de la magnitud de la lesión. La inflamación ayuda a retirar los microorganismos, toxinas o materiales extraños del lugar de la lesión, evita su propagación a otros órganos y prepara el lugar afectado para su reparación. Es decir, ayuda a restablecer la homeostasis del tejido.

Como la infamación es uno de los sistemas inespecíficos de defensa interna, la respuesta de un tejido a un corte accidental es similar a la que producen otros tipos de lesiones hísticas causadas por quemaduras, radiación o invasión bacteriana o vírica. En todo caso, la inflamación consta de tres

fases básicas: 1) vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, 2) emigración de los fagocitos y 3) reparación.

II.3.1 Vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos

Inmediatamente después de producida la lesión del tejido, los vasos sanguíneos de la zona alterada se dilatan y se hacen más permeables. La **vasodilatación** consiste en un aumento del diámetro de los vasos sanguíneos. El **aumento de la permeabilidad** significa que el vaso permite que pase una mayor cantidad de materiales a través de su pared. La vasodilatación hace posible que el flujo de sangre aumente en la zona lesionada y el aumento de la permeabilidad hace que los materiales defensivos de la sangre pasen a dicha zona. Estos mediadores defensivos son los anticuerpos, los fagocitos y las sustancias químicas que determinan la formación de coágulos. El aumento del flujo sanguíneo también ayuda a eliminar los productos tóxicos liberados por los microorganismos invasores y por las células muertas.

Entre las sustancias que contribuyen a la vasodilatación, al aumento de la permeabilidad y a otros aspectos de la inflamación se encuentran las siguientes:

1. **Histamina:** Esta sustancia existe en muchas células del organismo, sobre todo en los mastocitos del tejido conjuntivo, en los basófilos y en las plaquetas de la sangre. Cuando alguno de estos tipos de células sufre una agresión libera histamina. Los fagocitos (neutrófilo y macrófagos) atraídos al lugar de la lesión también estimulan la liberación de histamina. Esta sustancia produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.
2. **Cininas:** Estos polipéptidos se forman a partir de precursores inactivos de la sangre llamados cininógenos. Inducen vasodilatación y un aumento de la permeabilidad y actúan como agentes quimiotácticos para los fagocitos.
3. **Prostaglandinas (PG):** Estas sustancias, sobre todo las de la serie E, son liberadas por las células lesionadas e intensifican los efectos de la histamina y de las cininas. Las prostaglandinas también estimulan la emigración de los fagocitos a través de las paredes capilares.
4. **Leucotrienos (LT):** Son sustancias producidas por los basófilos y los mastocitos mediante la degradación de los fosfolípidos de la membrana. Producen aumento de la permeabilidad, intervienen en la adherencia y actúan como agentes quimiotácticos para los fagocitos.
5. **Complemento:** Estas proteínas estimulan la liberación de histamina, atraen a los neutrófilos mediante quimiotaxis y estimulan la fagocitosis. También pueden destruir a las bacterias.

A los pocos minutos de producirse la lesión, la dilatación de las arteriolas y el aumento de la permeabilidad capilar producen calor, enrojecimiento y edema (tumefacción). La gran cantidad de sangre caliente que fluye por la zona es la responsable tanto del calor como del enrojecimiento (eritema). Cuando la temperatura local se eleva ligeramente, las reacciones metabólicas se aceleran, lo que libera aún más calor. El edema es consecuencia del aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, que permiten el paso de una mayor cantidad de líquido desde la sangre hacia los tejidos. El dolor, ya sea inmediato o retardado, es un síntoma cardinal de la inflamación y puede ser consecuencia de la lesión de fibras nerviosas o de su irritación por productos químicos tóxicos procedentes de los microorganismos. Las cininas afectan a algunas terminaciones nerviosas,

provocando una gran parte del dolor asociado a la inflamación. Las prostaglandinas intensifican y prolongan dicho dolor. Éste puede ser asimismo consecuencia del aumento de la presión causado por el edema.

La mayor permeabilidad de los capilares permite la salida de los factores de coagulación hacia los tejidos. De este modo se pone en marcha la cascada de coagulación y el fibrinógeno acaba siendo convertido en una malla gruesa e insoluble de hebras de fibrina que localiza y atrapa a los microbios invasores y bloquea su propagación.

II.3.2 Emigración de las células fagocitarias

Alrededor de una hora después de que se inicie el proceso inflamatorio aparecen en escena los fagocitos. Los neutrófilos comienzan a adherirse a la superficie interna del endotelio de los vasos sanguíneos en un proceso llamado **marginación**. A continuación, envían pseudópodos y se introducen a través de los estrechos espacios existentes entre células endoteliales vecinas, pasando a través de las paredes capilares para dirigirse a la zona alterada. Este movimiento recibe el nombre de **diapédesis** o **emigración** y puede realizarse en sólo dos minutos. El movimiento de los neutrófilos depende de la quimiotaxis y estas células son atraídas por los microbios, las cininas, el complemento y por otros neutrófilos. El aporte de neutrófilos se mantiene estable gracias a la producción y liberación de células adicionales por parte de la médula ósea. El aumento del número de leucocitos en la sangre recibe el nombre de **leucocitosis**. Los neutrófilos intentan destruir a los microbios invasores mediante fagocitosis.



Figura 5. Mecanismo de inflamación (Tomada y modificada de: <http://www.vitaminac.com.pe/injektotas/index.php/29-vitamin-c-injektotas-en-el-manejo-de-pacientes-quemados>).

Cuando la respuesta inflamatoria progresa, los monocitos comienzan a seguir a los neutrófilos hacia la zona infectada. Una vez en los tejidos, los monocitos se transforman en macrófagos errantes, con mayor actividad fagocitaria que los macrófagos fijos. Los neutrófilos predominan en las primeras

etapas de la infección, pero tienden a morir rápidamente. Los macrófagos entran en escena horas después. Tienen una capacidad fagocitaria varias veces mayor que la de los neutrófilos y engullen tejido lesionado, neutrófilos agotados y microbios invasores.

Una vez que los fagocitos han retirado el tejido lesionado y los microorganismos, acaban por morir. En unos pocos días, se forma un agregado de fagocitos muertos y restos de tejido lesionado. Esta colección de células muertas y líquido recibe el nombre de **pus**, cuya formación suele continuar hasta que la infección cede. A veces, la pus empuja sobre la superficie del cuerpo o sobre cavidades internas y se dispersa, mientras que en otras ocasiones permanece en el lugar donde se forma incluso después de que la infección haya cesado. En este caso, la pus va siendo destruido de forma gradual a lo largo de varios días y es absorbido por el organismo.

El resultado usual de la respuesta inflamatoria es una rápida localización y destrucción de los patógenos por los neutrófilos y macrófagos reclutados. Cuando el patógeno no es destruido, las células inflamatorias no siguen siendo estimuladas, su número en el sitio se reduce, la producción de citocinas disminuye, la quimioatracción se detiene y la inflamación desaparece (Tortora y Derrickson, 2011).

II.4 MEDICINA HERBOLARIA

En la América precolombina, la medicina azteca, mexica o nahua, y la de otros pueblos mesoamericanos, como los purépechas, los mayas, en el actual México, y los incas, en el actual Perú, habían logrado progresos notables en medicina, herbolaria, educación, astronomía, matemáticas y otras disciplinas, que superaba a la europea y dejaba atónitos a los conquistadores cultos, que llegaron después de la espada, como Francisco Hernández, el Protomédico de Carlos V y de Felipe II. En cuanto al área médica, apoyaban su conducta terapéutica en el conocimiento botánico y sus aplicaciones a la medicina, ya que no sólo conocían las plantas originarias del altiplano sino que en sus diversas incursiones guerreras, al imponer tributos a los pueblos vecinos, cercanos y lejanos, sus representantes obtenían información sobre el uso de otras plantas, como las especies alimentarias, de ornato y medicinales, y las domesticaban incorporándolas a los grandes jardines botánicos de Chapultepec, Texcoco y Oaxtepec hasta lograr su aclimatación y con ello ampliaban el número de ejemplares de la herbolaria médica (Mendoza Patiño et al., 2005).

La medicina herbal es una “práctica que utiliza a uno o varios productos derivados de una planta, con fines curativos y terapéuticos”; este recurso ha sido empleado desde tiempos ancestrales y ha permanecido hasta nuestros días. En México se han inventariado cerca de 4,500 plantas medicinales; y se estima que cerca del 80% de la población las utiliza para el alivio de sus enfermedades. Estos datos, reflejan indirectamente el impacto que esta práctica tiene en la sociedad mexicana. La práctica de la medicina herbal, incluye desde el té hecho en casa, hasta la utilización de productos comercializados de venta al público. Esta diversidad de dosis, presentaciones, combinaciones y vías de administración, favorecen la ocurrencia de efectos adversos, y dificultan la realización de asociaciones directas, entre el consumo de este tipo de medicina con efectos potencialmente deletéreos.

La utilización terapéutica de las plantas medicinales puede variar regionalmente dependiendo de la cosmovisión local; esta situación dificulta la estimación de su frecuencia de consumo. No obstante, es posible que esta prevalencia sea del 10 al 80%; sugiriendo que el empleo de la medicina herbal, es una práctica común en diversas culturas y países. Entre los factores que acercan a los enfermos a esta forma de medicina, destacan los demográficos, cosmogónicos, y socioeconómicos, así como el deseo de los enfermos por tener el control de su salud y el sentimiento de que la medicina convencional les ha fallado. Por ello, es frecuente observar esta tendencia en personas que padecen una afección crónica e incurable (cáncer, diabetes mellitus, artritis y SIDA) (Covarrubias Gómez y Guevara López, 2009).

Los químicos han aislado principios activos, uno o varios, de una sola planta, y los han denominado fármacos o medicamentos y la farmacología se ha encargado de estudiar algunas de sus propiedades en los seres humanos, principalmente, para darles una utilización en las enfermedades diversas que aquejan al hombre. Los medicamentos de origen vegetal son aproximadamente una cuarta parte de los que se encuentran en el mercado, por ejemplo, la morfina (*Papaver somniferum*), la atropina (*Atropa belladonna*), la digitoxina (*Digitalis purpurea*), quinina (*Cinchona pubescens*), cocaína (*Erithroxylum coca*).

La poderosa industria farmacéutica occidental ha tenido que reconocer que muchas de las plantas que se usaron de manera empírica, tal vez durante centurias, tienen efectos útiles, por lo que ha escogido aquellas que pueden ofrecer “mayores beneficios” a los seres humanos y por ello ha elaborado formas farmacéuticas para ser usadas con fines terapéuticos, ya que ello ofrece las posibilidades de importantes beneficios económicos. Así, se han enfocado hacia la herbolaria y han realizado esfuerzos serios para salvar algunos productos vegetales. La estandarización por peso de las plantas en cuanto a los contenidos de principios activos, las cantidades que muestran los efectos benéficos sobre sus efectos adversos y sobre todo la demostración experimental, mediante ensayos clínicos controlados, no sólo contra placebo sino contra los fármacos prototipo de referencia obligada, sigue siendo el punto crítico de que carecen.

Ya es común encontrar cierta cantidad de productos elaborados a base de plantas por las compañías farmacéuticas transnacionales y puestos en el mercado de muchos países en el mundo. A manera de ejemplos: el lúpulo y la valeriana (Ivel®, grageas, extractos estandarizados de 60/250 mg.), como auxiliar en el tratamiento de estados de ansiedad, angustia e insomnio; *Ginko biloba* (Tanakan® comprimidos, 40 mg equivale a 9.6 mg de glucósidos de flavonoides calculados como quercetina y canferol), (tanakan, comprimidos, ayuda a la memoria, Knoll-Abbott); Mirotón (extracto seco de *Adonis vernalis* 10 mg, *Convalaria majalis*, *Nerlum oleander* y *Scilla maritima*, equivalente a 150 U.C.); Rutina (300 mg) y extracto seco de castaña de Indias 100 mg, equivalente a 10 mg de escina, (verisan triplex, grageas, auxiliar en el tratamiento de la circulación venosa, várices y hemorroides, Knoll-Abbott). O algunos otros comercializados para la higiene bucal como: árnica, calcio, sodio y fenol (Arnident, pasta dental, contra el sangrado e inflamación de encías, prevención de caries dental, Grisi); Extracto de árnica (Arniplac, enjuague bucal sabores menta y hierbabuena, de uso previo al cepillado dental) que remueve la placa odontobacteriana. La dioscoria mexicana (cabeza de negro), la *Dioscorea composita* (barbasco) de los cuales se obtiene diosgenina que es la materia prima para obtener un gran número de hormonas, glucocorticoides mineralocorticoides (Mendoza Patiño et al., 2005).

II.5 *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)

II.5.1 Antecedentes históricos

Los antepasados de los polinesios habían traído muchas plantas con ellos, como alimentos y medicinas, desde Asia oriental hace 2000 años, y se cree que de las 12 plantas medicinales más comunes que trajeron, la de Noni fue la segunda planta más popular utilizada en los remedios a base de hierbas para el tratamiento de varias enfermedades comunes y para mantener una buena salud en general. Noni es el nombre común de *Morinda citrifolia* L. y también se llama Indian Mulberry, Ba Ji Tian, Nono o Nonu, Fruta Queso y Nhau en diversas culturas de todo el mundo. Las raíces, tallos, cortezas, hojas, flores y frutos de la planta Noni están involucrados en diversas combinaciones en casi 40 hierbas medicinales conocidas y registradas (Deng et al., 2010).

M. citrifolia tiene una larga historia de uso como alimento en las regiones tropicales de todo el mundo. Contiene principalmente saponinas, taninos, triterpenos, alcaloides y flavonoides. Se utiliza principalmente para los trastornos intestinales, como la artritis, aterosclerosis, infecciones de la vejiga, forúnculos, quemaduras, cáncer, síndrome de fatiga crónica, debilidad circulatoria, el frío, la congestión, estreñimiento, diabetes, inflamaciones oculares, fiebre, fracturas, úlceras gástricas, gingivitis, dolores de cabeza, enfermedades del corazón, hipertensión, debilidad inmune, indigestión, parásitos intestinales, enfermedad renal, la malaria, los calambres menstruales, afecciones bucales, trastornos respiratorios, tiña, sinusitis, esguinces, apoplejía, inflamación de la piel y heridas (Kalimuthu et al., 2012).

II.5.2 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae.

Filo: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Rubiales.

Género: *Morinda*.

Especie: *Citrifolia* (Melendez Córdova y Pérez-León, 2002).

II.5.3 Características botánicas

La planta del Noni es un árbol pequeño de hojas perennes que crece en regiones costeras abiertas al nivel del mar y en áreas boscosas hasta aproximadamente 400 m sobre el nivel del mar, pudiendo desarrollarse a menudo en terrenos de origen volcánico. Su tamaño varía desde un pequeño arbusto hasta un árbol de 20 o 30 pies de altura. Presenta una corteza pálida y lisa, hojas opuestas de estrechas a anchas elípticamente, de 15 a 25 cm de longitud; el ápice de las hojas es agudo o acuminado, color verde brillante con estípulas grandes.



