



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

Título:

Valoración de los efectos antifúngicos del jugo de noni
(*Morinda citrifolia*)

Proyecto:

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

Etapas:

Extracción de principios activos o sustancias auxiliares a
partir de productos naturales.

Presenta:

Jorge Omar Valencia Hernández

Asesores:

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández
(asesora externa)

Dr. Hugo César Ramírez Saad
(asesor interno)

Índice.

Introducción	4
Marco teórico.	4
<i>Morinda citrifolia</i>	4
<i>Candida albicans</i>	5
Justificación.	6
Objetivo general.	7
Objetivos específicos.	7
Metodología	7
1. Caracterización parcial del jugo de <i>Morinda citrifolia</i>	7
1.1. Adquisición del fruto	7
1.2. Obtención de las soluciones de trabajo (jugo de noni, recuperado acuoso, exudado y extracto acetónico)	7
1.3. Determinación del pH	8
1.4. Ensayos de determinación de proteínas del noni	8
1.5. Determinación de azúcares reductores por el método de Miller	10
2. Ensayos de actividad antifúngica de <i>Morinda citrifolia</i>	10
2.1. Recuperación de las cepas de los hongos	10
2.2. Siembra y conservación de <i>F. solani</i>	10
2.3. Siembra y conservación de <i>C. albicans</i>	11
2.4. Pruebas de sensibilidad de los hongos ante el noni	11
2.5. Siembra de los hongos por vertido en caja	11
2.6. Modificación del método de Kirby-Bauer	12
2.7. Medición de los halos de inhibición	13
Resultados	13
Determinación del pH	13
Determinación de proteínas	13
Electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras de exudado y exudado concentrado	14
Cuantificación de azúcares reductores	14
Pruebas de inhibición de crecimiento	15
Discusión	16
Conclusiones	17
Bibliografía	18

Índice de figuras

Figura 1 Cuadrantes contados de la cámara de Neubauer	11
Figura 2 Cálculo del número de células por mililitro en cámara de Neubauer, donde el factor de conversión de volumen fue de μL a mL (10,000), las áreas contadas fueron 4 y el factor de dilución fue 1:1000 (1×10^{-3})	11
Figura 3 Cálculo del porcentaje de inhibición de los microorganismos con los diferentes tratamientos de noni	13
Figura 4 Ecuación de la recta correspondiente al ensayo de Lowry	14
Figura 5 Gel de acrilamida con bandas de las muestras de exudado y exudado concentrado	14
Figura 6 Ecuación de la recta correspondiente al ensayo de Miller	14
Figura 7 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre <i>C. albicans</i>	15
Figura 8 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre <i>F. solani</i>	15
Figura 9 Controles negativos de ambos microorganismos	16
Figura 10 Tratamientos contra <i>F. solani</i> , en orden: recuperado acuoso, extracto acetónico, exudado y exudado 1:2	16
Figura 11 Tratamientos contra <i>C. albicans</i> , en orden: recuperado acuoso, extracto acetónico, exudado y exudado 1:2	16

Índice de tablas.

Tabla 1 determinaciones de pH	13
Tabla 2 Concentración de proteínas por un mililitro de muestra	13
Tabla 3 Concentración de azúcares reductores por un mililitro de muestra	14

Introducción

El uso de plantas medicinales forma parte de la cultura ancestral, se ha recurrido a ellas como remedios caseros para tratar diversas afecciones. Las plantas utilizadas tienen componentes fitoquímicos que les confieren diversas características, un ejemplo de ello es *Morinda citrifolia* (también conocida como “noni”) a la cual se le atribuyen diferentes propiedades medicinales que van desde el alivio del dolor e inflamación, hasta control del cáncer, además de evitar el crecimiento microbiano. Siguiendo esta línea, el propósito de este trabajo es evaluar las propiedades antifúngicas que tiene el jugo de la planta *Morinda citrifolia* frente a dos hongos de distinto origen: *Candida albicans* una levadura patógena en humanos, y *Fusarium sp.* Un fitopatógeno de diversas especies.

Marco teórico.

Morinda citrifolia

Es una planta arbórea o arbustiva de la familia de las Rubiáceas, popularmente conocida como “noni” o guanábana cimarrona; es originaria del sudeste del continente asiático a la que se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas. Según Gonzales y Gonzáles (2003), los curanderos polinesios usaban el jugo de la fruta para tratar fiebres, infecciones varias, diarreas, estreñimiento, asma, picaduras de insectos, mordeduras de animales, alergias, artritis, cáncer, depresión, diabetes, enfermedades del corazón, problemas varios -de riñón, menstruales, mentales, musculares, por ejemplo-, obesidad, dolores de cabeza, inhibición sexual, pérdida del sueño y estrés, por lo que se le considera como una “fruta milagrosa”.

De acuerdo con la información recabada por Almedia y colaboradores (2018), el noni maduro está compuesto de 90% agua y 10% de materia seca, de la que la mayor parte está compuesta por sólidos solubles de los que resaltan azúcares reductores (principalmente glucosa y fructosa) con un 5% del total y un 1.3% de sacarosa, el otro 3.7% consiste en proteínas y fibra. Dentro de esta misma investigación se reportó que una muestra de 100 g polvo del fruto está compuesto por 71% de carbohidratos, 5.6% de proteína y el resto de fibra, aunque estas cantidades pueden variar debido al tratamiento del fruto, el estado de maduración o incluso la zona geográfica de donde se está cosechando el fruto.

Farine *et al.* (1996) analizaron la planta en general, y el fruto en particular, llevándolos a descubrir una gran cantidad y variedad de compuestos fitoquímicos que ayudan a explicar sus propiedades medicinales; dentro de los cuales podemos destacar:

- Damnacanthal: puede promover la activación de genes reguladores de la apoptosis en líneas celulares humanas con cáncer, a través de la inducción de la actividad de caspasas.
- Norepinefrina: estimula el sistema nervioso simpático mediante la unión a receptores de tipo α y β los cuales tienen funciones de vasoconstricción y vasodilatación, respectivamente.