Figuras 6 y 7. Hojas y árbol de Noni (tomada y modificada de: Kalimuthu et al, 2012 y <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/Terms.asp>; respectivamente).

II.5.4 Flor

El árbol de Noni florece durante todo el año, las flores son pequeñas, blancas, fragantes y florecen en racimo que llevan a un fruto de color blanco cremoso. La esencia de las flores es empleada para aliviar irritaciones en los ojos.

II.5.5 Frutos

Son oblongos y presentan cicatrices circulares, son de color verde cuando están inmaduros y amarillentos-blancos cuando están completamente maduros. Tiene una carne suave, acuosa y un aroma caseoso que llega a ser cada vez más pronunciado y acre durante el proceso de maduración.



Figura 8. Fruto de *M. citrifolia* (tomada y modificada de: Pawlus et al., 2007).

Los frutos inmaduros y semi-inmaduros se pueden comer crudos, desecados y cocidos; los frutos completamente maduros presentan un sabor y olor dependiendo de la región donde se desarrollan, más o menos a queso ranciado.

II.5.6 Semillas

Presentan una testa muy dura y el tamaño oscila entre 0.8 y 1.0 cm, presentan una capa mucilaginosa, y son usadas como purgantes.

II.5.7 Componentes fitoquímicos

Las investigaciones fitoquímicas de *M. citrifolia* han resultado en el aislamiento de aproximadamente 200 compuestos, que se resumen en la Tabla 1. Estos consisten principalmente de un número de antraquinonas y glicósidos de antraquinona, ácidos grasos y sus derivados, los iridoides y glucósidos de iridoides, lignanos, neolignanos, glicósidos de flavonoides,

fenilpropanoides, sacáridos, triterpenoides y ácidos grasos. La mayoría de estos compuestos han sido aislados e identificados mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas, mientras que la cromatografía de gases y la espectrometría de masas se utilizan principalmente en la identificación de los ácidos grasos. Los nombres de los compuestos encontrados se enumeran en la Tabla 1 y las estructuras químicas de la mayoría de estos componentes, se muestran en la Figura 9.

Tabla 1. Componentes aislados de *M. citrifolia* (tomada y modificada de: Pawlus et al., 2007).

Clase de compuesto	Parte de la planta
Ácidos	
Ácido acético	Fruto
Ácido ascórbico	Fruto
Ácido benzoico	Fruto
Ácido butanoico	Fruto
Ácido decanoico	Fruto
Ácido (z,z,z,)-8,11,14-eicosatrienoico	Fruto
Ácido elaídico	Fruto
Ácido heptanoico	Fruto
Ácido hexanodioico	Fruto
Ácido hexanoico	Fruto
Ácido 13-Hidroxi-9,11,15-octadecatrienoico	Hojas
Ácido laurico	Fruto
Ácido linoleico	Fruto
Ácido 2-metilbutanoico	Fruto
Ácido 2-metilpropanoico	Fruto
Ácido 3-metilpropanoico	Fruto
Ácido mirístico	Fruto
Ácido nonanoico	Fruto
Ácido oleico	Fruto
Ácido octanoico	Fruto
Ácido palmítico	Fruto
Ácido Ricinoleico	Semillas
Ácido undecanoico	Fruto
Alcoholes y fenoles	
Alcohol bencílico	Fruto
1-butanol	Fruto
Eugenol	Fruto
1-hexanol	Fruto
3-metil-2-buten-1-ol	Fruto
3-metil-3-buten-1-ol	Fruto
(z,z,)-2.5-undecadien-1-ol	Fruto
Antraquinonas	
Alizarina	Cultivo celular, duramen
Alizarina 1- <i>O</i> -metil éter	Raíz
Antragalol 1,2-di- <i>O</i> -metil éter	Raíz
Antragalol 1,3-di- <i>O</i> -metil éter	Fruto
Antragalol 2,3-di- <i>O</i> -metil éter	Duramen
Antragalol 2- <i>O</i> -metil éter	Fruto
Austrocortinina	Fruto
Damnacanthal	Duramen, raíz
Damnacanthol	Raíz

5,6-dihidroxicilucidina	Cultivo celular
5,15-dimetilmorindol	Fruto, hojas
2-etoximtil-3-metoxi-1,5,6-trihidroxiantraquinona	Cultivo celular
2-formilantraquinona	Raíz
6-hidroxiantragalol-1,3-di- <i>O</i> -metil éter	Fruto
2-hidroxiantraquinona	Tallo
1-hidroxi-2-metilantraquinona	Raíz
2-hidroxi-1-metoxi-7-metilantraquinona	Raíz
3-hidroximorindona	Cultivo celular
Ibericina	Cultivo celular, raíz
Lucidina	Cultivo celular
Lucidina <i>u</i> -metil éter	Cultivo celular
2-metoxiantraquinona	Tallo
1-metoxi-3-hidroxiantraquinona	Raíz
2-metoxi-1,3,6-trihidroxiantraquinona	Fruto
6-metil-antrapurpurina	Cultivo celular
Morenona-1	Raíz
Morenona-2	Raíz
Morindicinina	Tallo
Morindicina	Tallo
Morindona	Duramen, raíz, cultivo celular
Morindona-5- <i>O</i> -metil éter	Fruto
Nordamnacanthal	Cultivo celular
Fisiciona	Duramen
Rubiadina	Cultivo celular y raíz
Rubiadina-1- <i>O</i> -metil éter	Raíz y duramen
Soranjidiol	Raíz
Tectoquinona	Raíz
1,5,15-trimetilmorindol	Hojas
Glucósidos antraquinónicos	
5,6-dihidroxicilucidina-3- β -primeverosida	Cultivo celular
6,8-dimetoxi-3-metilantraquinona- α -L- <i>O</i> - β -ramnosilglucopiranosida	Flores
3-hidroximorindona-6- β -primeverosida	Cultivo celular
Lucidina-3- β -primeverosida	Cultivo celular
2-metil-3,5,6-trihidroxiantraquinona-6- β -primeverosida	Cultivo celular
Morindina	Duramen
Fisiciona-8- <i>O</i> -[α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)]- β -D-galactopiranosida]	
Carotenoides	
β -Caroteno	Hojas
Derivados de clorofila	
13 ² (R)-hidroxifeoforbida a metil éter	Hojas
13 ² (S)-hidroxifeoforbida a metil éter	Hojas
15 ¹ (R)-hidropurpurina-7 lactonadimetil éter	Hojas
15 ¹ (S)-hidropurpurina-7 lactonadimetil éter	Hojas
Metilfeoforbida a	Hojas
Metilfeoforbida b	Hojas
Feoforbida a	Hojas
13- <i>epi</i> -feoforbida a metil éter	Hojas
Ésteres	
1-n-butil-4-(5'-formil-2'-furanil)metil succinato	Fruto

1-n-butil-4-metil-2-hidroxisuccinato	Fruto
1-n-butil-4-metil-3-hidroxisuccinato	Fruto
Etil decanoato	Fruto

Tabla 1 *Cont.* Componentes aislados de *M. citrifolia* (tomada y modificada de: Pawlus et al., 2007)

Etil hexanoato	Fruto
Etil palmitato	Fruto
Metil decanoato	Fruto
Metil elaidato	Fruto
Metil hexanoato	Fruto
Metil 3-metiltio-propanoato	Fruto
Metil octanoato	Fruto
Metil oleato	Fruto
Metil palmitato	Fruto
Flavonoides	
Acacetina 7- <i>O</i> - β -D-glucopiranosida	Flores
5,7-dimetil apidenina 4'- <i>O</i> - β -D-galactopiranosida	Flores
Kaempferol	Fruto
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosida	Hojas
Narcissosida	Fruto
Nicotiflorosida	Fruto, hojas
Quercetina	Fruto
Quercetina 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosida	Hojas
Quercetina 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosida	Hojas
Rutina	Fruto, hojas
Iridooides	
Asperulosida	Fruto, hojas
Ácido asperulosidico	Fruto, hojas
Ácido metil esterasperulosidico	Fruto
Borreriagenina (previamente mprindacina)	Fruto
4- <i>epi</i> -borreriagenina	Fruto
Citrifolinina A-1	Hojas
Citrifolinina Ba	Hojas
CitrifolininaBb	Hojas
Citrifolinosida A	Hojas
Citrifosida	Hojas
Deacetilasperulosida	Fruto, hojas
Ácido deacetilasperulosidico	Fruto
Ácido metil éster deacetilasperulosidico	Fruto
Dehidroepoximetoxigaertnerosida (previamente citrifolinina A y citrifolinosida)	Hojas
Dehidrometoxigaertnerosida	Fruto
6 β ,7 β -epoxi-8- <i>epi</i> -splendosida	Fruto
6 α -hidroxiadoxosida	Fruto
Ácido 1,3a,4,7a-tetrahidro-6-(hidroximetil)-3H-furo[3,4-c]pirano-4-carboxilico	Fruto
Cetonas	
2-heptanona	Fruto

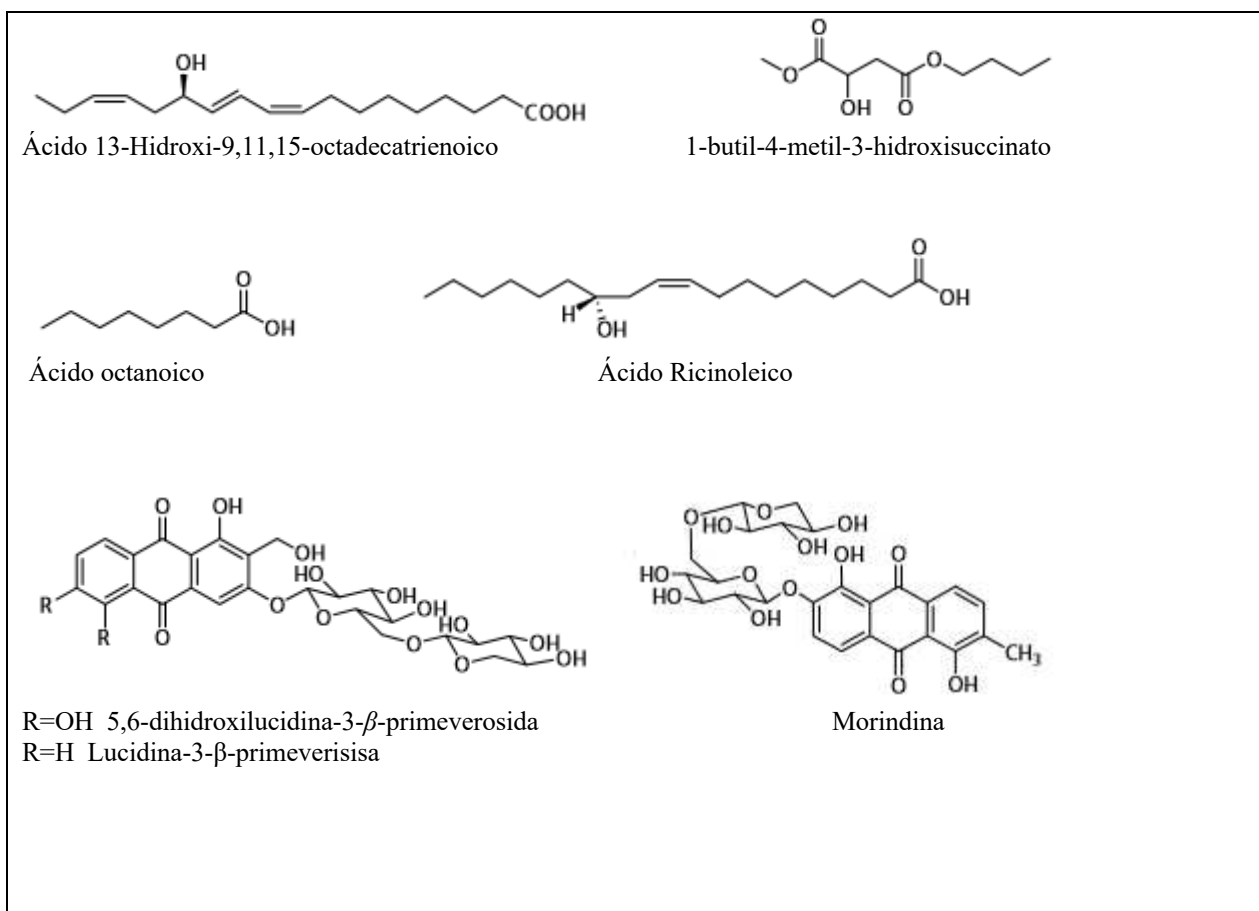
3-hidroxi-2-butanona	Fruto
Lactonas	
(E)-6-dodecena- γ -lactona	Fruto
(Z)-6-dodecena- γ -lactona	Fruto

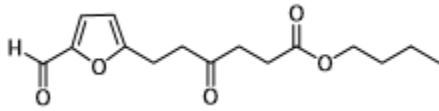
Tabla 1 *Cont.* Componentes aislados de *M. citrifolia* (tomada y modificada de: Pawlus et al., 2007).

Lignanos	
Americanina A	Fruto
Ácido americanoico	Fruto
Americanol A	Fruto
Balanofonina	Fruto
3,3'-bisdimetilpinoresinol	Fruto
3,3'-bisdimetiltanegool	Fruto
Isoprincepina	Fruto
Morindolina	Fruto
(-)-pinoresinol	Fruto
(+)-3,4,3',4'-tetrahidroxi-9,7' α -epoxilignano-7 α ,9'-lactona	Fruto
Nucleosidos	
Citidina	Fruto
Sacáridos	Fruto
Noniosida A	Fruto
Noniosida B	Fruto
Noniosida C	Fruto
Noniosida D	Fruto
Noniosida E	Fruto
Noniosida F	Fruto
Noniosida G	Fruto
Noniosida H	Fruto
α -glucosa y β -glucosa	Fruto
Metil α -D-fructofuranosida	Fruto
Metil β -D-fructofuranosida	Fruto
1- <i>O</i> -(3'-metilbut-3'-enil)- β -D-glucopiranosida	Fruto
Triterpenoides y esteroides	Fruto
Ácido 3- <i>O</i> -acetilpomolico	Hojas
Ácido barbinervico	Hojas
Campesta-5,7,22-trien-3 β -ol	Hojas
Campesterol	Cultivo celular
Campesteril linoleato	Cultivo celular
Campesteril palmitato	Cultivo celular
Cicloartenol	Cultivo celular, hojas
Cicloartenil linoleato	Cultivo celular
Cicloartenil palmitato	Cultivo celular
Ácido 3,19,dihidroxiursolico	Fruto
Hederagenina	Hojas
Isofucosterol	Cultivo celular
Isofucosteril linoleato	Cultivo celular
Ácido 19 α -metilursólico	Fruto
24-metilenecolesterol	Cultivo celular
24-metilenecicloartanol	Cultivo celular
24-metilenecicloartanil linoleato	Cultivo celular

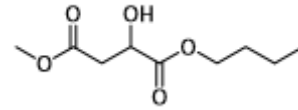
Ácido oleanólico	Hojas
Ácido rotungénico	Hojas
B-sitosterol	Hojas, cultivo celular
Sitosteril linoleato	Cultivo celular
Sitosteril palmitato	Cultivo celular
Estigmasta-4-en-3-ona	Hojas
Estigmasta-4-22-dien-3-ona	Hojas
Estigmasterol	Cultivo celular, hojas
Estigmasteril linoleato	Cultivo celular
Ácido ursólico	Hojas
Compuestos diversos	
(etiltiometil) benceno	Fruto
Hexanamida	Fruto
β -hidroxipropiovanillona	Fruto
4-hidroxi-3-metoxicinnamaldehido	Fruto
Isoscooletina	Fruto
Limoneno	Fruto
1-palmitina	Fruto
Fitol	Hojas
Potasio	Hojas
Escopolatina	Fruto
Vanillina	Fruto

Tabla 1 *Cont.* Componentes aislados de *M. citrifolia* (tomada y modificada de: Pawlus et al., 2007).

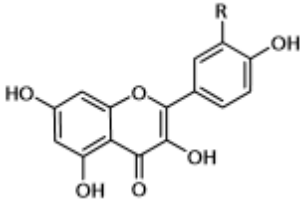




1-n-butil-4-(5'-formil-2'-furanilmetilsuccinato)

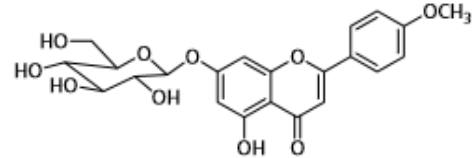


1-n-butil-4-metil-2-hidroxisuccinato



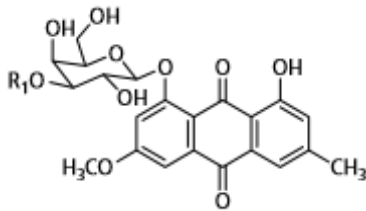
R₁= OH, R₂= OH 3-hidroximorindona-6-β-primeverosida

R₁= H, R₂= OH 2-metil-3,5,6-trihidroxi-antraquinona-6-β-primeverosida

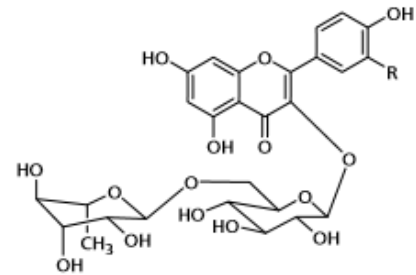


R= H Kaempferol

R= OH Quercetina

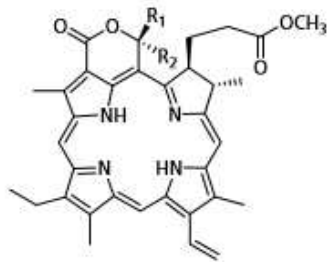


Fisticiona-8-O-[(α-L-arabinopiranosil (1→3))-β-D-galactopiranosida]



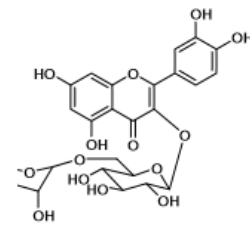
R= OCH₃ Narcissosida

R= H Nicotiflorosida

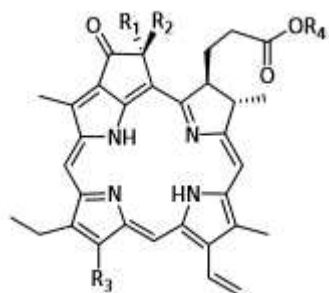


R₁= CO₂CH₃, R₂= OH 15¹(R)-hidropurpurina-7 lactonadimetil éster

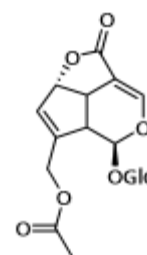
R₁= OH, R₂= CO₂CH₃ 15¹(S)-hidropurpurina-7 lactonadimetil éster



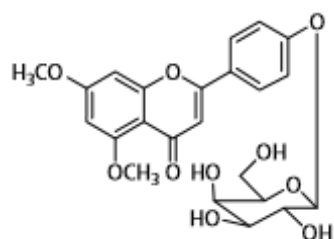
Rutina



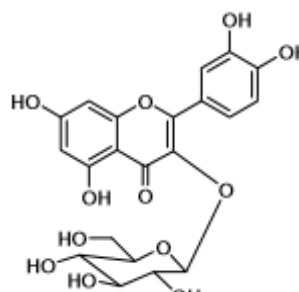
$R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{CH}_3$ 13²(R)-hidroxifeoforbida a metil éster
 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{CH}_3$ 13²(S)-hidroxifeoforbida a metil éster
 $R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{CH}_3$ Metil feoforbida a
 $R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CHO}$, $R_4 = \text{CH}_3$ Metil feoforbida b
 $R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}$, $R_4 = \text{H}$ Feoforbida a
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R_4 = \text{CH}_3$ 13-*epi*-feoforbida a metil éster



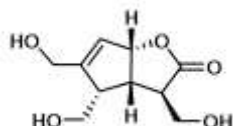
Asperulosida



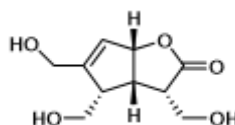
5,7-dimetil apidenina 4'-O-β-D-galactopiranosida



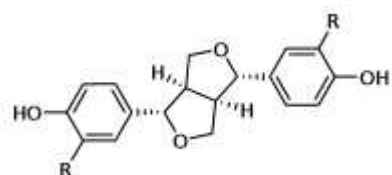
Quercetina 3-O-β-D-glucopiranosida



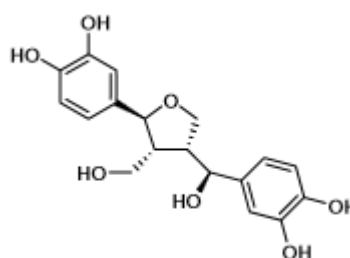
Citrifolinina A-1



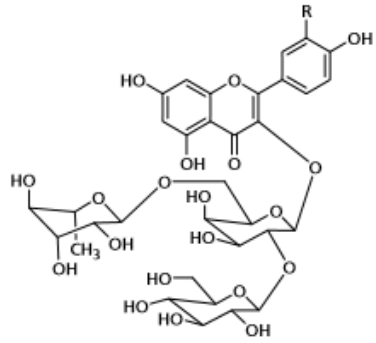
4-*epi*-borreriagenina



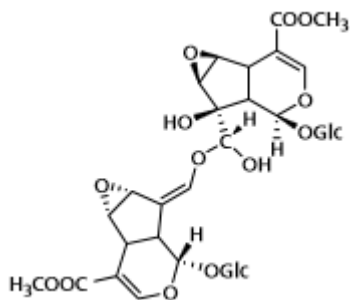
$R = \text{OH}$ 3,3'-bisdimetilpinoselinol
 $R = \text{OCH}_3$ (-)-pinoselinol



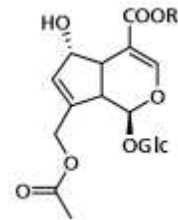
3,3'-bisdimetiltanegool



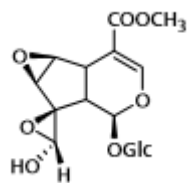
R=H Kaempferol 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ranopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosida
 R= OH Quercetina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ranopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosida



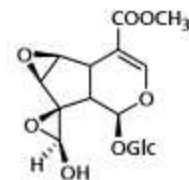
Borreriagenina (previamente mprindacina)



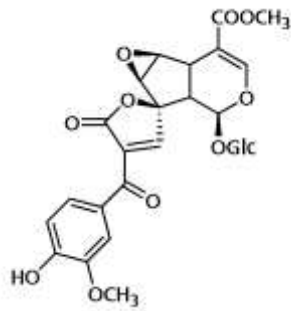
R=H Ácido asperulosídico
 R= CH₃Ácido metil ester asperulosídico



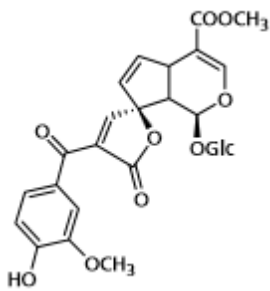
Citrifolonina Ba



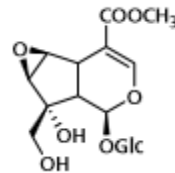
CitrifolininaBb



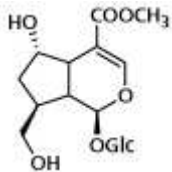
Dehidroepoximetoxigaertnerosida (previamente citrifolinina A y citrifolinosida)



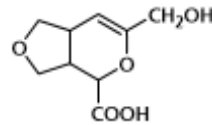
Dehidrometoxigaertnerosida



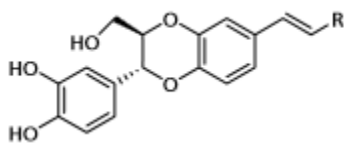
6β,7β-epoxi-8-*epi*-splendosida



6α-hidroxiadodoxida



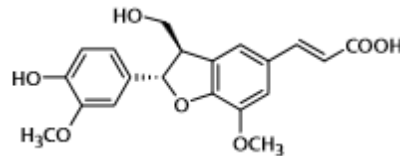
Ácido 1,3a,4,7a-tetrahidro-6-(hidroximetil)-3H-furo[3,4-c]pirano-4-carboxílico



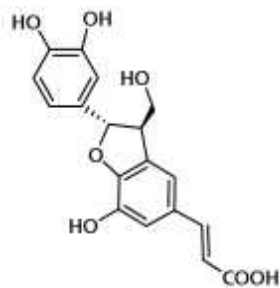
R= CHO Americanina A

R= COOH Ácido americanoico

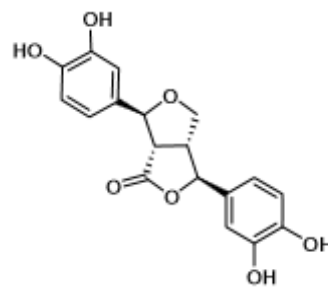
R= CH₂OH Americanol A



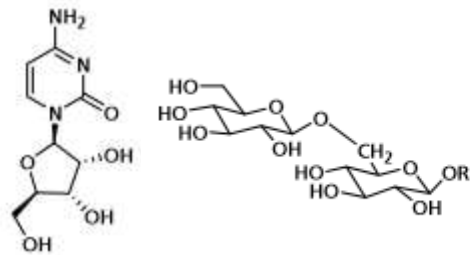
Balanofonina



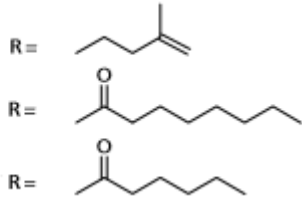
Morindolina



(+)-3,4,3',4'-tetrahidroxi-9,7'α-epoxilignano-7α,9'-lactona



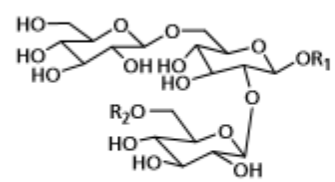
Citidina



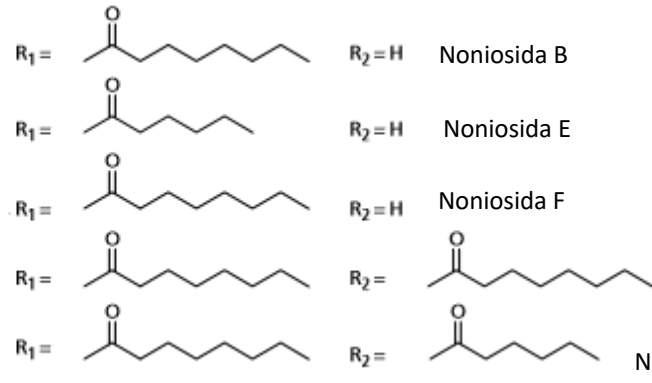
Noniosida A

Noniosida C

Noniosida D



Noniosida G

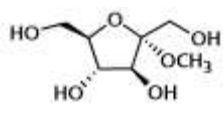


Noniosida B

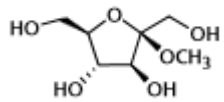
Noniosida E

Noniosida F

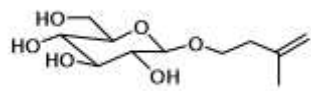
Noniosida H



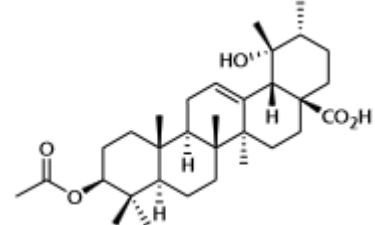
Metil α -D-fructofuranosida



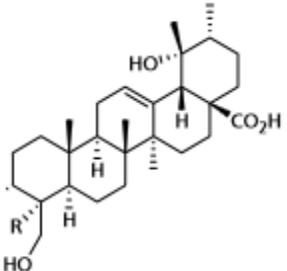
Metil β -D-fructofuranosida



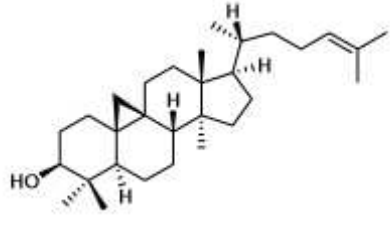
1-O-(3'-metilbut-3'-enil)- β -D-glucopiranososa



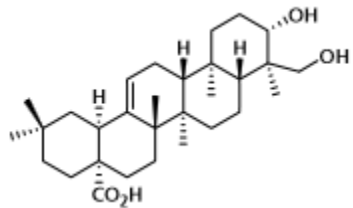
Ácido 3-O-acetilpomolico



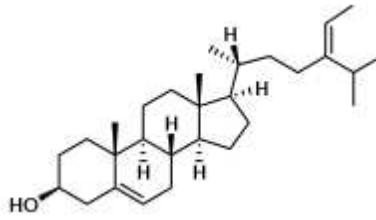
R= CH₃ Ácido barbinervico



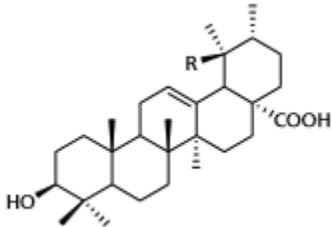
Cicloartenol



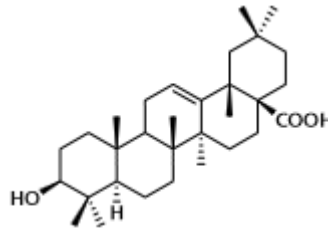
Hederagenina



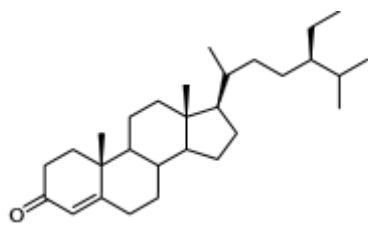
Isofucosterol



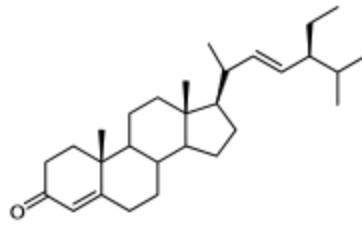
R= CH₃ Ácido 3,19,dihidroxiursólico
R= H Ácido ursólico