La investigación de Ayala *et. al.* (2018) reporta los análisis del fruto y su jugo, revelando que cuenta con diversos componentes bioquímicos solubles en agua dentro de los que se destacan:

- Flavonoides y taninos: ambos tienen actividad antimicrobiana, estos pueden proporcionar radicales libres que forman complejos con aminoácidos nucleofílicos en las proteínas, lo cual las inactiva.
- Alcaloides: pueden cambiar la polaridad de la pared bacteriana a través de la unión con proteínas transportadoras de membrana, así como inhibir la síntesis de ADN, ARN y proteínas.
- Saponinas: tienen la capacidad de causar fuga de enzimas y proteínas de los microorganismos, esto se lleva a cabo por la unión de complejos entre saponinas y fosfolípidos de las membranas, conduciendo a la formación de poros y al incremento de la permeabilidad de membrana.
- Compuestos fenólicos: poseen propiedades pro-oxidativas, además de modificar la hidrofobicidad y la carga superficial de las células, provocando su lisis.

Un ejemplo de la actividad de los metabolitos anteriormente mencionados es sobre *Candida albicans*, hongo que se ve afectado por la actividad de los taninos y flavonoides, los cuales afectan el metabolismo responsable de la conversión morfológica del hongo, por este motivo se le puede considerar como tratamiento antifúngico alternativo (Ayala Huaman, et al, 2018).

Candida albicans

Es un hongo que pertenece al Filum Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. Es dimórfico por lo que, a distintas temperaturas, se puede encontrar ya sea como un hongo filamentoso (a temperaturas de 25°C), o como una levadura (a temperaturas de 37°C) y, debido a esta condición, puede evitar al sistema inmunológico del hospedero, pues en su forma de hongo filamentoso, se comporta como parásito mientras que, en su forma de levadura, adquiere un carácter saprofito (INSST, 2012).

En el cuerpo humano este hongo puede residir en las membranas mucosas de las cavidades oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal, sin embargo, puede encontrarse en otros tejidos como piel, uñas y cuero cabelludo. Su transmisión endógena es por contacto a través de la piel y las mucosas, por inoculación accidental o mordedura de un portador del hongo, así como la exposición prolongada a fluidos potencialmente contaminados (Panizo & Reviákina, 2001).

Al ser un organismo oportunista, su patogenicidad depende del control que ejerza el sistema inmune del hospedero sobre él; puede provocar candidiasis, que es la enfermedad micótica más frecuente en la población mundial, y se puede presentar tanto en personas sanas como inmunocomprometidas. También puede provocar candidemia, esta es la infección fúngica nosocomial más relevante y prevalente asociada con una alta tasa de mortalidad en pacientes con un sistema inmunológico comprometido.

Considerando lo anterior, es de suma importancia contar con tratamientos eficaces y seguros contra el hongo, además, optar por terapias alternativas (como el uso del noni) es una buena opción para personas que tengan una infección de este hongo y no tengan que recurrir a un especialista, o bien, pacientes que se encuentren en tratamientos contra alguna otra afección y que así no tengan que consumir aún más medicamentos (Ayala et al., 2018)

Fusarium sp.

Es un hongo fitopatógono oportunista que pertenece al Filum Ascomycota; se caracteriza por ser un hongo filamentoso de hifas septadas, hialinas y por tener reproducción sexual. Se comporta como un hongo saprófito que habita naturalmente en el suelo y en la materia orgánica en descomposición (Forero Reyes, et al., 2018).

El hongo produce clamidosporas que resisten el secado, la falta de nutrientes o temperaturas extremas, lo que permite su supervivencia por largos periodos de tiempo en el suelo. Asimismo, produce conidios en esporodoquio (tallos que contienen los conidios) de tamaño micro y macroscópico. La transmisión de los conidios generalmente ocurre a través de restos de la planta infectada o salpicaduras con agua contaminada con ellos. La infección con este hongo sucede principalmente en las etapas iniciales del cultivo, pues es capaz de infectar las semillas de las plantas mientras germinan y de crecer en las raíces de estas, por lo cual puede pasar desapercibido hasta que existe un debilitamiento de la planta. Cuando se encuentra en las raíces, las clamidosporas o los conidios germinan e ingresan al xilema, desarrollándose hacia la parte superior de la planta, tapando el tejido y reduciendo el movimiento de agua, en consecuencia, el follaje se torna de color amarillo. Algunas especies de *Fusarium* producen toxinas que son nocivas tanto para las plantas como para los animales o los humanos que las consumen (Secretaria de agricultura y desarrollo rural, 2020).

Este género es conocido por su capacidad fitopatogénica ya que es capaz de infectar a una gran variedad de cultivos, dentro de los que destacan: maíz, trigo, avena y cebada. Todos ellos son de consumo tanto humano como animal, por lo que se cultivan en grandes volúmenes en el mundo; la presencia desmedida de este género fúngico en los cultivos antes mencionados podría suponer una crisis tanto alimentaria como económica y, aunque existen opciones para controlar la propagación del hongo (como la rotación de cultivos o el uso de fungicidas), podría optarse por el uso de un antifúngico natural como el noni (o algún extracto a base de este fruto) como apoyo para que los cultivos se mantengan sanos y se cuente con un abanico más amplio de posibilidades para el control del hongo (Secretaria de agricultura y desarrollo rural , 2020).

Justificación.

El uso de productos naturales para curar afecciones de salud ha estado presente desde las antiguas civilizaciones. Ya sea por su fácil acceso o la cantidad de propiedades con las que se asocian, son para muchos la primera opción para tratar sus padecimientos; por este motivo es de vital importancia poder realizar análisis y estudios que no sólo avalen sus efectos, sino que además puedan servir como pauta para futuras terapias o tratamientos. El noni es una planta de origen asiático que se ha relacionado con una gran variedad de efectos benéficos, dentro de los cuales se puede resaltar la actividad antimicrobiana, la cual cobra relevancia hoy en día debido a la aparición de cepas resistentes a antibióticos y antifúngicos; esta situación nos hace buscar alternativas que ayuden a combatir las cepas resistentes de manera eficaz. Además de ser una potencial alternativa terapéutica para los humanos, podría explorarse su uso en el campo como una alternativa a los pesticidas sintéticos que son utilizados en la producción de alimentos. Así, la intención de este trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana, en específico la actividad antifúngica, que tiene el jugo del noni sobre dos hongos de importancia económica y para la salud.