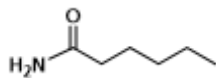
Ácido oleanólico



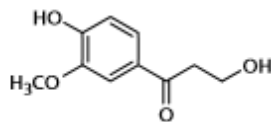
Estigmasta-4-en-3-ona



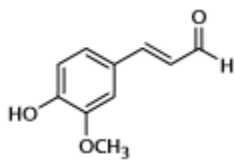
Estigmasta-4-22-dien-3-ona



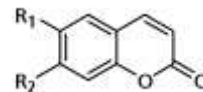
Hexanamida



β-hidroxiopropiovanillona



4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído



R₁= OH, R₂= OCH₃ Isoscopoletina
R₁= OCH₃, R₂= OH Escopoletina

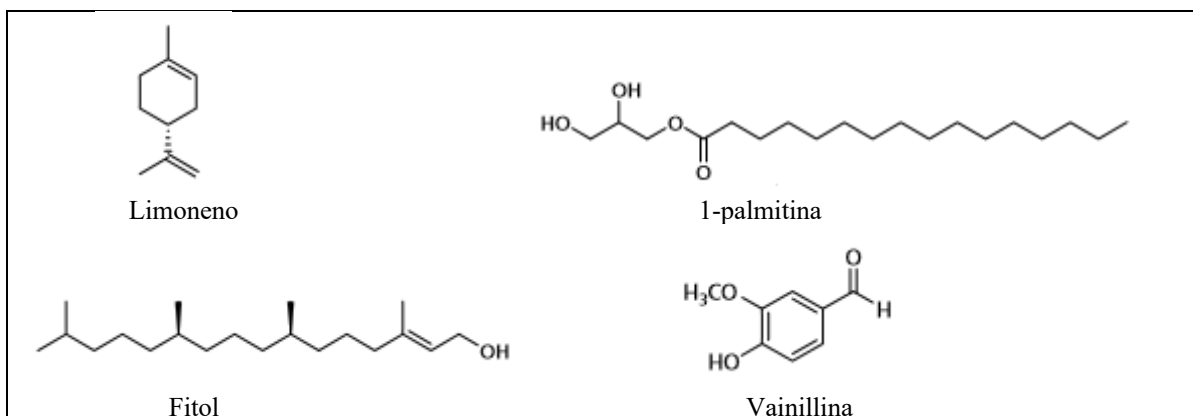


Figura 9. Estructuras químicas de algunos de los compuestos aislados de *M. citrifolia* (tomada y modificada de: Pawlus et al., 2007).

II.6 EFECTOS BIOLÓGICOS DE *M. citrifolia*

Se han realizado un gran número de estudios biológicos *in vitro* y, en menor medida, *in vivo*, tanto en extractos crudos de *M. citrifolia*, como en varios componentes puros de ésta. Estos estudios refieren efectos biológicos como: analgésicos, antibacterianos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes, antituberculosos, quimiopreventivos y en acciones cardiovasculares, entre otros efectos.

II.6.1 Actividad antibacteriana

Acubina, L- asperulosida y alizarina del fruto del Noni, así como algunos otros compuestos de antraquinonas en las raíces del Noni, han confirmado ser agentes antibacterianos. Estos compuestos se ocupan para luchar contra las cepas infecciosas de bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, y *Shigella*. Estos elementos antibacterianos dentro del Noni son los principios activos responsables para el tratamiento de infecciones de la piel, resfriados, fiebres y otros problemas de salud causado por bacterias. Además, el Noni se ha utilizado tradicionalmente para tratar huesos rotos, cortes profundos, heridas, llagas y heridas. Los extractos de la fruta madura del Noni exhiben propiedades antibacterianas moderadas contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Pyogenes M* y *E. coli*, también demostraron tener propiedades antibacterianas moderadas contra *Salmonella typhosa*, *Salmonella monteideo*, *Salmonella schottmuelleri*, *Paradys Shigella*, *BH* y *Shigella paradys*.

II.6.2 Actividad antiviral

Se encontró un compuesto aislado a partir de las raíces del Noni denominado 1-metoxi-2-formil-3-hidroxiantraquinona, que suprime el efecto citopático del VIH en células MT-4 infectadas, sin inhibir el crecimiento celular.

II.6.3 Efectos anti-tuberculosos

En el Noni se ha encontrado actividad para matar *Mycobacterium tuberculosis*. Una concentración de extracto de hojas del Noni mató a 89% de las bacterias en un tubo de ensayo, casi tan efectivo

como un medicamento líder anti-TB, Rifampicina, que tiene una tasa de inhibición del 97% a la misma concentración. Aunque ha habido informes anecdóticos de la utilización natural del Noni en la Polinesia como medicamento contra la tuberculosis, este es el primer informe que demuestra el potencial antimicrobacteriano de los compuestos obtenidos de la hoja del Noni.

II.6.4 Actividad antitumoral

En 1992, Hirazumi, investigador de la Universidad de Hawai, reportó actividad a partir del precipitado en alcohol del jugo de fruta del Noni (noni - ppt) contra el cáncer de pulmón en 6 ratones C57 Bl, en la 83ª Reunión Anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. El noni - ppt muestra prolongar significativamente la vida de los ratones con carcinoma de pulmón de Lewis implantado hasta un 75 % en comparación con el grupo de control. Se concluyó que el noni - ppt parece suprimir el crecimiento tumoral indirectamente mediante la estimulación del sistema inmunológico. El tiempo de supervivencia y efectos curativos mejoran cuando el noni - ppt se combina con dosis subóptimas de los agentes quimioterapéuticos estándares tales como adriamicina (Adria), cisplatino (CDDP), 5 - fluorouracilo (5 - FU), y vincristina (VCR) , lo que sugiere importantes aplicaciones clínicas del noni - ppt como agente complementario en el tratamiento del cáncer. Estos resultados indican que el noni - ppt puede mejorar el efecto terapéutico de medicamentos contra el cáncer. Por lo tanto, puede ser beneficioso para los pacientes de cáncer puesto que les permite utilizar dosis más bajas de fármacos anticáncer para lograr los mismos o incluso mejores resultados.

II.6.5 Actividad antihelmíntica

Un extracto etanólico de las hojas tiernas de Noni causa parálisis y muerte del parásito humano *Ascaris lumbricoides* en un día. Se informa también que el Noni ha sido utilizado en las Filipinas y en Hawai como un insecticida eficaz.

II.6.6 Actividad analgésica

Joseph Betz informó que los frutos del Noni poseen actividades analgésicas y tranquilizantes. Un equipo de investigación dirigido por el francés Younos, probó los efectos analgésicos y sedantes de los extractos de la planta *M. citrifolia*. El extracto "muestran una significativa relación-dosis, de la actividad central analgésica, en los ratones tratados." Afirmaron que "estos hallazgos validan las propiedades analgésicas tradicionales de esta planta". La eficacia analgésica del extracto del Noni es un 75% más fuerte que la morfina, no adictiva y libre de efectos secundarios.

II.6.7 Actividad hipotensora

Dang Van Ho de Vietnam demostró que un extracto total de las raíces del Noni tiene efecto hipotensor. Moorthy y compañeros de trabajo encontraron que el extracto etanólico de las raíces del Noni reduce la presión arterial en un perro anestesiado. Un médico de Hawai informó que el jugo de la fruta del Noni tenía un diurético eficaz.

II.6.8 Actividad inmunológica

Asahina encontró que un extracto de alcohol de la fruta del Noni a diversas concentraciones inhibe la producción de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), que es un promotor de tumores endógeno. Por lo tanto, el extracto de alcohol puede inhibir el efecto promotor del tumor de TNF- α . Hirazumi encontró que el noni-ppt contiene una sustancia rica en polisacáridos que inhibía el crecimiento tumoral. Noni - PPT también era capaz de estimular la liberación de varios mediadores a partir de células murinas efectoras, incluyendo el TNF - α , interleucina - 1 beta (IL - 1 β), IL - 10, IL - 12, interferón - gamma (IFN - γ) y óxido nítrico (NO) (Wong et al., 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

En México, el cultivo de Noni y la preparación del jugo de la fruta de este árbol, se realizan desde ya varios años principalmente en los Estados de Morelos y Guerrero; incentivados por la propaganda de sus atributos terapéuticos. Las investigaciones acerca de esta especie se han enfocado en el estudio de los metabolitos secundarios presentes principalmente en la fruta, aunque la corteza, semillas y hojas ya han sido estudiadas; por tanto, existen gran cantidad de estudios científicos encaminados a determinar sus atributos medicinales, su efectos tóxicos y bondades alimenticias (West, 2006; Hamburger, 2007; Brown, 2012).

El aislamiento de metabolitos presentes en las hojas del Noni resulta ser de gran importancia, ya que, según la medicina tradicional, poseen efectos terapéuticos importantes, además de emplearse como alimento con alto valor nutritivo, sin evidencia de toxicidad o de ser alergénico. Además de contribuir a conocer si la especie estudiada produce nuevos metabolitos en comparación a las hojas de otras regiones del mundo.

En este trabajo, se planteó la preparación, estudio fitoquímico y evaluación biológica de dos extractos polares (metanólico y acuoso), a partir de las hojas del noni de una colecta obtenida en Coyuquilla, Estado de Guerrero.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General:

- Evaluar los efectos antiinflamatorio y analgésico de dos extractos de alta polaridad (metanólico y acuoso) obtenidos a partir de las hojas de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae).

IV.2 Particulares:

- Preparar los extractos acuosos (liofilización) y metanólico (maceración).
- Evaluar la toxicidad aguda de los extractos polares de las hojas de *M. citrifolia* L. (Rubiaceae).

- Evaluar el potencial antiinflamatorio de los extractos de alta polaridad en la prueba del edema auricular inducido con TPA en ratones.
- Evaluar el potencial analgésico de los extractos de alta polaridad en la prueba de estiramiento abdominal inducido con ácido acético al 0.7 % en ratones.
- Del extracto más activo, realizar su fraccionamiento por medio de cromatografía en columna abierta.

V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

V.1 Obtención y procesamiento del material vegetal.

Las hojas de *M. citrifolia* Linn fueron recolectadas en la localidad de Coyuquilla, en el Estado de Guerrero. Estas fueron molidas con ayuda de un molino mecánico dando un peso neto de 629.7g.

V.1.1 Preparación de los extractos metanólico (MCLM) y acuoso (MCLA).

El extracto con metanol (MCLM) se preparó por un proceso de maceración con disolvente grado reactivo, de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se pesaron 50.7 g de material vegetal seco y molido de las hojas de *M. citrifolia* Linn, se colocaron en un frasco de vidrio con tapa de 1L y se adicionaron 600 mL de metanol. El contenido se dejó en maceración por tres días. Posteriormente se retiró el material vegetal por filtración a gravedad, y el volumen recuperado (360 mL) se concentró en un rotavapor. El disolvente concentrado se regresó al frasco con el material vegetal y se agregaron 240 mL más de disolvente fresco para tener nuevamente 600 mL. Este proceso se realizó 5 veces, cada tercer día. Todo el extracto obtenido se colocó en un frasco de vidrio etiquetado y pesado (15.21 g).

El extracto acuoso (MCLA) se preparó por medio de una infusión de hojas secas y trituradas de *M. citrifolia* Linn.

Brevemente, se pusieron a hervir 500 mL de agua en un matraz Erlenmeyer, por otro lado, se pesaron 30 g de hoja seca y molida de *M. citrifolia* Linn; una vez que el agua estuvo hirviendo, se agregó el material vegetal al matraz y se dejó 15 minutos remojando. Después de haber dejado pasar los 15 minutos, se pasa la infusión sin el material vegetal a vasos especiales que son utilizados para secar la infusión en una liofilizadora; se usan cuatro vasos a los cuales se les agrega 100 mL a cada uno, posteriormente se meten a refrigeración para que se congelen; una vez congelados se exponen a una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. El sólido obtenido se colocó en un frasco de vidrio etiquetado y pesado (6.3354 g), del cual se tomó diferentes cantidades de sólido para el análisis químico y biológico.

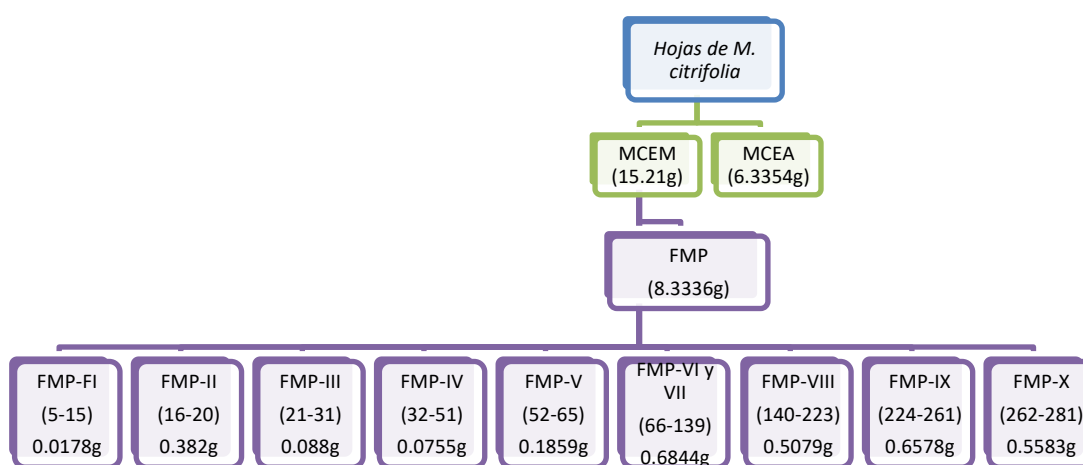
V.1.2 Fraccionamiento de los extractos

Para el aislamiento y purificación del o los compuestos activos, los extractos de alta polaridad fueron sometidos a fraccionamientos sucesivos mediante métodos cromatográficos convencionales como la cromatografía en columna (abierta) empacadas con gel de sílice, se utilizaron distintas

mezclas de disolventes orgánicos como fases móviles (hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, etanol y acetona); como se describe a continuación.

El extracto metanólico se sometió a un fraccionamiento primario (FMP) mediante cromatografía en columna abierta, empleando para ello una columna de vidrio empacada con gel de sílice (300 g) disuelto en hexano; se pesaron 8.3336 g de extracto metanólico que se mezcló con 14 g de sílice para el punto de aplicación. Se empleó un gradiente de elución hexano-acetato de etilo (10:0 a 30:70) y acetato de etilo-metanol (95:5 a 90:10) obteniendo 291 fracciones (Tabla 2).

Posteriormente, las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (gel de sílice 60 G254 Merck), utilizando varios sistemas de elución y sulfato sérico o vainillina como agentes cromógenos. Una vez analizadas se hicieron reuniones con las 291 fracciones, dando un total de 10 fracciones primarias (Esquema 1).



Esquema 1. Fraccionamiento primario del extracto metanólico (FMP).

Fracciones	Gradiente de solventes
1 a 10	Hexano 100%
11 a 25	Hexano:AcoEto 95:5
26 a 85	Hexano:AcoEto 80:20
86 a 175	Hexano:AcoEto 70:30
176 a 190	Hexano:AcoEto 1:1
191 a 235	Acoet:Metanol 95:5
236-281	Acoet:Metanol 90:10

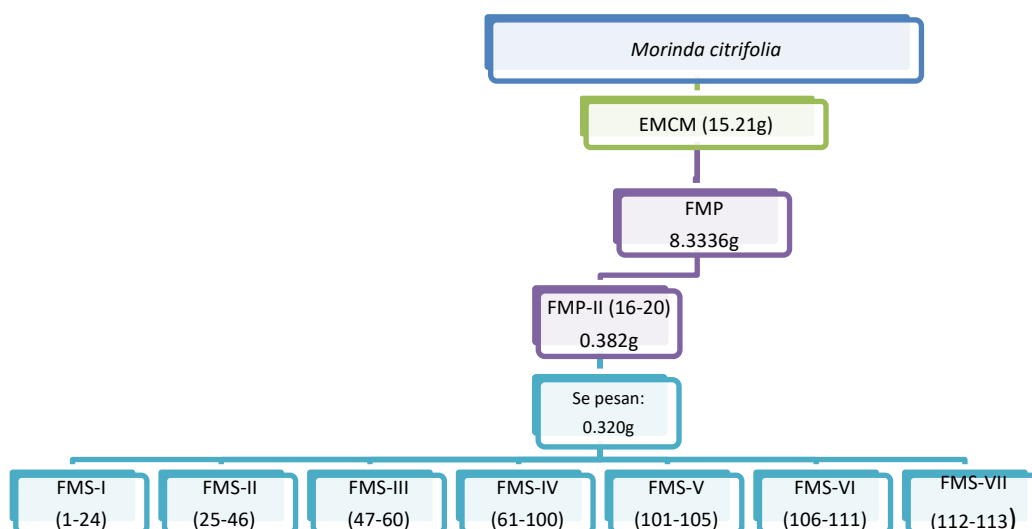
Tabla 2. Seguimiento del gradiente de elución por grupo de fracciones.

Las fracciones se dejaron secar a temperatura ambiente cubiertos con papel aluminio para su posterior evaluación biológica.

V.1.3 Fraccionamiento secundario

Las fracciones FMP-II y FMP-VIII se sometieron a un fraccionamiento secundario bajo las mismas condiciones anteriores (Esquema 2 y 3), empleando para ello una columna de vidrio empacada con

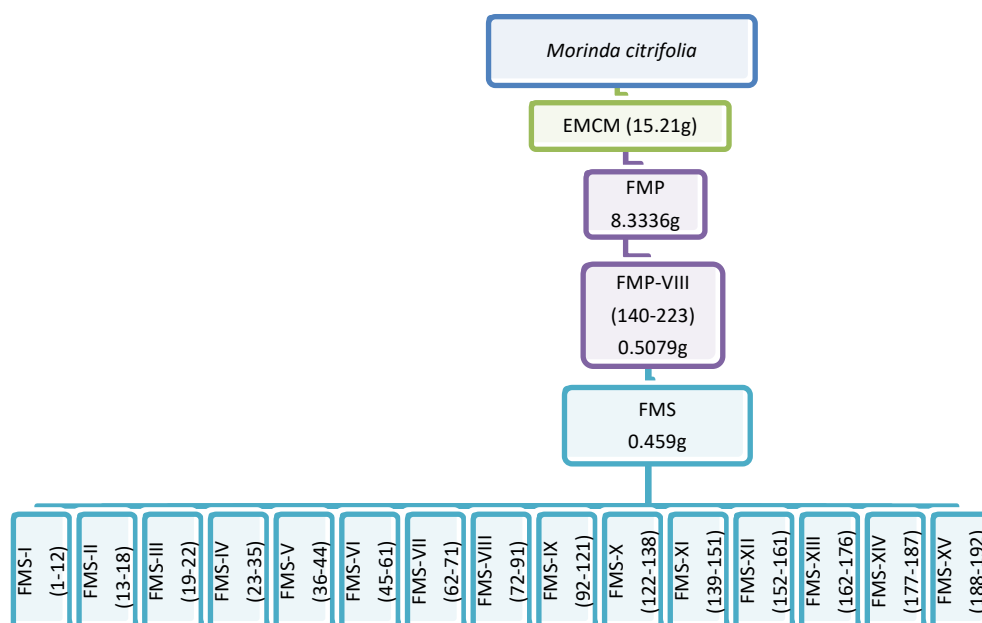
gel de sílice (30 g y 60 g respectivamente) disuelto en hexano para cada fracción; se pesaron 0.320 g de FMP-II que se mezcló con 1.6 g de sílice y 0.459 g de FMP-VIII que se mezcló con 1.2 g de sílice para los puntos de aplicación de cada columna. Se empleó un gradiente de elución hexano-diclorometano (10:0 a 70:30), obteniendo 113 fracciones para la FMP-II, mientras que para FMP-VIII se usaron los gradientes de elución hexano:acetato de etilo (1:1 a 0:1), acetato de etilo:etanol (98:2 a 1:1) y metanol, obteniendo 192 fracciones (Tabla 3 y 4). Posteriormente las fracciones fueron analizadas por CCF. Una vez analizadas se hicieron reuniones, dando un total de 7 fracciones secundarias para FMP-II y para la fracción FMP-VIII, 15 fracciones. De la fracción FMS-IX se obtuvo un precipitado de color blanco que se envió a RMN para su estudio.



Esquema 2. Fraccionamiento secundario del extracto metanólico de FMP-II.

Fracciones	Gradiente de solventes
1 a 24	Hexano 100%
25 a 46	Hexano:Diclorometano 95:5
47 a 60	Hexano:Diclorometano 90:10
61 a 89	Hexano:Diclorometano 80:20
90 a 101	Hexano:Diclorometano 70:30
102 a 113	Hexano:Diclorometano 70:30/1mL Metanol x 100 mL

Tabla 3. Seguimiento del gradiente de elución por grupo de fracciones del fraccionamiento secundario de FMP-II.



Esquema 3. Fraccionamiento secundario del extracto metanólico de FMP-VIII.

Fracciones	Gradiente de solventes
1 a 32	Hexano:Acetato de etilo 1:1
33 a 65	Hexano:Acetato de etilo 40:60
66 a 75	Hexano:Acetato de etilo 30:70
76 a 87	Hexano:Acetato de etilo 20:80
88 a 113	Acetato de etilo 100%
114 a 133	Acetato de etilo:Etanol 98:2
134 a 156	Acetato de etilo:Etanol 95:5
157 a 161	Acetato de etilo:Etanol 90:10
162 a 178	Acetato de etilo:Etanol 70:30
179 a 186	Acetato de etilo:Etanol 1:1
187 a 192	Metanol 100%

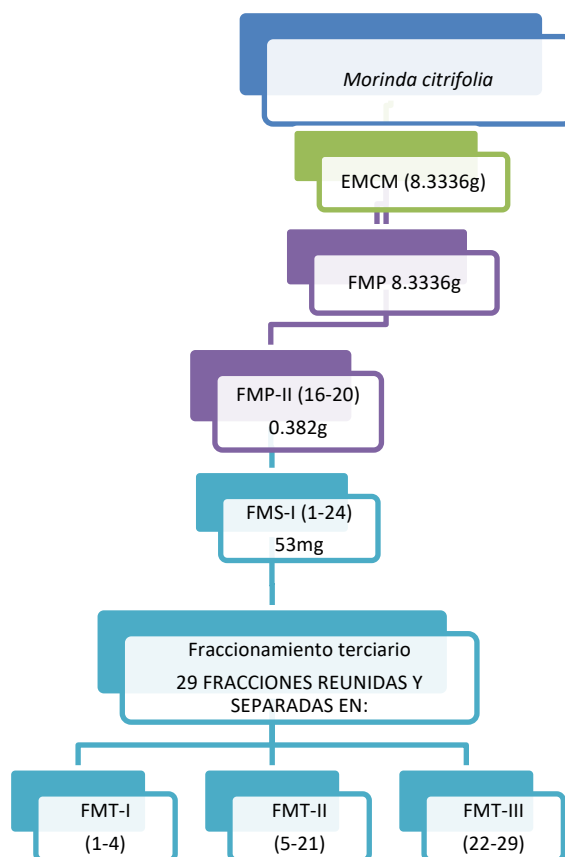
Tabla 4. Seguimiento del gradiente de elución por grupo de fracciones del fraccionamiento secundario de FMP-VIII.

Ambas agrupaciones de las fracciones se dejaron secar a temperatura ambiente cubiertos con papel aluminio para su posterior evaluación biológica.

V.1.4 Fraccionamiento terciario

La fracción FMS-I y FMS-VII de la fracción FMP-II, se sometieron a un fraccionamiento terciario por separado, bajo las mismas condiciones anteriores, empleando para ello una columna de vidrio empacada con gel de sílice (30 g y 9.2 g respectivamente) disuelto en hexano; se pesaron 53 mg de FMS-I que se mezcló con 530 mg de sílice y también se pesaron 60 mg de FMS-VII que posteriormente se mezcló con 700 mg de sílice para los respectivos puntos de aplicación. Se empleó un gradiente de elución Hexano-Diclorometano (10:0 a 70:30), obteniendo 29 fracciones para FMS-I; mientras que para FMS-VII se usó un gradiente de elución Hexano-Diclorometano (10:0 a 0:10) y Diclorometano-Metanol (99:1 a 95:5), obteniendo 95 fracciones. Posteriormente las fracciones de

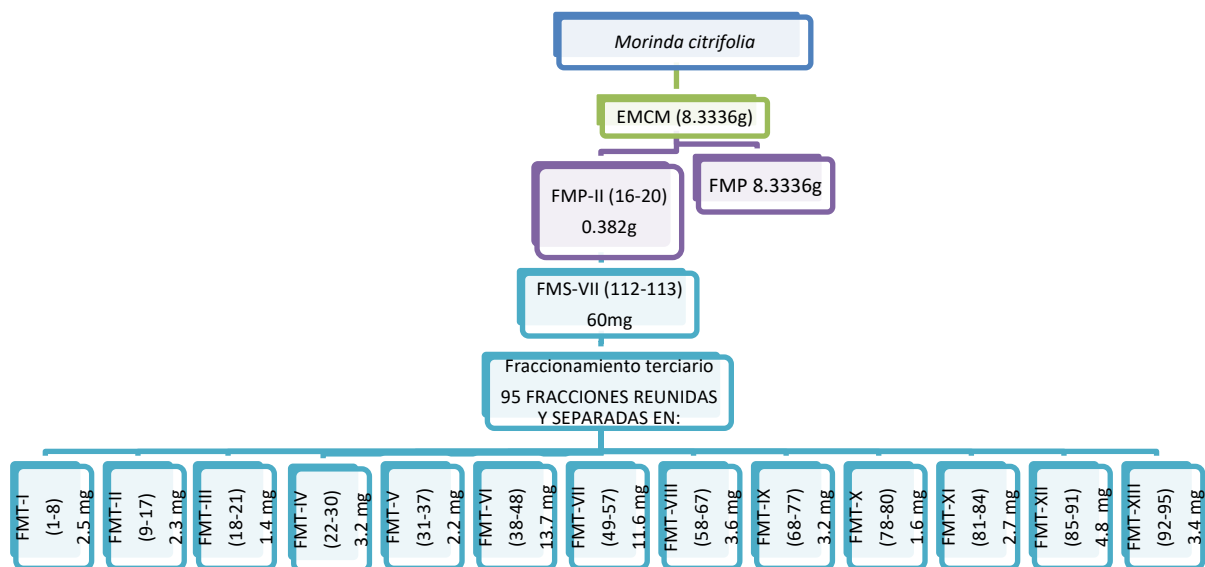
ambas columnas, fueron analizadas por CCF y se efectuaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (gel de sílice 60 G254 Merck), utilizando varios sistemas de elución y soluciones de sulfato sérico como agente cromógeno. Una vez analizadas se hicieron reuniones, dando un total de 3 fracciones de FMS-I y 13 fracciones de FMS-VII (Esquema 3 y Tabla 5).



Esquema 3. Fraccionamiento terciario de la fracción FMS-I.

Fracciones	Gradiente de solventes
1 a 4	Hexano 100%
5 a 21	Hexano:Diclorometano 95:5
22-29	Hexano:Diclorometano 95:5

Tabla 5. Seguimiento del gradiente de elución por grupo de fracciones.



Esquema 4. Fraccionamiento terciario de la fracción FMS-VII.

Fracciones	Gradiente de solventes
1 a 5	Hexano 100%
5 a 10	Hexano 100%
11 a 20	Hexano:Diclorometano 90:10
21-26	Hexano:Diclorometano 80:20
27 a 33	Hexano:Diclorometano 60:40
34 a 47	Hexano:Diclorometano 1:1
48 a 59	Hexano:Diclorometano 40:60
60 a 68	Hexano:Diclorometano 20:80
69 a 77	Diclorometano 100%
78 a 85	Diclorometano:Metanol 99:1
86 a 90	Diclorometano:Metanol 98:2
91 a 95	Diclorometano:Metanol 95:5

Tabla 6. Seguimiento del gradiente de elución por grupo de fracciones.

Ambos grupos de fracciones se dejaron secar a temperatura ambiente cubiertos con papel aluminio para su posterior evaluación biológica.

V.2 EVALUACIONES TOXICOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS GENERALES

El estudio de los extractos, fracciones y/o productos puros fue realizado mediante el análisis de la actividad antiinflamatoria, analgésica y toxicológica como se describe a continuación (Williamson et al., 1996).

V.2.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratones hembra de la cepa CD-1 obtenidos del UPEAL-bioterio de la UAM Xochimilco, con un intervalo de peso entre 20 a 30 g de peso. Se mantuvieron en condiciones

estándar (ciclos de 12 horas luz/obscuridad) con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el Cuidado y Manipulación de Animales de Experimentación. También se observó con detenimiento la aplicación de reglas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

V.2.2 Toxicidad *in vivo* por la Prueba de Lorke

La metodología constó de dos fases, durante las cuales se registró la sobrevivencia de los ratones a los cuales se les administró dosis crecientes de los extractos metanólico y acuoso. En ambas, grupos de 5 ratones con 12 horas de ayuno y libre acceso a agua (*ad libitum*), fueron observados durante 30 minutos previos a la administración oral de los tratamientos con los extractos. En la primera fase, dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg fueron administradas por vía oral, posteriormente, fueron observados durante ocho horas, y después, en intervalos de 24 horas durante un periodo de 15 días (período que duran ambas fases), registrando algún cambio en su patrón conductual, efectos tóxicos o la muerte. Si algún animal muere debe ser registrado la hora y el día de deceso y hacer un examen morfológico de los órganos del animal.