Objetivo general.

Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica del jugo de *Morinda citrifolia* sobre el crecimiento de los hongos *Candida albicans* y *Fusarium sp.*

Objetivos específicos.

1. Realizar un análisis químico del jugo de *Morinda citrifolia* para su caracterización parcial.
2. Evaluar la actividad antifúngica del jugo de *Morinda citrifolia* frente a cultivos de *Candida albicans* y *Fusarium sp.*
3. Determinar la dosis en la que el jugo de *Morinda citrifolia* es efectiva contra los cultivos de *Candida albicans* y *Fusarium sp.*
4. Hacer extractos acuosos y acetónico de *Morinda citrifolia* y probar su actividad antimicótica.

Metodología

1. Caracterización parcial del jugo de *Morinda citrifolia*
 - 1.1. Adquisición del fruto
 - 1.1.1 El noni fue obtenido de un huerto particular en el estado de Morelos.
 - 1.2. Obtención de las soluciones de trabajo (jugo de noni, recuperado acuoso, exudado y extracto acetónico)
 - 1.2.1. Obtención del jugo de noni
 - 1.2.1.1. En una licuadora se realizó la molienda del fruto con un poco de agua, hasta tener un jugo homogéneo, se conservó en refrigeración a 4°C.
 - 1.2.2. Obtención del recuperado acuoso (r.a)
 - 1.2.2.1. Transcurridos 15 días desde la preparación del jugo de noni, éste se separó en 2 fases, la pulpa concentrada en el fondo y una fase acuosa la cual fue recuperada (recuperado acuoso). Se conservó en refrigeración a 4 °C.
 - 1.2.3. Obtención del exudado del fruto
 - 1.2.3.1. En un recipiente con tapa se depositaron varios frutos de noni y se dejaron reposar hasta que estos liberaron su exudado, este exudado fue recuperado en otro recipiente y se conservó en refrigeración a 4 °C
 - 1.2.4. Obtención del extracto acetónico
 - 1.2.4.1. En un embudo de separación se añadieron 25 mL del jugo de noni y 25 mL de acetona, se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 12 horas.
 - 1.2.4.2. Transcurrido el tiempo, se procedió a recuperar la fase orgánica en un vaso de precipitados y se dejó evaporar en la campana de extracción durante un día.
 - 1.2.4.3. El extracto fue resuspendido en 10 mL de agua estéril y fue conservado en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis.
 - 1.2.5. Obtención de muestras concentradas y filtradas de exudado y recuperado acuoso
 - 1.2.5.1. Las muestras del exudado y recuperado acuoso fueron tratadas de la misma forma

1.2.5.2. Con ayuda de una balanza de platillos se nivelaron las canastillas de la centrifuga, las canastillas contenían dentro tubos concentradores de 50 mL. Los filtros de los tubos concentradores se llenaron con la muestra.

1.2.5.3. Con las canastillas niveladas se procedió a centrifugar las muestras a 3500 rpm durante 15 minutos. Esta operación fue repetida en 3 veces.

1.2.5.4. Al término de cada ronda de centrifugación se recupero el volumen del filtro (muestra concentrada) y del fondo del tubo (muestra filtrada) en tubos separados.

1.3. Determinación del pH

1.3.1. Las muestras (jugo de noni, recuperado acuoso, exudado y extracto acetónico) fueron medidas con ayuda de un potenciómetro

1.3.2. El electrodo del potenciómetro fue introducido a las muestras hasta obtener una lectura fija y se realizaron las lecturas por duplicado en cada muestra.

1.4. Ensayos de determinación de proteínas del noni

1.4.1. Determinación de proteínas por el método de Lowry

1.4.1.1. Preparación de curva patrón

1.4.1.1.1. A partir de una solución stock de BSA de 200 µg/mL, se tomaron volúmenes desde 0 hasta 500 µL, cada tubo con solución se aforó con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 500 µL.

1.4.1.2. Preparación de muestras

1.4.1.2.1. Se les dio el mismo tratamiento a las muestras de jugo de noni, recuperado acuoso y exudado.

1.4.1.2.2. Se tomó 1 mL de la muestra y se realizaron diluciones seriadas desde 1:2 hasta 1:256, de estas diluciones se tomaron 500 µL y se depositaron en un tubo de ensayo.

1.4.1.3. Ensayo de Lowry

1.4.1.3.1. En cada tubo de muestra se agregaron 2.5 mL de reactivo de Lowry (Sulfato de Cobre Pentahidratado 0.98 g/L, Tartrato de sodio dihidratado 1.96 g/L, Carbonato de Sodio 196.08 g/L e Hidróxido de sodio 39.22 g/L).

1.4.1.3.2. Los tubos fueron agitados en el Vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

1.4.1.3.3. Posteriormente se agregaron 0.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 en H₂O) a cada tubo, se agitaron en el Vortex y se incubaron en obscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos.

1.4.1.3.4. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

1.4.2. Electroforesis en geles de acrilamida

1.4.2.1. Concentración de las muestras

1.4.2.1.1. Todas las muestras de exudado y recuperado acuso fueron tratadas de la misma manera.

1.4.2.1.2. Con ayuda de una balanza de platillos se nivelaron las canastillas de centrifuga, estas canastillas contenían tubos concentradores de 50 mL. A los tubos se les añadió muestra hasta llenar los filtros.