En la segunda fase del estudio, las dosis fueron seleccionadas de acuerdo con el número de animales muertos en la primera fase (criterios de Lorke); se utilizan nuevos grupos de animales y se tratan con dosis más altas (1600, 2900 y 5000 mg/Kg) de acuerdo a los criterios de Lorke y se realizan las mismas observaciones de la primera fase. La DL₅₀ se calculó mediante una media geométrica, entre la dosis donde se presenta el deceso del primer animal y la última dosis donde no hay animales muertos. De manera complementaria y como control negativo para cada fase, tres animales más fueron administrados con el vehículo (10 ml/kg) en el que se disolvieron los tratamientos de prueba (carboximetilcelulosa al 1%).

Al final de los experimentos, los animales que sobrevivieron fueron sacrificados (Lorke, 1983).

V.2.3 Prueba del edema auricular inducido por un éster de forbol (TPA) en ratones

Para evaluar el potencial antiinflamatorio de los extractos, se utilizó el modelo del edema auricular inducido un éster de forbol (TPA) en ratón. La administración de los extractos y compuestos de prueba, se realizó por vía tópica en la oreja derecha en un máximo de 20 µL de un vehículo apropiado (acetona, acetato de etilo o etanol al 70%) al mismo tiempo que se aplicaron los agentes edematogénicos; TPA (2.5 µg/oreja en 20 µL de acetona). Se utilizó como fármaco de referencia la Indometacina (0.1-1 mg/oreja), administrada por la misma vía. La oreja izquierda de cada animal sirvió como un control negativo. Para cuantificar la actividad antiinflamatoria, después de un intervalo de tiempo apropiado (4 horas para el TPA) se sacrificaron a los animales y con ayuda de un sacabocado se obtuvieron biopsias de 7 mm las cuales fueron pesadas. Se probaron dosis de 0.1, 0.5 y 1mg tanto del extracto metanólico, como del acuoso y del fármaco de referencia.

El % de inhibición del edema se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\%I = \left(\frac{\Delta Ec - \Delta Et}{\Delta Ec} \right) * 100$$

Donde ΔE_c es la diferencia de peso del vehículo y ΔE_t la diferencia de peso del tratamiento. Para el análisis estadístico de los datos se aplicó un análisis de variancia seguida por una prueba de Dunnet.

V.2.4 Prueba de estiramiento abdominal inducido por ácido acético al 0.7%

La prueba de estiramiento abdominal es un modelo experimental ampliamente utilizado para la detección de agentes con actividad antinociceptiva a nivel periférico. El ensayo mide la efectividad de los extractos y compuestos puros para contrarrestar la irritación que causa la administración de ácido acético (0.7%) en ratones.

Antes de realizar el ensayo, los animales se distribuyeron en grupos y se mantuvieron en ayuno por 24 horas con libre acceso al agua (*ad libitum*).

Tanto el extracto metanólico como el acuoso (10, 30, 100 y 300 mg/kg) y vehículo (carboximetilcelulosa al 1%) se administraron 30 minutos antes del experimento. Una vez cumplido el tiempo de absorción, se inyectó a los animales por vía intraperitoneal una solución de ácido acético al 0.7%. Inmediatamente después, se colocaron en una caja de plástico transparente y se observaron durante 30 minutos, registrando el número de estiramientos en lapsos de 5 minutos.

En este caso la nocicepción se manifiesta por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto, el experimentador registra el número de los estiramientos de las patas posteriores y flexión del cuerpo hacia atrás. El efecto antinociceptivo se determinó con base en la disminución del número de estiramientos de los animales tratados en relación al control (carboximetilcelulosa al 1%).

En esta prueba se utilizó como control positivo Metamizol (100 mg/kg) y fue administrado 30min antes del agente nociceptivo, este fármaco bloquea el efecto doloroso producido por el ácido acético.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una $*P \leq 0.05$, seguida por una prueba Pos Hoc de Dunnet.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas son reservorios de un gran número de compuestos orgánicos importantes, que han sido utilizados como fuentes para los medicamentos. La dependencia de las plantas es frecuente en países en desarrollo donde la medicina herbal tradicional juega un papel importante en el cuidado de la salud y en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. La población rural de un país está más dispuesta a las formas tradicionales de tratamiento debido a su fácil disponibilidad y un coste más barato. Las terapias a base de hierbas, es una ciencia no escrita que está bien establecida en algunas culturas y tradiciones y se ha convertido en una forma de tratamiento en casi el 80% de las personas en zonas rurales, especialmente en Asia, América Latina y África.

Las hojas de *Morinda citrifolia* fueron elegidas para investigación, debido a que la información bibliográfica y los ensayos experimentales disponibles que indican la actividad biológica que poseen son pocos.

Mediante la presente investigación fue posible generar algunos parámetros de eficacia e inocuidad, de las hojas de *M. citrifolia* así como la revisión de algunos aspectos de índole histórica, etnobotánico, fitoquímico y antropológico.

Se inicia describiendo la evaluación de algunos parámetros de inocuidad y eficacia de los extractos polares de las hojas, posteriormente se hará referencia al fraccionamiento del extracto MCML. La evaluación inicial de sus efectos antinociceptivo y antiinflamatorio de ambos extractos, demostraron tener efectos significativos sobre las respuestas de los modelos empleados (disminuir edema auricular e inhibir el número de estiramientos abdominales). Sin embargo, y por la naturaleza biodirigida del estudio, el extracto MCLM, fue el que presentó un porcentaje mayor de inhibición tanto en la prueba del edema auricular como en el ensayo de estiramiento abdominal, lo que nos llevó a continuar con el estudio de este extracto realizando fraccionamientos primario y secundario, para posteriormente intentar aislar los metabolitos o principios activos responsables de las actividades biológicas.

Esto no significa que el extracto acuoso (MCLA) quedo descartado, ya que su efecto en ambos modelos presentó datos significativos, por lo que sería conveniente seguir estudiando su potencial analgésico y antiinflamatorio.

VI.1 Evaluación de la toxicidad aguda

Todo producto destinado al consumo humano debe demostrar su seguridad. La determinación de la toxicidad aguda es el primer paso en el estudio del potencial tóxico de un extracto natural o una sustancia pura.

Las hojas de *M. citrifolia* Linn tienen pocos antecedentes bibliográficos sobre la evaluación de toxicidad aguda con extractos de alta polaridad, lo cual es una reseña importante y relevante.

El ensayo de Lorke se realiza empleando ratones y permite el cálculo de la dosis letal media (DL_{50}) utilizando un número mínimo de animales en un tiempo relativamente corto.

En la primera fase, los extractos metanólico y acuoso se evaluaron en las dosis de 10, 100 y 1000mg/Kg; se observó que a estas dosis no murió animal alguno, ni aparecieron efectos tóxicos visibles en los grupos tratados. Estos resultados condujeron posteriormente a la ejecución de la segunda fase del experimento. En esta segunda etapa los extractos se evaluaron en dosis más altas 1600, 2900 y 5000mg/Kg. Estas siguientes dosis administradas, no provocaron efectos tóxicos visibles, ni la muerte de los ratones, lo que indica que los extractos de alta polaridad tienen una $DL_{50} > 5000\text{mg/Kg}$.

Toxicidad aguda del extracto Metanólico de <i>M. citrifolia</i> Linn.			
Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/4	1600	0/3
100	0/4	2900	0/4
1000	0/4	5000	0/4

Tabla 7. Resultados de la mortalidad de los ratones en respuesta a las dosis del extracto MCLM.

Toxicidad aguda del extracto Acuoso de <i>M. citrifolia</i> Linn.			
Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/4	1600	0/3
100	0/4	2900	0/4
1000	0/4	5000	0/4

Tabla 8. Resultados de la mortalidad de los ratones en respuesta a las dosis del extracto MCLA.

Aunado a los parámetros de toxicidad y mortandad, otro parámetro importante analizado en el estudio fue la variación en el peso de los animales durante las dos fases de tratamiento. En los gráficos siguientes, se muestran las variaciones de peso de los distintos grupos de ratones (Gráficos 1-4).

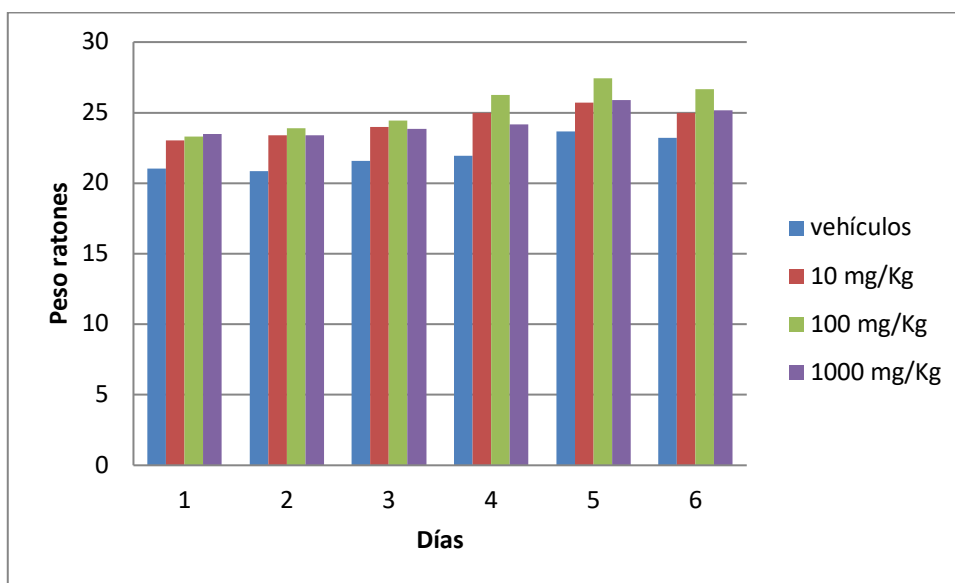


Gráfico 1. Variación de peso de los animales empleados en la primera fase de toxicidad aguda del MCLA

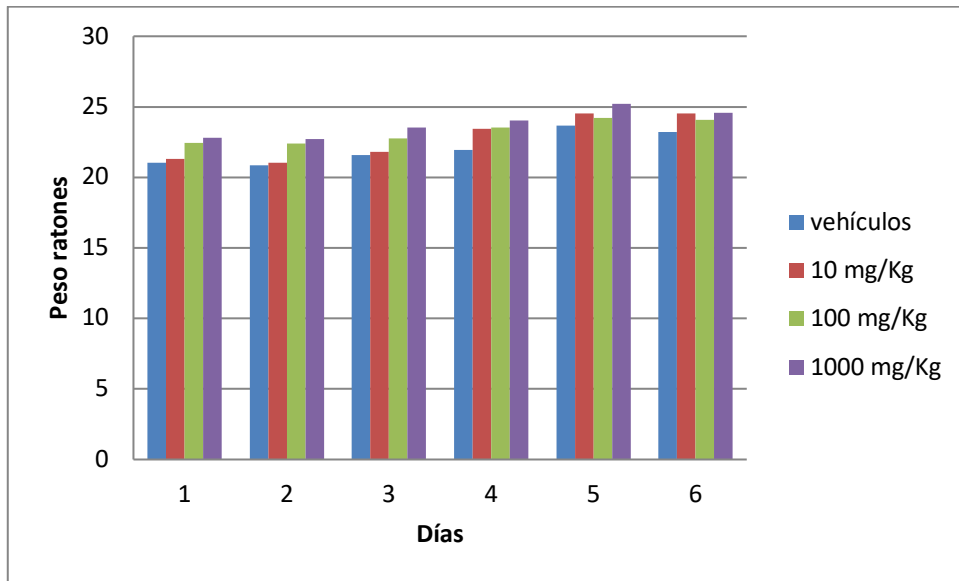


Gráfico 2. Variación de peso de los animales empleados en la primera fase de toxicidad aguda del MCLM

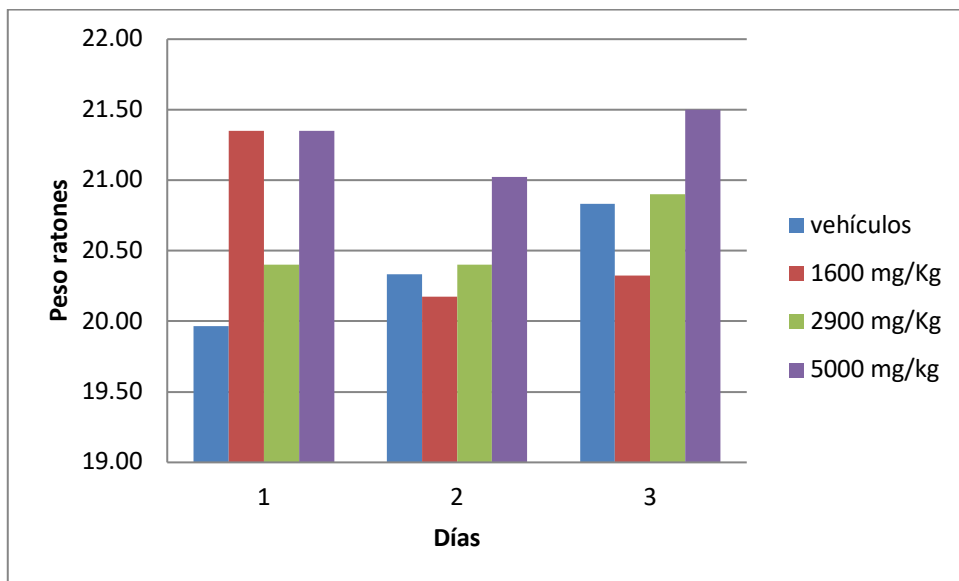


Gráfico 3. Variación de peso de los animales empleados en la segunda fase de toxicidad aguda del MCLA

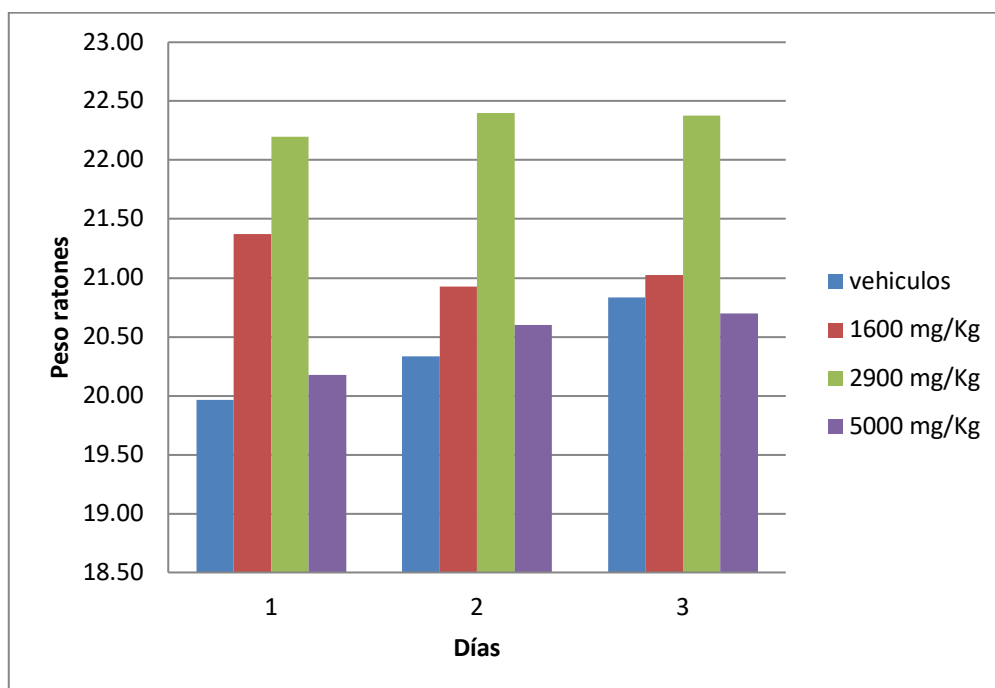


Gráfico 4. Variación de peso de los animales empleados en la segunda fase de toxicidad aguda del MCLM

Se puede observar que los pesos aumentaron de manera gradual en la primera fase del tratamiento en ambos casos de los extractos, mientras que, en la segunda fase del tratamiento, los pesos no aumentaron de manera gradual, ya que por día hubo cambios significativos de acuerdo a la dosis que recibieron los ratones. Sugiriendo un posible efecto sobre el peso corporal o sobre la alimentación de los animales.

VI.1.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo del edema auricular inducido con TPA en ratones

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólico y acuoso de *M. citrifolia* Linn utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA.

El extracto MCLM mostro un efecto antiinflamatorio más significativo que MCLA en comparación con el control negativo (vehículo). Al administrar de manera tópica dosis de 0.1 - 1 mg/kg de los extractos en la oreja, se observó que MCLM inhibió un 63% el edema auricular en comparación con un 53% de inhibición del extracto MCLA a la dosis más alta evaluada. Como fármaco de referencia se utilizó la Indometacina 0.5 mg/kg por oreja, el cual inhibió la formación del edema un 58 %. Si comparamos el efecto inhibitorio del extracto metanólico, con los controles positivos de referencia (Indometacina) es evidente que es mayor el efecto, sin embargo, hay que tomar en cuenta que es un extracto y no un producto puro.

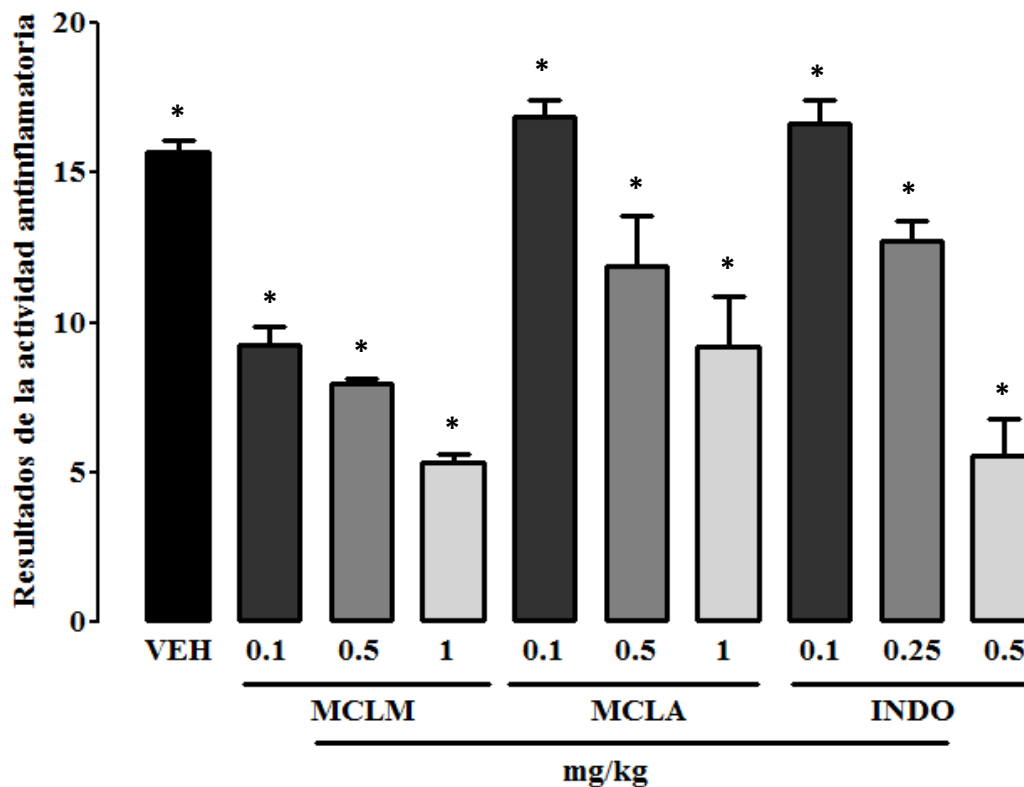


Gráfico 5. Efecto antiinflamatorio de los extractos metanólico (MCLM) y acuoso (MCLA) en el modelo del edema auricular inducido con TPA en ratones. Cada barra representa la media de al menos 8 ratones \pm error estándar medio. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo. $P \leq 0.05$.

VI.1.3 Evaluación de la actividad analgésica en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético al 0.7%.

Se evaluó la actividad analgésica de los extractos metanólico y acuoso de *Morinda citrifolia* Linn utilizando el modelo de estiramiento abdominal.

El extracto metanólico mostro un efecto analgésico significativamente mayor que el acuoso en comparación con el control negativo que fue el vehículo. Al administrar de manera oral con ayuda de una cánula, dosis crecientes de 10-300mg/kg de cada extracto, se observó que el extracto metanólico inhibió un 50% la irritación visceral (disminuyendo el número de estiramientos de las extremidades traseras de los ratones) en comparación con un 49% de inhibición del extracto acuoso a la dosis más alta. Como fármaco de referencia se utilizó la Metamizol 100mg/kg, el cual inhibió la irritación un 77 %. Si comparamos el efecto inhibitorio del extracto metanólico, con los controles positivos de referencia (Metamizol) es evidente que es menor el efecto, sin embargo, hay que tomar en cuenta que es un extracto y no un producto puro.

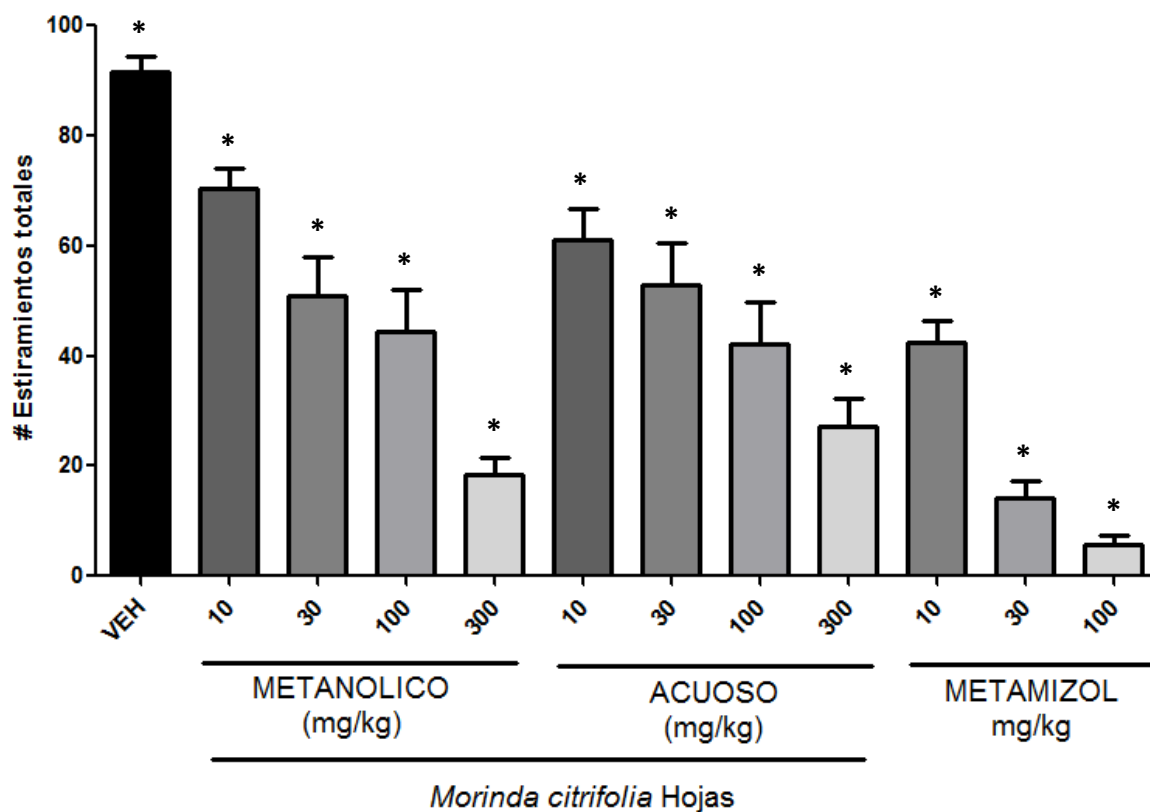


Gráfico 6. Efecto antinociceptivo de los extractos metanólico (MCLM) y acuoso (MCLA) en el modelo de los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 0.7% en ratones. Cada barra representa la media de al menos 8 ratones \pm error estándar medio. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo. $P \leq 0.05$.

Al ser el extracto metanólico el que presentó el mayor efecto analgésico y antiinflamatorio, se procedió a realizar los fraccionamientos sucesivos con la finalidad de identificar al o los compuestos responsables de estos efectos biológicos.

El extracto metanólico se sometió a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta. Se pesaron 8.3336g de extracto metanólico y se empleó un gradiente de elución Hexano-Acetato de etilo (10:0 a 30:70) y Acetato de etilo-Metanol (95:5 a 90:10) obteniendo 291 fracciones.

Posteriormente las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) y en base en que si las muestras corrían igual en la placa podrían ser idénticas y si, por el contrario, corrían distinto entonces no eran la misma sustancia, se prosiguió a hacer reuniones de fracciones dando 10 fracciones secundarias.

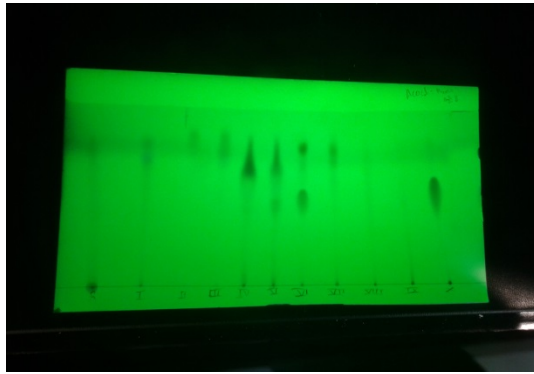


Figura 10. Placa cromatográfica con sistema de elución Acetato de etilo:Metanol 98:2 en lámpara UV (longitud corta).

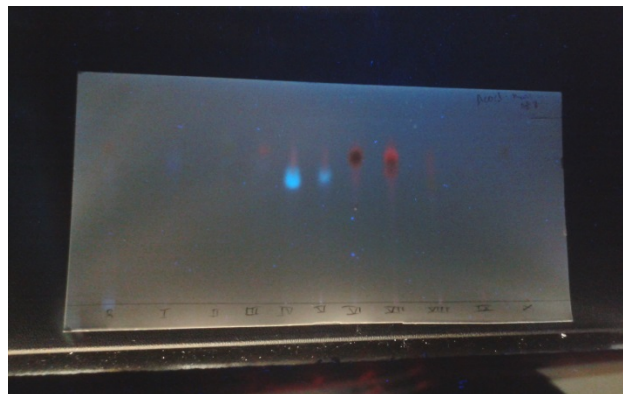


Figura 11. Placa cromatográfica con sistema de elución Acetato de etilo:metanol 98:2 en lámpara UV (longitud larga).

Las fracciones secundarias se emplearon para realizar el modelo de edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA, con la finalidad de determinar la fracción o fracciones que presentaran en mayor proporción las actividades biológicas antiinflamatoria y analgésica.

Para ello se escogieron las fracciones que tuvieran mayor rendimiento, esto con el objetivo que, al término de la experimentación en ratones, se procediera a someter a fraccionamiento la o las fracciones que resultaran con mayor actividad analgésica y antiinflamatoria.

Se evaluaron los extractos IV y V del fraccionamiento metanólico primario para evaluar la actividad biológica de los mismos, utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA, como control positivo se usó Indometacina y como control negativo el vehículo que fue acetona.

Las fracciones IV y V mostraron un efecto antiinflamatorio más significativo en comparación con el control negativo que fue el vehículo. Al administrar de manera tópica dosis de 0.1 - 1 mg/kg de los extractos por oreja, se observó que el extracto metanólico inhibió un 63% el edema auricular en comparación con un 53% de inhibición del extracto acuoso. Como fármaco de referencia se utilizó la Indometacina 0.1 - 0.5 mg/kg por oreja, el cual inhibió la formación del edema un 58 %. Si comparamos el efecto inhibitorio del extracto metanólico, con los controles positivos de referencia (Indometacina) es evidente que es mayor el efecto, sin embargo, hay que tomar en cuenta que es un extracto y no un producto puro como lo es el caso del fármaco.

VII. CONCLUSIONES

- El proceso de preparación de los extractos usados en este proyecto se llevó a cabo de dos maneras diferentes, el extracto acuoso se obtuvo por medio de una infusión de hojas secas y trituradas de *M. citrifolia* Linn, que finalmente fue liofilizada, mientras que el extracto metanólico se preparó por un proceso de maceración del material vegetal con disolvente grado reactivo.
- Se evaluaron los extractos polares de las hojas de *M. citrifolia* L., a través de la prueba de toxicidad aguda en ratones hembra de la cepa CD-1 obtenidos del UPEAL-bioterio de la UAM Xochimilco; la metodología constó de dos fases, durante las cuales se registró la sobrevivencia de los ratones a los cuales se les administró dosis crecientes de los extractos metanólico y acuoso; no se registraron decesos durante el proceso de prueba.
- Se evaluó el potencial antiinflamatorio de los extractos de alta polaridad con la prueba de edema auricular inducido con TPA en ratones hembra de la cepa CD-1; al administrar de manera tópica dosis de 0.1 - 1 mg/kg de los extractos en la oreja, se observó que MCLM inhibió un 63% el edema auricular en comparación con un 53% de inhibición del extracto MCLA a la dosis más alta evaluada. Como fármaco de referencia se utilizó la Indometacina 0.5 mg/kg por oreja, el cual inhibió la formación del edema un 58%.
- Se evaluó el potencial analgésico de los extractos de alta polaridad en la prueba de estiramiento abdominal inducido con ácido acético al 0.7 % en ratones hembra de la cepa CD-1; al administrar de manera oral, dosis crecientes de 10-300mg/kg de cada extracto, se observó que el extracto metanólico inhibió un 50% la irritación visceral (disminuyendo el número de estiramientos de las extremidades traseras de los ratones) en comparación con un 49% de inhibición del extracto acuoso a la dosis más alta. Como fármaco de referencia se utilizó la Metamizol 100mg/kg, el cual inhibió la irritación un 77 %.
- Del extracto más activo, se procedió a realizar su fraccionamiento por medio de cromatografía en columna abierta; el extracto metanólico presentó el mayor efecto analgésico y antiinflamatorio, por lo que se le realizaron fraccionamientos sucesivos con la finalidad de identificar al o los compuestos responsables de estos efectos biológicos. El extracto metanólico se sometió a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta, posteriormente las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF). Por su similitud cromatográfica se realizaron 10 reuniones de fracciones secundarias, las cuales se emplearon para realizar el modelo de Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA, con la finalidad de determinar la fracción o fracciones que presentaran en mayor proporción las actividades biológicas antiinflamatoria y analgésica. Las fracciones IV y V mostraron un efecto antiinflamatorio más significativo en comparación con el control negativo que fue el vehículo (acetona).