- 1.4.2.1.3. Una vez que las canastillas estuvieron niveladas, se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos. Esta operación se repitió 3 veces.
- 1.4.2.1.4. Al terminar cada ronda de centrifugación, se recuperaban en tubos separados los volúmenes que estaban dentro del filtro (concentrado) y en la parte de abajo en el tubo (filtrado).
- 1.4.2.2. Preparación de las muestras
- 1.4.2.2.1. Para el recuperado acuoso (filtrado y concentrado), Exudado (filtrado) se dieron los mismos tratamientos
- 1.4.2.2.2. Se tomaron 50 μL de cada muestra, 10 μL de buffer de muestra (Tris 1M pH 6.8 0.6mL, Glicerol al 50% 5mL, SDS al 2 % 2mL, agua 1.23 mL y azul de bromofenol al 1%) y 10 μL de NaOH 1N para neutralizar el pH ácido de las muestras.
- 1.4.2.2.3. Para la muestra de exudado concentrado se tomaron 20 μL , se les añadieron 4 μL de buffer de muestra y 4 μL de NaOH 1N.
- 1.4.2.2.4. Todas las muestras (tanto del exudado como del recuperado acuoso) fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos y posteriormente se les centrifugó por 5 segundos para recuperar las gotas de condensación que quedaran en las paredes y la tapa de los tubos.
- 1.4.2.3. Preparación de los geles
- 1.4.2.3.1. El gel concentrador (Acrilamida 16.65% v/v, buffer concentrador 24.85% v/v, agua 57.14 % v/v, persulfato de amonio 1.24% v/v y TMED 5 μL) y gel separador (Acrilamida 39.53 % v/v, buffer separador 34.58 % v/v, agua 24.70 % v/v, persulfato de amonio 0.99 % v/v y TMED 0.15 % v/v) fueron montados en placas de vidrio e introducidos en la cámara de electroforesis.
- 1.4.2.3.2. A los geles dentro de la cámara se les añadió buffer de corrida (Tris base 3g/L, Glicina 14.4g/L, SDS 1g/L) suficiente para cerrar el circuito de la cámara.
- 1.4.2.4. Carga y corrida de muestras en el gel
- 1.4.2.4.1. Se cargaron en el gel 15 μl de cada muestra y 10 μl del marcador de peso molecular (BioRad, Catalog #161-0374).
- 1.4.2.4.2. La corrida se llevó a cabo con una corriente de 200 Volts durante 90 minutos.
- 1.4.2.5. Tinción y revelado de los geles
- 1.4.2.5.1. Los geles fueron retirados de la cámara y se les realizaron 3 lavados con agua durante 2 minutos cada uno.
- 1.4.2.5.2. Terminados los lavados con agua, los geles fueron sumergidos en solución de fijación (metanol 40%, ácido acético 10%) por aproximadamente 20 horas.
- 1.4.2.5.3. Los geles fueron lavados nuevamente 3 veces con agua por 2 minutos.
- 1.4.2.5.4. Los geles se sumergieron en solución de tinción de azul de Coomassie (R-250, No. cat.: 1610436, BioRad) por una hora en agitación constante a 10 rpm.
- 1.4.2.5.5. Una vez el gel estuvo completamente teñido se procedió a desteñirlo, para esto se realizaron varios lavados con solución de

destinción (metanol 10%, ácido acético 10%) hasta que el fondo del gel estuviera transparente y se apreciaran las bandas de proteína en color azul.

1.5. Determinación de azúcares reductores por el método de Miller

1.5.1. Preparación de curva patrón

1.5.1.1. A partir de una solución stock de glucosa con una concentración de 2 mg/mL, se tomaron volúmenes desde 0 hasta 500 µL; cada tubo con solución se aforó con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 800 µL.

1.5.2. Preparación de muestras

1.5.2.1. Se les dio el mismo tratamiento a las muestras del jugo de noni, recuperado acuoso y exudado.

1.5.2.2. Se tomaron 2 mL de muestra y se realizaron diluciones seriadas con agua destilada desde 1:2 hasta 1:256; de estas diluciones se tomaron 800 µL.

1.5.3. Ensayo de Miller

1.5.3.1. A cada tubo de la curva patrón y tubos con muestra se agregaron 200 µL del reactivo DNS (Hidróxido de sodio 14 g/L, 3-5 DNS 7.5 g/L, Tartrato de sodio y potasio 216 g/L, Fenol 5.4 g/L y Metabisulfito de Sodio 5.9 g/L) para posteriormente ser calentados a 100 °C por 5 minutos.

1.5.3.2. Después de ser calentadas, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente, fueron centrifugadas por 20 segundos y traspasadas a tubos de ensayo donde se les agregaron 4 mL de agua destilada para tener un volumen final de 5 mL.

1.5.3.3. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

2. Ensayos de actividad antifúngica de *Morinda citrifolia*

2.1. Recuperación de las cepas de los hongos

2.1.1. *F. solani*

2.1.1.1. La sepa de *F. solani* fue obtenida de un cultivo criopreservado en glicerol (25%) de la colección del laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

2.1.2. *C. albicans*

2.1.2.1. La cepa de *C. albicans* fue obtenida de un urocultivo donado por la clínica del IMSS Unidad de Medicina Familiar 120.

2.2. Siembra y conservación de *F. solani*

2.2.1. Se sembraron 50 µL del cultivo criopreservado en cajas Petri que contenían 25mL de medio PDA; se incubaron durante 15 días a 32 °C.

2.2.2. Transcurrido el tiempo de crecimiento se realizó una suspensión de esporas con ayuda de perlas de vidrio estériles y solución salina (NaCl 0.9%) adicionada con Tween 80 (0.05%), esto con el fin de facilitar su obtención y cuantificación.

2.2.3. Para poder conservar el hongo se realizó un criocultivo, para esto se tomaron 900 µL de la suspensión de esporas, este volumen se depositó en un crio tubo que contenía 900 µL de glicerol (50%), el tubo fue conservado en ultracongelación a -70°C.

2.3. Siembra y conservación de *C. albicans*

2.3.1. El hongo fue sembrado por estría en una caja Petri que contenía 25mL de medio Sabouraud/agar a partir de una colonia aislada de un cultivo previo; se incubó durante 3 días a 32°C.

2.3.2. Transcurrido el tiempo de crecimiento se realizó una resiembra del hongo a partir de una colonia aislada en medio Sabouraud líquido para facilitar su cuantificación.

2.3.3. Para poder conservar el hongo se realizó un criocultivo, para esto se tomaron 900 µL del medio de cultivo líquido, este volumen se depositó en un crio tubo que contenía 900 µL de glicerol (50%), el tubo fue conservado en ultracongelación a -70°C.

2.4. Pruebas de sensibilidad de los hongos ante el noni

2.4.1. Cuantificación de esporas y células en cámara de Neubauer

2.4.1.1. La cuantificación se realizó a partir de la suspensión de esporas en el caso de *F. solani* y de las células presentes del medio líquido en el caso de *C. albicans*.

2.4.1.2. De cada microorganismo se realizó una dilución 1:1000 para que pudieran ser contados en la cámara de Neubauer

2.4.1.3. Una vez obtenido el promedio total del conteo de los cuatro cuadrantes (Figura 1) se aplicó la Fórmula 1 (Figura 2), con la que se calcula el número de esporas o células presentes en un mililitro de la suspensión analizada.

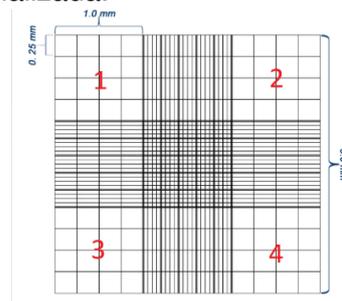


Figura 1 Cuadrantes contados de la cámara de Neubauer.

$$\#cel mL = \frac{\text{Promedio total contado} * \text{Factor de conversión de volumen}}{\text{Áreas contadas} * \text{Factor de dilución}}$$

Figura 2 Cálculo del número de células por mililitro en cámara de Neubauer, donde el factor de conversión de volumen fue de µL a mL (10,000), las áreas contadas fueron 4 y el factor de dilución fue 1:1000 (1x10⁻³)

2.5. Siembra de los hongos por vertido en caja

2.5.1. Medios de cultivo

2.5.1.1. Los hongos fueron sembrados en medio de cultivos diferentes, para *F. solani* se utilizó el medio PDA, mientras que *C. albicans* el medio fue Sabouraud. Ambos medios de cultivo eran de la marca Bioxon

2.5.1.2. Ambos medios de cultivo fueron modificados en su preparación para que contuvieran la mitad de concentración de nutrientes, esto con el fin de limitar el crecimiento microbiano

2.5.2. Siembra de los hongos

2.5.2.1. Una vez cuantificados ambos microorganismos se procedió a ajustar el volumen de trabajo a una concentración de 8×10^6 células por mililitro para que siempre se encontrara la misma cantidad de células en el medio, esto realizó a través de un ajuste matemático y una dilución con el medio de cultivo.

2.5.2.2. Se tomaron las alícuotas correspondientes de ambos microorganismos y fueron depositadas en el medio aun líquido correspondiente para cada hongo, a una temperatura aproximada de 35°C , se homogenizó la alícuota en medio agitándola vigorosamente.

2.5.2.3. Una vez realizado este procedimiento para ambos microorganismos se continuó con el vaciado en las cajas de Petri, procurando que cada caja contuviera 25 mL del medio con inóculo y se esperó a que el medio se solidificara para continuar.

2.6. Modificación del método de Kirby-Bauer

2.6.1. El Método de Kirby-Bauer consiste en inocular el microorganismo en la superficie de una placa de agar, en esta placa se colocan discos impregnados con una concentración conocida de un antimicrobiano y se incuban por un periodo de 16 a 18 horas a una temperatura de 35 a 37°C . Durante el tiempo de incubación el antimicrobiano se difunde en el agar lo que provoca la inhibición del crecimiento del microbiano por lo que se forman halos de inhibición, los cuales son medidos y pueden otorgarle diferentes categorías al microorganismo como son sensible, intermedio o resistente. El fin de usar este tipo de métodos es poder ayudar al profesional de la salud a poder brindar un mejor tratamiento además de conocer la susceptibilidad que tienen ciertos microorganismos ante un antimicrobiano específico (Pedrique de Alucio, 2002).

2.6.2. El método de Kirby-Bauer se realiza con discos de papel filtro impregnados con algún antibiótico, sin embargo, en esta metodología se hicieron modificaciones importantes pues en este caso se realizaron pozos directamente en el medio de cultivo para asegurar que todos tuvieran la misma cantidad de muestra de jugo de noni, exudado, recuperado acuoso o extracto acetónico.

2.6.3. Con ayuda de puntas amarillas estériles se hicieron los pozos con el extremo más ancho, con cuidado de no tocar nada que se encuentre fuera del área estéril de la campana.

2.6.4. Con ayuda de palillos de madera estériles se extrajeron los pequeños trozos de agar que pudieron quedar dentro de los pozos.

2.6.5. Posteriormente los pozos fueron rellenados con agar/agua estéril (1.5%) para tapar posibles rupturas que se generaran en los procesos anteriores y además asegurar que las muestras de jugo de noni, exudado, recuperado acuoso o extracto acetónico no se escaparan al fondo de las cajas.

2.6.6. Los pozos fueron rellenados con $100 \mu\text{L}$ de muestra (jugo, exudado, recuperado acuoso o extracto acetónico).

2.6.7. Las cajas con pozos fueron selladas e incubadas a 32°C para posteriormente observar el efecto inhibitorio de las diferentes fuentes de noni sobre los microorganismos.

2.7. Medición de los halos de inhibición

2.7.1. Las mediciones de los halos se realizaron 20 horas después de haber depositado las muestras (jugo, exudado, recuperado acuoso o extracto acetónico) en los pozos de las cajas con inóculo; estas fueron hechas con ayuda de una regla y marcadores. Se tomaron las medidas del diámetro tanto del pozo como del halo de inhibición y se calculó el porcentaje de inhibición con la Fórmula 2.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{diámetro del halo} - \text{diámetro del pozo}}{\text{diámetro del halo}} * 100$$

Figura 3 Cálculo del porcentaje de inhibición de los microorganismos con los diferentes tratamientos de noni

Resultados

Determinación de pH

Los resultados de la determinación de pH (tabla 1) nos muestra que no hay una gran variación de entre las muestras del exudado, recuperado acuoso y extracto acetónico, pero, si existe una variación entre estos y la muestra de jugo de noni, sin embargo, todos muestran un carácter ácido.

Tabla 1 determinaciones de pH

Muestra	pH
Jugo de noni	4.06
Exudado	3.74
Recuperado acuoso	3.76
Extracto acetónico	3.6

Determinación de proteínas

En la cuantificación de proteínas se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 2, donde se pudo observar que la muestra con mayor cantidad de proteínas es el exudado concentrado, con una concentración de 11.85 mg/mL.

Tabla 2 Concentración de proteínas por un mililitro de muestra

Muestra	Absorbancia (750 nm)	Concentración de proteína (mg/mL)
Jugo de noni	0.54	5.94
Exudado	0.726	6.63
Recuperado acuoso	0.478	1.66
Exudado concentrado	0.385	11.85
Exudado filtrado	0.526	3.83
Recuperado acuoso concentrado	0.124	1.36
Recuperado acuoso filtrado	0.120	1.11
Extracto acetónico concentrado	0.711	6.54

$$Y = 0.0073x + 0.0381$$

Figura 4 Ecuación de regresión de la curva patrón del ensayo de Lowry

Electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras de exudado y exudado concentrado

En la corrida del gel de poliacrilamida se puede observar la presencia de bandas de proteínas bien definidas en las muestras del exudado (carril 3) y del exudado concentrado (carriles 4 y 5) (figura 5). Se observa que estas bandas tienen diferentes pesos resaltando las bandas de aproximadamente 15, 25 y 50 kDA presentes en todas estas muestras.

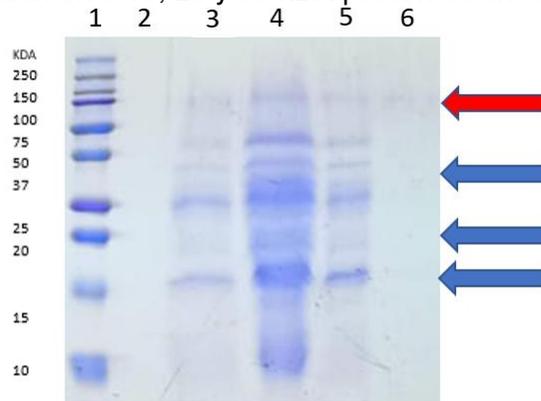


Figura 5 Gel de poliacrilamida cargado en el siguiente orden: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 6 buffer de corrida, carril 3 exudado y carriles 4 y 5 exudado concentrado

Cuantificación de azúcares reductores

Los resultados de la cuantificación de azúcares se muestran en la tabla 3, en esta se puede observar que la muestra con mayor cantidad de azúcares reductores es la del exudado con una concentración de 43.86 mg/mL.

Tabla 3 Concentración de azúcares reductores por un mililitro de muestra

Muestra	Absorbancia (540 nm)	Concentración de azúcares (mg/mL)
Jugo de noni	0.4622	11.16
Exudado	0.3884	43.86
Recuperado acuoso	0.5244	8.91
Exudado concentrado	0.3018	31.99
Exudado filtrado	0.3509	38.29
Recuperado acuoso concentrado	0.4798	13.66
Recuperado acuoso filtrado	0.4829	12.91
Extracto acetónico concentrado	0.3822	42.17

$$Y = 0.001x + 0.047$$

Figura 6 Ecuación de la recta correspondiente a la curva patrón del ensayo de Miller

Pruebas de inhibición de crecimiento

Los resultados de las pruebas inhibitorias se pueden observar en las figuras 7 y 8. La figura 7 nos muestra los datos correspondientes para los diferentes tratamientos sobre *C. albicans*, mientras que la figura 8 muestra los tratamientos en *F. solani*.

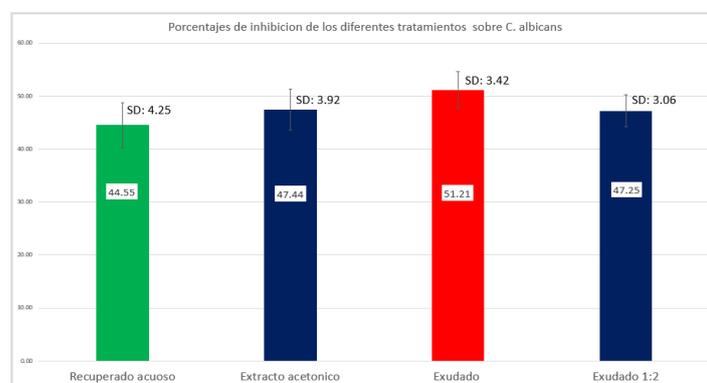


Figura 7 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre *C. albicans*

De acuerdo con los datos obtenidos de las pruebas inhibitorias contra *C. albicans* se observó que el tratamiento con exudado produjo el mayor porcentaje de inhibición alcanzando 51.21%. Posteriormente, a los datos se les realizó un ANOVA y un análisis *post hoc* de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, encontrando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Estas diferencias se pueden observar en la figura 7, donde los tratamientos con barras de distinto color presentan diferencias significativas. En color verde se encuentra el primer grupo conformado por el recuperado acuoso, el segundo grupo representado con el color azul se encuentran el extracto acetónico y exudado 1:2, y el último grupo representado con el color rojo conformado por el exudado.

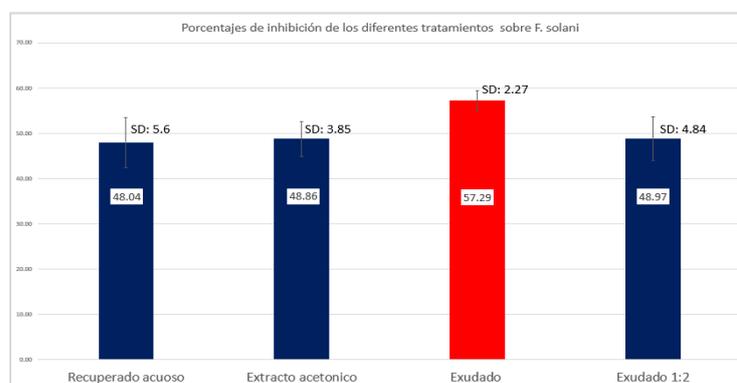


Figura 8 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre *F. solani*

Los resultados de las pruebas inhibitorias contra *F. solani* nos revelan que el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición es de nueva cuenta el tratamiento de exudado con un 57.29 %, a estos datos inhibitorios se les realizó de igual manera un análisis estadístico de ANOVA y seguido de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Este análisis reveló que existen diferencias estadísticamente significativas únicamente en 2 grupos, el primer grupo representado por el color rojo conformado únicamente por la

muestra de exudado, mientras que el segundo grupo es representado por el color azul y está conformado por las muestras de recuperado acuoso, extracto acetónico y exudado 1:2

Las figuras 9, 10 y 11 muestran los controles negativos y halos de inhibición obtenidos en los diferentes tratamientos.

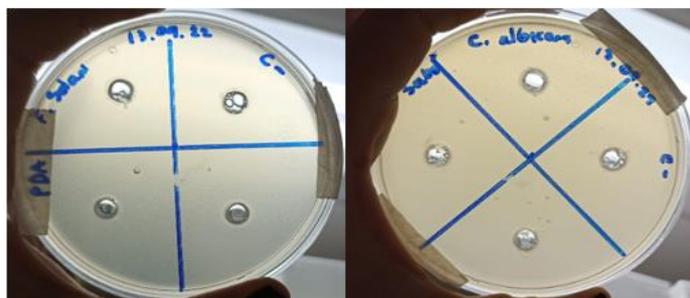


Figura 9 Controles negativos de ambos microorganismos



Figura 10 Tratamientos contra *F. solani*, en orden: recuperado acuoso, extracto acetónico, exudado y exudado 1:2



Figura 11 Tratamientos contra *C. albicans*, en orden: recuperado acuoso, extracto acetónico, exudado y exudado 1:2

Discusión

Los análisis de pH realizados al jugo y las demás muestras del noni nos muestran que éste tiene un carácter ácido, con un pH que va de entre 3.6 a las 4 unidades, estos resultados son parecidos a los reportados por Nascimento *et al.* (2018) quienes realizaron una caracterización del fruto, reportando un pH para la fruta de 3.95 ± 0.07 . Dentro de la investigación de Nascimento *et al.* (2018) también se analizó la cantidad de proteínas y de azúcares presentes en 100 g de fruto; sus resultados arrojan que, para las proteínas, se obtuvieron 42 mg/mL y para los azúcares, 26.8 mg/mL. Estos resultados difieren a los obtenidos en esta investigación, pues la concentración de proteínas más alta fue encontrada dentro de todas las muestras fue en el exudado concentrado, con un valor de 11.85 mg/mL; en cuanto a los azúcares reductores, fue la muestra de exudado la que tuvo

la concentración más alta, con un valor de 43.86 mg/mL. Esto puede deberse a varios factores dentro de los que podemos destacar la temporada del año o el estado de maduración en el que se encontraba el fruto al momento de realizarse los análisis, pues en el estudio de Pérez Lopez *et. Al.* (2020) se encontró sí afecta a la cantidad de metabolitos, azúcares y proteínas que contiene el fruto dadas sus condiciones de cosecha.

El uso del noni como tratamiento preventivo o complementario contra infecciones provocadas por *C. albicans* podría ser una opción viable, en específico el tratamiento de exudado pues este resultó ser estadísticamente diferente a los demás tratamientos, logrando obtener un 57.29% de inhibición. Estos resultados están de acuerdo con el estudio realizado por Jainkittivon *et al.*(2009) en el que se utilizó un extracto liofilizado de noni y, en condiciones *in vitro*, aplicar extracto de noni a una concentración de 40 mg/mL sobre cultivos de *C. albicans*, durante 45 minutos exhibe actividad antifúngica buena; también muestra que a mayor concentración del extracto y mayor tiempo de aplicación este aumenta su inhibición, por lo que el extracto a esa concentración (40 mg/mL) podría tener aplicaciones clínicas.

En la investigación de Jayaraman *et al.* (2008) se utilizaron extractos de metanol, acetato de etilo y hexano contra diversos hongos, dentro de los que podemos resaltar a *Fusarium sp* y *C. albicans*, los que se obtuvieron resultados interesantes. En el caso de *C. albicans*, con el extracto de metanol se obtuvo únicamente el 8% de inhibición y los demás extractos no tuvieron efectividad contra el hongo, esto resultó contrario a los resultados en esta investigación, pues el extracto acetónico empleado obtuvo el 47.44% de inhibición. Esto podría estar relacionado con 2 posibles causas: la primera es la polaridad de los disolventes usados, pues el metanol es más polar que los otros disolventes y podría disolver tanto componentes polares como no polares presentes en el noni, y la segunda causa podría ser la concentración en la que fue utilizado el noni la cual fue únicamente de 1 mg/mL. Para las pruebas contra *Fusarium sp* se encontró una inhibición de casi el 50% con el extracto de metanol, mientras el extracto de acetato de etilo obtuvo un 34.2% de inhibición y el extracto de hexano no tuvo efectividad contra el hongo.

En adición a los datos obtenidos de los tratamientos aplicados sobre *Fusarium sp* está el estudio realizado por Reyes Castro (2014) en el cual se probaron los extractos de diferentes plantas (dentro de ellas el noni) a distintas concentraciones (25, 50 y 75%) en diferentes hongos (dentro de ellos *Fusarium sp*) aislados de la semilla de caoba hondureña. Los resultados arrojados de esta investigación nos dicen que el noni en concentraciones del 75% fueron más eficaces al inhibir el crecimiento de los hongos *Fusarium sp*, *L. theobromae* y *Curvularia spp.* Esta información nos abre el campo de la agricultura, pues el utilizar el noni como alternativa a pesticidas industriales es una opción que se puede explorar en este campo, sobre todo en cultivos y semillas susceptibles a la infección por hongos.

Conclusiones

Con la caracterización parcial del noni fue posible determinar propiedades como el pH, la cantidad total de proteínas y azúcares reductores, siendo la muestra de Exudado la que contaba con mayor cantidad de proteínas y azúcares reductores de entre todas las demás muestras, esto está altamente relacionado con la actividad antifúngica que presentó, sin embargo, la caracterización específica de proteínas y azúcares reductores no pudo llevarse

a cabo, lo que abre un campo de estudio para su identificación y su posible mecanismo de acción.

El extracto acetónico pudo ser obtenido y probado de manera exitosa frente a ambos hongos, sin embargo, el extracto acuoso no pudo ser obtenido pues los componentes de interés (fase orgánica) se evaporaron en el proceso de obtención.

Se logró evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de distintos extractos del jugo de noni, siendo el tratamiento de Exudado el que demostró una mayor actividad ante ambos hongos. De igual forma, en la evaluación de los otros tratamientos, el Exudado a la mitad de la concentración (exudado 1:2 con agua) mostró actividad antifúngica al nivel del recuperado acuoso y el extracto acetónico.

Bibliografía

- Almeida, É. S., de Oliveira, D., & Hotza, D. (2018). Properties and Applications of *Morinda citrifolia* (Noni): A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 883-909. Obtenido de <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1541-4337.12456>
- Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Hernández Motzezak, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *MULTICIENCIAS*, 129-135. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/904/90424216002.pdf>
- Ayala Huaman, R., Pecho Ramírez, K. M., & Ácaro Chuquicaña, F. E. (2018). *Library*. Obtenido de Efecto antifúngico in vitro del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* "noni" frente a *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*: <https://1library.co/document/qvv35dgq-antifungico-extracto-morinda-citrifolia-candida-albicans-saccharomyces-cerevisiae.html>
- Farine, J.-P., Legal, L., Moreteau, B., & Le Quere, J.-L. (1996). Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry*, 41(2), 433-488. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942295004556>
- Forero Reyes, C. M., Alvarado Fernández, A. M., Ceballos Rojas, A. M., González Carmona, L. C., Linares Linares, M. Y., Castañeda Salazar, R., . . . Rodríguez-Bocanegra, M. X. (2018). Evaluación de la capacidad patogénica de *Fusarium* spp. en modelos vegetal y murino. *Revista Argentina de Microbiología*, 90-96. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117300962>
- Garzón Guerrero, L. M., Ramírez Sandoval, D. A., & Sanabria Jiménez, A. D. (01 de noviembre de 2017). *ACADEMIA*. Obtenido de CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY: https://www.academia.edu/35000528/CUANTIFICACION_DE_PROTEINAS_POR_EL_METODO_DE_LOWRY_FACULTAD_DE_MEDIO_AMBIENTE_Y_RECURSOS_NATURALES_PROYECTO_CURRICULAR_DE_INGENIERIA_BIOQUIMICA
- González Lavaut, N. E., & González Lavaut, J. A. (septiembre de 2003). *SciELO*. Obtenido de *Morinda citrifolia* Linn.: potencialidades para su utilización en la salud humana: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300006
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 33-41. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010

- INSST. (23 de septiembre de 2012). *DataBlo*. Obtenido de Ficha de agentes biológicos *Candida albicans* : <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Candida+albicans.pdf/807f3982-1e35-4c03-b626-a73873867028?version=1.0&t=1528734445955>
- Jainkittivong, A., Butsarakamruha, T., & Langlais, R. P. (2009). Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 394-398. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210409003473>
- Jayaraman, S. K., Manoharan, M. S., & Illanchezian, S. (2008). Antibacterial, Antifungal and Tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *International Journal of Integrative Biology*, 44-49. Obtenido de <http://www.classicus.com/IJIB/Arch/2008/1066.pdf>
- Moreano Pilatasig, M. M. (mayo de 2015). *REPOSITORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO*. Obtenido de INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE: "DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y SU RELACIÓN CON CARBOHIDRATOS NO ABSORBIDOS EN NIÑOS (A) DEL CENTRO DE EDUCACIÓN INICIAL "MARÍA MONTESSORI" DEL CANTÓN LATACUNGA EN EL PERÍODO 2014- 2015.": [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10569/1/TESIS%20MAYRA%20MOREANO%20\(1\).pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10569/1/TESIS%20MAYRA%20MOREANO%20(1).pdf)
- Morón Rodríguez, F. J., & Morón Pinedo, D. (Septiembre de 2004). *SciELO*. Obtenido de Mito y realidad de *Morinda citrifolia* L. (noni): http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000300002
- Nascimento, L. C., da Rodrigues, N. R., Alves, M. P., Sabaa Srur, A. U., Barbosa Junior, J. L., & Barbosa, M. I. (2018). Chemical characterization, nutritional aspects and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L) produced in northeastern Brazil. *International Food Research Journal*, 870-875. Obtenido de [http://www.ifrj.upm.edu.my/25%20\(02\)%202018/\(58\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/25%20(02)%202018/(58).pdf)
- Panizo, M. M., & Reviákina, V. (2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 38-45. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011
- Pedrique de Alucio, M. (febrero de 2002). *Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela*. Obtenido de DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBIOTICOS (ANTIBIOGRAMA) : http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
- Perez Lopez, M. L., Barraza Elenes, C., Camacho Hernandez, I. L., Gutiérrez Dorado, R., Perales Sánchez, J. X., & Carrillo Lopez, A. (2020). Cambios de la composición química durante la maduración poscosecha del fruto de Noni (*Morinda citrifolia* Linneo). *Investigacion y Desarrollo en Ciencia y Tecnologia de Alimentos*, 194-196. Obtenido de https://www.google.com.mx/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.fcb.uanl.mx/IDCyT_A/files/volume5/5/3/39.pdf&ved=2ahUKEwjy7--1ien6AhUSj2oFHUQQDpQQFnoECAsQBg&usq=AOvVaw3raAaNI4c4VNO9GRlfpBqK
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 346-356. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269777900434>
- Reyes Castro, B. (2014). Acción antifúngica in vitro de extractos vegetales para el control de patógenos de semillas de *Switenia macrophylla* King (caoba hondureña). *Revista*

Protección Vegetal, 155. Obtenido de
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000200017

Secretaría de agricultura y desarrollo rural. (2020). *DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL*. Obtenido de FICHA TÉCNICA *Fusarium spp*:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp_ma_z_2020.pdf

Vo. Bo. del informe final de servicio social titulado "Valoración de los efectos antifúngicos del jugo de noni (*Morinda citrifolia*)"


Dr. Hugo César Ramírez Saad
Profesor Titular C
Número económico 8642


Dra. María Eugenia de la Torre Hernández
Catedrática Conacyt
Número identificador: 900031