- Se obtuvieron dos compuestos de las hojas de *M. citrifolia* las cuales fueron enviadas a RMN para su identificación y después evaluar sus efectos antiinflamatorio y analgésico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Salas, R. A. (2007). Fisiología y Control del dolor. *Informe Médico*. 9 (10): 517-531.
- Goicoechea, C. y Martín, M. I. (2006). Mecanismos periféricos y centrales del dolor. *Reumatología Clínica*. 2 (1): 5-9.
- Micó, J. A. y Ortega-Álvaro, A. (2006). Modelos animales de dolor. *Reumatología Clínica*. 2 (1): 2-4.
- Yueqin, Z. (2007). Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Tesis Doctoral. *Servei de Publicacions*. Universidad de Valencia, España.
- Gawade, S. P. (2012). Acetic acid induced painful endogenous inflection in writhing test on mice. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 3(4), 348.
- Martínez A. L., González Trujano Ma. E. y López Muñoz, F. J. (2013). Endogenous opioids participation in the effect of *Rosmarinus officinalis L.* in the visceral, inflammatory and gout arthritis nociception in rodents. *Mental Health*. 36 (2). 133-139.
- Tortora, G. J. y Derrickson, B. (2011). Principios de anatomía y fisiología. Editorial Médica Paramericana. 11ª Ed. Madrid, España.
- Mendoza Patiño, N. De León Rodríguez, J. y Figueroa Hernández, J. L. (2005). Herbolaria. *Departamento de Farmacología*, Facultad de Medicina, UNAM. 48 (6): 248-250.
- Covarrubias Gómez, A. y Guevara López, U. (2009). Evaluación del consumo de medicina herbal en el enfermo con dolor: Un estudio piloto. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 32 (3): 156-162.
- Deng, S. J., West B. y Jarakae J.C. (2010). A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their comercial products. *Food Chemistry*. 122: 267-270.
- Kalimuthu, K., Kadarkarai, M., Shanmugam, P. S., y Jiang-Shiou, H. (2012). Larvicidal activity of *Morinda citrifolia L.* (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*. 111: 1481-1490.
- Melendez Córdova, M. E. y Pérez León, L. A. (2002). Propagación del Noni (*Morinda citrifolia*) utilizando ECO-HUM DX en condiciones medio ambientales de la región tropical húmeda de Costa Rica. *Trabajo de Titulación, EARTH*. Costa Rica. 44 p.
- Wong, M. Y., West, B., Jensen, C. J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. y Anderson, G. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*. 23 (12): 1127-1141.
- Matthias, H. (2007). Noni fruit (*Morinda citrifolia*) – novel food or herbal medicine. A review on safety, pharmacology, health-related claims and benefits. *Schweiz. Zschr. Ganzheits Medizin*. 19: 42-47.
- West, B. J., Jensen, C. J., Westendorf, J. and Whitel. D. (2006). A safety review of Noni fruit juice. *Institute of Food Technologists*. 10 (11): 1750-3841.

- Brown, A. C. (2012). Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit: A review. *Phytotherapy Research*. 26: 1427-1440.
- Pawlus, A.D. y Kinghorn, A. D. (2007). Review of the ethnobotany, chemistry biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59: 1587-1609.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO POR LAS ACTIVIDADES
ANTIINFLAMATORIA Y ANALGÉSICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y
ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae).

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

"Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos"

Alumno: Catherine Arteaga Larumbe. Matrícula: 208357542

Asesores(es): Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa.

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Departamento de Sistemas Biológico, Edificio "N", laboratorio N015.

Fechas de inicio y terminación del S.S. 14 de marzo de 2013 a 14 de septiembre de 2013

Marzo, 2021.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad la preparación, estudio fitoquímico y evaluación biológica (antiinflamatoria y antinociceptiva) de dos extractos de alta polaridad (metanólico y acuoso), a partir de las hojas del Noni (*Morinda citrifolia L.*) de una colecta obtenida en Coyuquilla, Estado de Guerrero. El extracto acuoso se obtuvo por medio de una infusión de hojas secas y trituradas de *M. citrifolia Linn*, que finalmente fue liofilizada, mientras que el extracto metanólico se preparó por un proceso de maceración del material vegetal con disolvente grado reactivo.

Los extractos polares, se evaluaron empleando tres pruebas biológicas; estimación de la toxicidad aguda, prueba de edema auricular inducido con TPA y, prueba de estiramiento abdominal inducido con ácido acético al 0.7 %, todas realizadas en ratones CD-1 obtenidos del UPEAL-bioterio de la UAM Xochimilco. Posteriormente, el extracto más activo, se procedió a realizar su fraccionamiento por medio de cromatografía en columna abierta. El extracto metanólico presentó el mayor efecto analgésico y antiinflamatorio, realizando fraccionamientos sucesivos con la finalidad de identificar al o los compuestos responsables de estos efectos biológicos. A través de la cromatografía en capa fina (CCF) y con base en su similitud cromatográfica, se realizaron las reuniones de fracciones, dando 10 fracciones secundarias finales. Estas fueron evaluadas empleando el modelo de edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA, con la finalidad de determinar la fracción o fracciones que presentaran en mayor proporción las actividades biológicas antiinflamatoria y analgésica. Las fracciones IV y V mostraron un efecto antiinflamatorio más significativo en comparación con el control negativo que fue el vehículo (acetona).

JUSTIFICACIÓN

En México, el cultivo de Noni y la preparación del jugo de la fruta de este árbol, se realizan desde ya varios años principalmente en los Estados de Morelos y Guerrero; incentivados por la propaganda de sus atributos terapéuticos. Las investigaciones acerca de esta especie se han enfocado en el estudio de los metabolitos secundarios presentes principalmente en la fruta, aunque la corteza, semillas y hojas ya han sido estudiadas; por tanto, existen gran cantidad de estudios científicos encaminados a determinar sus atributos medicinales, su efectos tóxicos y bondades alimenticias (West, 2006; Hamburger, 2007; Brown, 2012).

El aislamiento de metabolitos presentes en las hojas del Noni resulta ser de gran importancia, ya que, según la medicina tradicional, poseen efectos terapéuticos importantes, además de emplearse como alimento con alto valor nutritivo, sin evidencia de toxicidad o de ser alergénico. Además de contribuir a conocer si la especie estudiada produce nuevos metabolitos en comparación a las hojas de otras regiones del mundo.

En este trabajo, se planteó la preparación, estudio fitoquímico y evaluación biológica de dos extractos polares (metanólico y acuoso), a partir de las hojas del noni de una colecta obtenida en Coyuquilla, Estado de Guerrero.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar los efectos antiinflamatorio y analgésico de dos extractos de alta polaridad (metanólico y acuoso) obtenidos a partir de las hojas de *Morinda citrifolia L.* (Rubiaceae).

Particulares:

- Preparar los extractos acuosos (liofilización) y metanólico (maceración).
- Evaluar la toxicidad aguda de los extractos polares de las hojas de *M. citrifolia L.* (Rubiaceae).
- Evaluar el potencial antiinflamatorio de los extractos de alta polaridad en la prueba del edema auricular inducido con TPA en ratones.
- Evaluar el potencial analgésico de los extractos de alta polaridad en la prueba de estiramiento abdominal inducido con ácido acético al 0.7 % en ratones.
- Del extracto más activo, realizar su fraccionamiento por medio de cromatografía en columna abierta.

MÉTODOS

El extracto acuoso se obtuvo por medio de una infusión de hojas secas y trituradas de *M. citrifolia Linn*, que finalmente fue liofilizada, mientras que el extracto metanólico se preparó por un proceso de maceración del material vegetal con disolvente grado reactivo.

Preparación de los extractos metanólico (MCLM) y acuoso (MCLA), fraccionamiento.

Se procesó material seco y pulverizado de las hojas de *M. citrifolia Linn*, por medio de dos extractos: metanólico y acuoso; el extracto acuoso se liofilizó para obtener un sólido que posteriormente se analizaría química y biológicamente; mientras que el extracto metanólico, fue sometido a fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta, usando diferentes mezclas de disolventes como fases móviles. Del extracto metanólico se hicieron tres fraccionamientos principales (primario, secundario y terciario) de los cuales se sacaron las muestras necesarias para la evaluación biológica.

Toxicidad *in vivo* por la Prueba de Lorke

La toxicidad fue medida por el método de Lorke y consto de dos fases, en cada fase se emplearon ratones CD-1, a los cuales se les administró dosis crecientes de los extractos metanólico y acuoso (10, 100 y 1000 mg/kg) por vía oral; en la segunda fase se emplearon dosis más altas de los mismos extractos ((1600, 2900 y 5000 mg/Kg); fueron observados durante un periodo de 15 días, registrando algún cambio en su patrón conductual, efectos tóxicos o la muerte.

Prueba del edema auricular inducido por un éster de forbol (TPA) en ratones

El modelo para evaluar el potencial antiinflamatorio de los extractos fue el del edema auricular inducido un éster de forbol (TPA) en ratón. La administración de los extractos y compuestos de prueba se realizó por vía tópica en la oreja derecha, se utilizó como fármaco de referencia la Indometacina, administrada por la misma vía. La oreja izquierda de cada animal sirvió como un control negativo. Se probaron dosis de 0.1, 0.5 y 1mg tanto del extracto metanólico, como del acuoso y del fármaco de referencia.

Prueba de estiramiento abdominal inducido por ácido acético al 0.7%

Se mide la efectividad de los extractos y compuestos puros para contrarrestar la irritación que causa la administración de ácido acético (0.7%) en ratones. Tanto el extracto metanólico como el acuoso (10, 30, 100 y 300 mg/kg) y vehículo (carboximetilcelulosa al 1%) se administraron 30 minutos antes del experimento; cumplido el tiempo de absorción, se inyectó a los animales por vía intraperitoneal una solución de ácido acético al 0.7%. La nocicepción se manifiesta por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto, el experimentador registra el número de los estiramientos de las patas posteriores y flexión del cuerpo hacia atrás. El efecto antinociceptivo se determinó con base en la disminución del número de estiramientos de los animales tratados con relación al control (carboximetilcelulosa al 1%); como control positivo se empleó Metamizol (100 mg/kg) y, fue administrado 30 min antes del agente nociceptivo, este fármaco bloquea el efecto doloroso producido por el ácido acético.

RESULTADOS

Las hojas de *Morinda citrifolia* Linn fueron elegidas para investigación, debido a que la información bibliográfica y los ensayos experimentales disponibles que indican la actividad biológica que estas poseen, son pocos. Se evaluaron algunos parámetros de inocuidad y eficacia de los extractos polares de las hojas, posteriormente se hace referencia al fraccionamiento del extracto MCML. La evaluación inicial de sus efectos antinociceptivo y antiinflamatorio en ambos extractos, demostraron tener efectos significativos sobre las respuestas de los modelos empleados (disminuir edema auricular e inhibir el número de estiramientos abdominales). Sin embargo, por la naturaleza biodirigida del estudio, el extracto MCLM, fue el que presentó un porcentaje mayor de inhibición tanto en la prueba del edema auricular como en el ensayo de estiramiento abdominal, lo que llevó a continuar con el estudio de este extracto, realizando fraccionamientos primario y secundario, para posteriormente intentar aislar los metabolitos o principios activos responsables del efecto terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- Salas, R. A. (2007). Fisiología y Control del dolor. *Informe Médico*. 9 (10): 517-531.
- Goicoechea, C. y Martín, M. I. (2006). Mecanismos periféricos y centrales del dolor. *Reumatología Clínica*. 2 (1): 5-9.

- Micó, J. A. y Ortega-Álvaro, A. (2006). Modelos animales de dolor. *Reumatología Clínica*. 2 (1): 2-4.
- Yueqin, Z. (2007). Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Tesis Doctoral. *Servei de Publicacions*. Universidad de Valencia, España.
- Gawade, S. P. (2012). Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 3(4), 348.
- Martínez A. L., González Trujano Ma. E. y López Muñoz, F. J. (2013). Endogenous opioids participation in the effect of *Rosmarinus officinalis L.* in the visceral, inflammatory and gout arthritis nociception in rodents. *Mental Health*. 36 (2). 133-139.
- Tortora, G. J. y Derrickson, B. (2011). Principios de anatomía y fisiología. Editorial Médica Paramericana. 11ª Ed. Madrid, España.
- Mendoza Patiño, N. De León Rodríguez, J. y Figueroa Hernández, J. L. (2005). Herbolaria. *Departamento de Farmacología*, Facultad de Medicina, UNAM. 48 (6): 248-250.
- Covarrubias Gómez, A. y Guevara López, U. (2009). Evaluación del consumo de medicina herbal en el enfermo con dolor: Un estudio piloto. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 32 (3): 156-162.
- Deng, S. J., West B. y Jarakae J.C. (2010). A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their comercial products. *Food Chemistry*. 122: 267-270.
- Kalimuthu, K., Kadarkarai, M., Shanmugam, P. S., y Jiang-Shiou, H. (2012). Larvicidal activity of *Morinda citrifolia L.* (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*. 111: 1481-1490.
- Melendez Córdova, M. E. y Pérez León, L. A. (2002). Propagación del Noni (*Morinda citrifolia*) utilizando ECO-HUM DX en condiciones medio ambientales de la región tropical húmeda de Costa Rica. *Trabajo de Titulación, EARTH*. Costa Rica. 44 p.
- Wong, M. Y., West, B., Jensen, C. J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. y Anderson, G. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*. 23 (12): 1127-1141.
- Matthias, H. (2007). Noni fruit (*Morinda citrifolia*) – novel food or herbal medicine. A review on safety, pharmacology, health-related claims and benefits. *Schweiz. Zschr. Ganzheits Medizin*. 19: 42-47.
- West, B. J., Jensen, C. J., Westendorf, J. and Whitel. D. (2006). A safety review of Noni fruit juice. *Institute of Food Technologists*. 10 (11): 1750-3841.
- Brown, A. C. (2012). Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit: A review. *Phytotherapy Research*. 26: 1427-1440.
- Pawlus, A.D. y Kinghorn, A. D. (2007). Review of the ethnobotany, chemistry biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59: 1587-1609.

Visto Bueno de los asesores:


Vo. Bo. Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa