

Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales

Preliminary identification of secondary metabolites from aqueous and ethanolic extracts of the fruit and leaves of Morinda citrifolia L. "noni" and spectrophotometric quantification of total flavonoids

RUIZ REYES, Segundo Guillermo¹; VENEGAS CASANOVA Edmundo Arturo²; CHÁVEZ GAONA María Haydée³; EUSTAQUIO SALDARRIAGA Carol Lisset⁴

No fueron encontrados conflictos de interés en este artículo.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación estuvo orientado a la identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y a la cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. La especie fue recolectada en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales "Rosa Elena de los Ríos Martínez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Los metabolitos secundarios encontrados en la identificación preliminar fueron: esteroides, quinonas, flavonoides y leucoantocianidinas. En la cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales expresados como quercetina, se encontró que el extracto con mayor porcentaje correspondió a la extracción a reflujo de hoja con 0.191%, seguido de los liofilizados de los extractos acuoso y etanólico de hoja con 0.114 y 0.115% respectivamente, la extracción Soxhlet de hoja con 0.007% y el liofilizado del extracto acuoso de fruto con 0.032%. Los resultados obtenidos de los extractos fueron evaluados mediante el Análisis de Varianza y Prueba de Duncan.

Palabras clave: identificación preliminar, extractos, *Morinda citrifolia* L., flavonoides, cuantificación, espectrofotometría.

ABSTRACT

This investigation was aimed at the preliminary identification of secondary metabolites from aqueous and ethanolic extracts of the fruit and leaves of *Morinda citrifolia* L. "noni" and spectrophotometric quantification of total flavonoids. The species was collected in the Botanical Garden of Medicinal Plants "Rosa Elena de los Ríos Martínez" at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, National University of Trujillo. The secondary metabolites found in the preliminary identification were: steroids, quinones, flavonoids, and leucoanthocyanidins. In the spectrophotometric quantification of total flavonoids expressed as quercetin, found that the extract with the highest percentage corresponded to reflux extraction leaf with 0.191%, followed by the lyophilized aqueous and ethanol extracts of leaf with 0.114 and 0.115% respectively, Soxhlet extraction of leaf with 0.007% and aqueous extract of freeze dried fruit with 0.032%. The results of the extracts were evaluated by Variance Analysis and Duncan test.

Key words: preliminary identification, extracts, *Morinda citrifolia* L., flavonoides, quantification, spectrophotometry.

¹Dr. Químico Farmacéutico. Docente. UNT. guille_ruiz2001@hotmail.com

²Mg. Químico Farmacéutico. UNT. edmund373@hotmail.com

³Br. Universidad Nacional de Trujillo. lue_soul87@hotmail.com

⁴Br. Universidad Nacional de Trujillo. carol27_cles@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal que están por descubrir, y gran número de plantas son ensayadas constantemente respecto a su posible valor farmacológico. En las civilizaciones primitivas, la población estaba interesada principalmente en las virtudes curativas de las plantas.^{1,2}

Aún en muchos lugares del mundo la medicina tradicional sigue haciendo contribuciones en la práctica de la medicina actual con excelentes resultados. Es frecuente el uso de las plantas o de sus principios activos en la terapéutica. La identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por el uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica.³

La investigación en el campo de la Fitoterapia y la Medicina Tradicional son temáticas importantes en el Perú, país de inmensa riqueza en plantas medicinales, tanto domesticadas como silvestres con potencial farmacológico. Hay muchas otras especies de plantas domésticas que aún no han salido de la región y que pueden tener un potencial fitoterapéutico a futuro.^{4,5}

En diferentes partes del mundo existen datos sobre el uso de plantas con fines medicinales. Se conoce que las especies oriundas de la Polinesia son unas de las más utilizadas. Dentro de este arsenal fitoterapéutico, se destaca la *Morinda citrifolia* L., planta que se ha incluido dentro de las principales especies medicinales más utilizadas en medicina complementaria, junto a *Aloe vera*, *Allium sativum*, entre otras.^{6,7}

Morinda citrifolia L., "noni" es una planta perteneciente a la Clase Dicotiledóneas, Orden Gentianales, familia Rubiáceas y género *Morinda*. Es un árbol pequeño caracterizado por presentar una altura de hasta 8 metros; hojas oblongo aovadas, grandes y de color verde oscuro con nervaduras gruesas, su superficie es cerosa que la protege del sol y los vientos salados oceánicos, supera a menudo los 30 cm de largo, con ápice agudo y redondeadas en la base; flores blancas fragantes, dispuestas en cabezuelas globosas u ovals; corola tubular de aproximadamente 10 mm; fruto fétido en sincarpio blanco-cremoso, de forma oval, de 5 a 7 cm de longitud. El noni es nativo de Asia, islas del Océano Pacífico y Australia. Ha sido naturalizado y cultivado en América tropical. Al no ser una especie muy resistente, se llevan a cabo cultivos especiales requiriendo para ello suelos arenosos, bien drenados y soleados.^{7,8,9}

El "noni" tiene una larga historia, los "curanderos" polinesios empleaban todas las partes de la planta para tratar problemas de salud que iban desde aftas hasta reumatismo. Los parásitos intestinales, fiebres e infecciones de la piel eran algunas de las enfermedades más comunes tratadas con esta panacea polinesica.^{10,11}

Las partes más conocidas y consumidas del "noni"

son sus hojas y sus frutos. Empíricamente, las hojas se aplican sobre la piel, después de ablandarlas en una llama, para tratar tumores o infecciones. En la actualidad, las hojas de "noni" son incorporadas cada vez más en la industria de productos naturales en sustitución a sus preparaciones empíricas. En diversos estudios, se ha demostrado que las hojas poseen propiedades antiinflamatorias, astringentes, antisépticas, hipoglucemiantes y anticancerígenas.⁹

El fruto maduro de "noni" se encuentra todo el año. Ha sido utilizado durante siglos como una fuente de alimento, a pesar de presentar un sabor y olor desagradables. El uso tradicional del "noni", es en forma de jugo del fruto. En los últimos años muchos estudios científicos se encuentran en ejecución con vistas a demostrar que el jugo del fruto contiene atributos de tipo antiinflamatorios, analgésicos, hipotensivos y anticancerígenos.^{12,13,14}

Según Jorge Alonso, ha reportado que entre los constituyentes de la hoja de "noni" se encuentran: monoterpenos, triterpeno, benzenoide, β -sitosterol, iridoides y flavonoides; en la raíz: morindina, alizarina, rubiadina, ácido rubiclórico, antraquinonas y selenio; en las flores: antraquinonas y flavonoides y en el fruto: pequeñas cantidades de aceite esencial, iridoide (ácido asperulosídico) y flavonoide (rutina).⁷

Entre estos componentes tenemos a los polifenoles, que son un conjunto heterogéneo de metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato, comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos).^{15,16}

Un estudio realizado en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Universidad San Martín de Porres, concluyó que entre los frutos promisorios estudiados poseen actividad antioxidante muy elevada el "camu-camu" y el "tumbo serrano"; elevada la "guinda", el "noni" y el "yacón"; moderada la "carambola", el "aguaymanto" y el "tomate de árbol" y baja el "tumbo costeño". Recomendándose el consumo de los frutos con mayor poder antioxidante, es decir que contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos, como el "camu-camu", el "noni" y el "yacón".¹⁶

Otro de los metabolitos secundarios más importantes, son los flavonoides, que son uno de los grupos más numerosos y ampliamente

distribuidos de constituyentes naturales. Se conoce como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbonos en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. estos flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos. Los flavonoides se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas.^{17,18}

La acción farmacológica es también extensa y variada, se ha demostrado que los flavonoides modifican la reacción del cuerpo a los elementos dañinos como alérgenos, virus y cancerinógenos; son bien conocidas sus actividades protectoras de la pared vascular o capilar (bioflavonoides del género Citrus: rutina y derivados) dilatadores de las coronarias (proantocianidinas), espasmolítica, antihepatotóxica, estrógena y diurética. Así mismo la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de la isoflavonas.^{17,18}

Los flavonoides juegan un rol protector en el desarrollo e inhibición de tumores. El mecanismo de protección antitumoral de flavonoides ocurre a diferentes niveles del proceso carcinogénico. Se han ensayado extractos del jugo del fruto de *Morinda citrifolia* L. como también algunos compuestos puros en una diversidad de modelos experimentales, tales como la línea celular de tumor ascítico Sarcoma 180 de ratón, transactivación y activación celular de células epidérmicas de ratón JB6, carcinoma de Lewis en pulmón de ratón y liberación de citocinas como el factor necrosante tumoral alfa, interleucinas (IL-10, IL-1 α , exceptuando IL-2) e interferón gamma. La fracción de extracción alcohólica, del jugo del fruto de "noni", es una de las que ha demostrado buena acción antitumoral, como así mismo los compuestos aislados ácido asperulosídico (iridide) y los glicósidos de ácidos grasos.¹⁹

Los flavonoides presentes en el jugo del fruto de *Morinda citrifolia* L., poseen gran capacidad para neutralizar radicales libres responsables de la aparición de determinadas patologías o del agravamiento de las mismas. En un estudio realizado en ratas a partir del jugo del fruto de *Morinda citrifolia* L., administrado por vía oral durante una semana de tratamiento, determinó un efecto preventivo sobre los primeros estadios de formación de células tumorales, lo cual se vincula al efecto antioxidante demostrado en el test de hidroperóxidos lipídicos.^{7,20}

En un estudio realizado en Estados Unidos de América, utilizando como muestra "noni" recolectados en Tahití, se lograron aislar dos nuevos lignanos, (+) -3,4,3', 4'-tetrahydroxi-9, 7'alpha-epoxyignano alfa-7, 9'-lactona y (+) -3,3'-bisdemethyltanegool, así como siete compuestos conocidos, (-)-pinoresinol, (-) -3,3'-bisdemethylpinoresinol, la quercetina, kaempferol, scopoletin, isoscopoletin, y vainillina.²¹

Un estudio informa que, en la hoja de "noni" se identificaron: cinco glucósidos flavonoles y un glucósido iridoide. Además, se determinó que todos estos compuestos tuvieron actividad secuestradora de radicales libres, efecto antioxidante in vitro, en concentraciones de 30 μ M.²¹

Los antecedentes expuestos estimulan el interés en realizar el estudio fitoquímico del fruto y la hoja de *Morinda citrifolia* L. ya que hace posible la identificación de algunos de los componentes químicos responsables de los efectos preventivos-terapéuticos y con ello una base científica para su uso apropiado; contribuyendo a un mejor conocimiento de nuestra medicina tradicional. Además, estas investigaciones pueden ser extendidas a estudios farmacológicos y también relacionados a ver la posibilidad de producción industrial en los casos en que los principios activos hallados lo justifiquen. Por otra parte, la investigación contribuye a contrastar los datos obtenidos en nuestro estudio, con los realizados en otras realidades.

Debido al interés actual de su uso dietético nos planteamos el siguiente objetivo: Identificar preliminarmente los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni". producidos en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales "Rosa Elena de los Ríos Martínez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

MATERIAL Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL: Los frutos y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" fueron recolectados en el mes de Octubre en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales "Rosa Elena de los Ríos Martínez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

PREPARACIÓN DE LAS DROGAS²⁷

Las drogas recolectadas de la planta se liberaron de la tierra adherida y se descartaron aquellos frutos y hojas que no poseían condiciones favorables para el estudio fitoquímico. Se procedió a la limpieza de las drogas hasta que estén totalmente libres de sustancias extrañas para su posterior tratamiento.

1. Preparación del fruto

La cantidad total de fruto recolectado fue dividida en dos partes: para la obtención del extracto crudo y la maceración.

Obtención del extracto crudo: Los frutos fueron cortados en rodajas delgadas, se eliminaron las semillas, se procedió a licuar y posteriormente el licuado se filtró al vacío. El extracto crudo obtenido se llevó a liofilización para su secado.

Maceración: Los frutos fueron trozados y colocados en un frasco ámbar de boca ancha, para luego ser cubiertos por alcohol etílico de 70° por un periodo de ocho días.

2. Preparación de las hojas

Secado en estufa: Las hojas se llevaron a estufa a una temperatura de 38°C hasta peso constante.

Trituración: Las hojas se redujeron de tamaño mediante trituración en un mortero de acero inoxidable.

Tamización: El material que se obtuvo de la trituración, se pasó por los tamices N° 2, 1.2, 0.7 y 0.3. La muestra de trabajo fue la correspondiente al tamiz N° 0.7.

Almacenamiento: La droga tamizada fue almacenada y protegida en un frasco ámbar de boca ancha.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y ETANÓLICOS DE LAS DROGAS^{24,27}

- Extracto acuoso: Se preparó por decocción, luego se llevó a liofilización para obtener el extracto seco.²⁷

- Extracto etanólico: Se preparó por extracción continua por Soxhlet, luego fue llevado a rotaevaporador para eliminar el alcohol y posteriormente, a liofilización para obtener el extracto seco.²⁷

Para el fruto, el procedimiento fue el siguiente:

- Extracto crudo: Se llevó a liofilización para obtener el extracto seco.

- Extracto etanólico: La preparación fue por maceración.²⁷

El proceso de liofilización se realizó en tres etapas:

- Precongelamiento, que preparó los extractos

para la sublimación.

- Secado primario, el hielo se sublimó.

- Secado secundario, en el cual la humedad residual ligada al material sólido fue extraída, dejando los extractos secos, que fueron conservados en bolsas de polietileno herméticas, para evitar su humectación.

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR^{22,23,24}

La identificación preliminar fue realizada para la hoja, extracto etanólico de fruto, liofilizados de los extractos acuosos de hoja y fruto y el extracto etanólico de hoja.

Los métodos que se usaron para realizar la identificación preliminar estuvieron basados en los modelos propuestos por Olga Lock y Migdalia Miranda.

Entre ellos tenemos:

Prueba de la gota: Basado en la separación por solventes de diferente polaridad y la identificación cualitativa preliminar con reactivos de coloración y precipitación.^{22, 23} (Ver Anexo 2)

Identificación preliminar según Migdalia Miranda: De acuerdo con este método, la muestra fue sometida a la acción extractiva de solventes de polaridad creciente: éter, etanol y agua, modificando el pH del medio con el fin de obtener los metabolitos secundarios de acuerdo a su solubilidad. Luego de separar las fracciones se realizó la identificación de los metabolitos secundarios haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación.²⁴ (Ver Anexo 3)

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONOIDES TOTALES^{25,26}

La extracción y cuantificación de flavonoides fueron realizadas, tanto para la droga tamizada de hoja, liofilizados de los extractos acuosos de hoja y fruto y del extracto etanólico de hoja.

1. Extracción de flavonoides²⁶

La extracción de los flavonoides totales a partir de la droga tamizada de hoja fue realizada mediante la extracción continua por Soxhlet. Las extracciones a partir de los liofilizados fueron realizadas mediante reflujo.

Extracción Soxhlet: En cada una de las 6 cápsulas de porcelana se colocaron 15 gramos de muestra, los cuales se humectaron con 30 mL de etanol al 50%V/V por 24 horas. Las muestras contenidas en los cartuchos se colocaron en las cámaras de extracción de los equipos.

Luego se adicionaron 90 mL de ácido sulfúrico al 10% P/V y 90 mL de etanol al 50%V/V en el balón de 250 mL del Soxhlet. El tiempo de extracción se contó a partir del momento en el cual la mezcla de solventes en el balón empezó a hervir.

Concluido el tiempo de extracción, cada una de las muestras se enfrió y se filtró con ayuda de vacío. El residuo se lavó con 135 mL de etanol al 50%V/V, se evaporó en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial, se enfrió sobre baño de hielo durante 30 minutos y luego se filtró lavando el precipitado formado con 4 porciones de 20 mL de agua destilada fría (10-15°C). Se eliminó el filtrado y los lavados, y los residuos tanto del filtro como del recipiente se disolvieron con 70 mL de etanol al 96%V/V, calentando previamente a temperatura de 50°C; la solución se pasó a una fiola de 100 mL y se aforó con etanol al 96%V/V. Posteriormente se leyeron las absorbancias a 258 nm en espectrofotómetro Genesys 10 UV Thermo Electron Corporation Serie No. 2G2H118002

Extracción a Reflujo: En cada de uno de los 6 balones de 500 mL se colocaron cantidades de los liofilizados equivalentes a 1.25 gramos de muestra, luego se adicionaron 50 mL de ácido sulfúrico al 10% P/V y 50 mL de etanol al 50%V/V a cada uno de ellos, tratando de homogenizar la muestra y los solventes. Los balones se colocaron durante 2 horas a reflujo.

Cada una de las muestras se enfrió y se filtró con ayuda de vacío. El residuo se lavó con 75 mL de etanol al 50%V/V, se evaporó en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial, se enfrió sobre baño de hielo durante 30 minutos y luego se filtró, lavando el precipitado formado con 4 porciones de 20 mL de agua destilada fría (10-15°C). Se eliminó el filtrado y los lavados, y los residuos tanto del filtro como del recipiente se disolvieron con 70 mL de etanol al 96%V/V, calentando previamente a temperatura de 50°C; la solución se pasó a una fiola de 100 mL y se

aforó con etanol al 96%V/V. Posteriormente se leyeron las absorbancias a 258 nm en espectrofotómetro Genesys 10 UV Thermo Electron Corporation Serie No. 2G2H118002

2. Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides^{25, 26}

Se utilizó el método espectrofotométrico para cuantificar flavonoides totales expresados como quercetina, descrito por Kostennikova Z., adaptado en la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Como patrón se empleó 0.04 gramos de quercetina, los cuales se disolvieron con etanol al 96%V/V hasta completar un volumen de 50 mL; de esta solución se tomó 1 mL, se colocó en una fiola de 100 mL y se aforó con etanol al 50%V/V. El blanco fue una solución de etanol al 50%V/V.

La expresión matemática empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$X = \frac{A_M \times P_p \times 5}{A_p} \times 100$$

Donde:

X: contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%)
 A_M : absorbancia de la solución muestra (nm)
 P_p : peso de la sustancia patrón (g)
 A_p : absorbancia de la solución patrón (nm)

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA²⁸

Para los resultados de la cuantificación de flavonoides se utilizó análisis de varianza considerando un diseño experimental completamente basal y asumiendo homogeneidad muestral entre los grupos.

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma_{\delta}^2}{\delta^2}$$

$n = 6$

95% confianza y 80% potencia de prueba. Como en ANOVA se demostró que hubo significancia estadística entre los grupos, se procedió a realizar la prueba de Duncan.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni", según marcha fitoquímica preliminar propuesta por Olga Lock (Prueba de la Gota) y tamizaje fitoquímico de

Migdalia Miranda, se presentan en las Tablas 1, 2 y 3.

Los resultados con respecto a la cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales se exponen en las Tablas 4, 5 y 6 y Gráfico 1.

Tabla 1: Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de la especie *Morinda citrifolia* L. "noni" en las hojas y liofilizados de sus extractos acuoso y etanólico, según Prueba de la Gota

Extracto	Ensayos	Metabolitos Secundarios	Hoja	Liofilizado de extracto acuoso de hoja	Liofilizado de extracto etanólico de hoja
Etéreo	Liebermann - Burchard Bornträger	Esteroides	-	+	+
		Quinonas libres	+	+	+
Metanólico	Liebermann-Burchard Shinoda Gelatina Dragendorff Mayer	Esteroides	-	+	+
		Flavonoides	+	+	+
		Taninos	-	-	-
		Alcaloides	-	-	-
		Alcaloides	-	-	-
Acuoso/Ácido	Dragendorff Mayer	Alcaloides	-	-	-
		Alcaloides	-	-	-
Acuoso	Shinoda Rosenheim Espuma Gelatina	Flavonoides	+	+	+
		Leucoantocianidina	+	-	-
		Saponinas	-	-	-
		Taninos	-	-	-

Leyenda: (+) Identificación Positiva
(-) Identificación Negativa

Tabla 2: Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de la especie *Morinda citrifolia* L. "noni" en liofilizado de extracto acuoso del fruto y en su extracto etanólico, según Prueba de la Gota

Extracto	Ensayos	Metabolitos Secundarios	Liofilizado de extracto acuoso de fruto	Extracto etanólico de fruto
Etéreo	Liebermann-Burchard Bornträger	Esteroides	+	+
		Quinonas libres	+	+
Metanólico	Liebermann-Burchard Shinoda Gelatina Dragendorff Mayer	Esteroides	+	+
		Flavonoides	-	-
		Taninos	-	-
		Alcaloides	-	-
		Alcaloides	-	-
Acuoso/Ácido	Dragendorff Mayer	Alcaloides	-	-
		Alcaloides	-	-
Acuoso	Shinoda Rosenheim Espuma Gelatina	Flavonoides	-	-
		Leucoantocianidina	-	-
		Saponinas	-	-
		Taninos	-	-

Leyenda: (+) Identificación Positiva
(-) Identificación Negativa

Tabla 3: Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de la especie *Morinda citrifolia* L. "noni" en las hojas, según tamizaje fitoquímico de Migadlia Miranda

Extracto	Ensayos	Metabolitos Secundarios	Hoja
Etéreo	Baljet	Lactonas y Cumarinas	-
	Dragendorff		-
	Mayer	Alcaloides	-
	Wagner		-
	Liebermann-Burchard	Triterpenos - Esteroides	-
	Catequinas		+
	Resinas		-
	Baljet	Lactonas	-
	Liebermann-Burchard	Triterpenos - Esteroides	-
Etanólico	Espuma	Saponinas	-
	Tridoruro Férrico	Fenoles y Taninos	-
	Bornträger	Quinonas	+
	Shinoda	Flavonoides	+
	Kedde	Cardenólidos	-
	Antocianidina		+
	Dragendorff		-
	Mayer	Alcaloides	-
	Wagner		-

Extracto	Ensayos	Metabolitos Secundarios	Hoja
Acuoso	Dragendorff		+
	Mayer		+
	Wagner	Alcaloides	+
	Tricloruro Férrico		-
	Shinoda	Taninos	+
	Espuma	Flavonoides	-
	Mucílagos	Saponinas	-
	Principios Amargos		-

Leyenda: (+) Identificación Positiva
 (-) Identificación Negativa

Tabla 4: Cuantificación promedio espectrofotométrica de los flavonoides totales de la especie *Morinda citrifolia* L. "noni" en hoja

Muestras	Absorbancia promedio de la solución muestra a 258nm	Contenido promedio de flavonoides totales expresados como quercetina (%)
Extracción a Reflujo de Hoja	1.4934	0.1909
Extracción Continua Soxhlet de Hoja	0.0546	0.0070

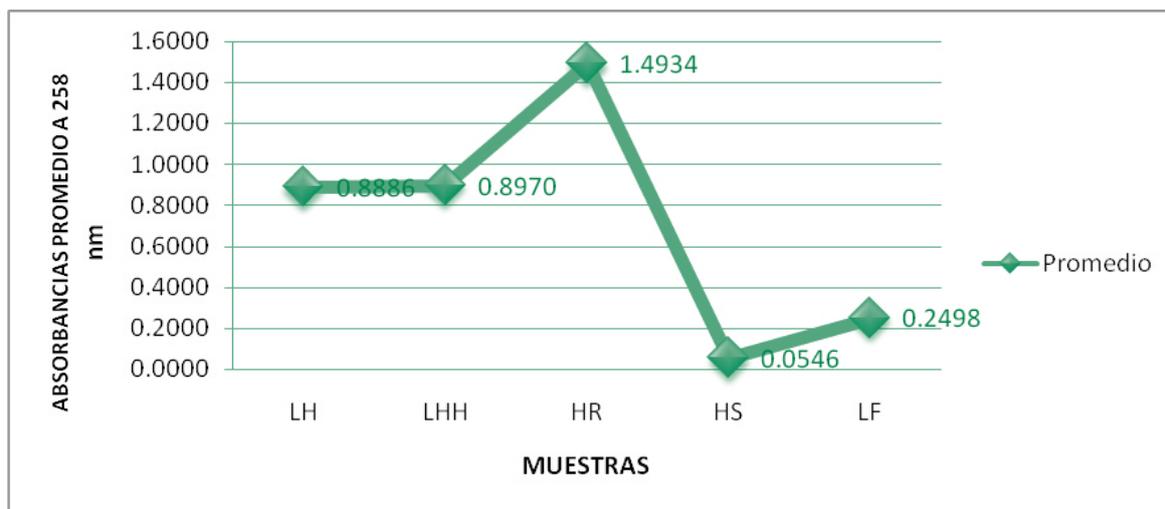
Tabla 5: Cuantificación promedio espectrofotométrica de los flavonoides totales de la especie *Morinda citrifolia* L. "noni" en liofilizados de los extractos acuoso y etanólico de hoja

Muestras	Absorbancia promedio de la solución muestra a 258nm	Contenido promedio de flavonoides totales expresados como quercetina (%)
Liofilizado de Extracto Acuoso de Hoja	0.8886	0.1136
Liofilizado de Extracto Etanólico de Hoja	0.8970	0.1147

Tabla 6: Cuantificación promedio espectrofotométrica de los flavonoides totales de la especie *Morinda citrifolia* L. "noni" en liofilizado de extracto acuoso de fruto

Muestras	Absorbancia promedio de la solución muestra a 258nm	Contenido promedio de flavonoides totales expresados como quercetina (%)
Liofilizado de Extracto Acuoso de Fruto	0.2498	0.0319

Gráfico 1: Análisis de Varianza para el promedio de absorbancias obtenidas de los diferentes extractos



LEYENDA

LH: Liofilizado de extracto acuoso de hoja
 LHH: Liofilizado de extracto etanólico de hoja
 HR: Extracción a Reflujo de hoja
 HS: Extracción continua Soxhlet de hoja
 LF: Liofilizado de extracto acuoso de fruto

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los objetivos fijados para la realización del presente trabajo de investigación, se procedió a la obtención de los extractos: etéreo, metanólico, acuoso-ácido y acuoso de las drogas, según Olga Lock (Prueba de la Gota). Para la hoja, se trabajó con la muestra tamizada y los liofilizados de sus extractos acuoso y etanólico; en el caso del fruto, con el extracto etanólico y el liofilizado de su extracto acuoso. Según el tamizaje fitoquímico de Migdalia Miranda, se realizaron los extractos: etéreo, etanólico y acuoso para la muestra tamizada de hoja. Para la identificación preliminar de los metabolitos secundarios se utilizaron solventes de polaridad creciente (éter, metanol, etanol, agua ácida y agua).^{22,23,24}

Como podemos apreciar en las Tablas 1, 2 y 3 dentro de los metabolitos secundarios encontrados en la identificación preliminar, discutimos la presencia de:

Los Esteroides considerados como derivados de los Triterpenoides, poseen un esqueleto tetracíclico característico, el cual fusiona tres anillos de seis miembros y uno de cinco miembros. Este núcleo de 17 átomos de carbono se denomina gonano (ciclopentano perhidro fenantreno). Este núcleo esteroide es alterado por transferencia de un átomo de oxígeno del carbono 12 al carbono 11 dentro de la molécula policíclica, para utilizarlo como intermediario de la producción de cortisona.^{2,18,27}

En la naturaleza, ningún esteroide posee el núcleo simple del gonano. El esteroide más simple que se conoce, presenta 18 átomos de carbono, que corresponde al núcleo de estrano, alrededor del cual se hayan las hormonas que caracterizan al sexo femenino.²⁷

La identificación de esteroides se realizó en los extractos etéreo y metanólico de la hoja y en los liofilizados de sus extractos acuoso y etanólico, según Olga Lock y en los extractos etéreo y etanólico, según Migdalia Miranda; siendo negativa en éstos, ya que fueron obtenidos por maceración en comparación con la extracción a reflujo realizada en la muestra tamizada según Prueba de la Gota; a esa porción posiblemente estos metabolitos existen, pero no hay la sensibilidad para desarrollo del color. Para los liofilizados de los extractos, la reacción fue positiva y ésta se puede deber a que existe una mayor cantidad de muestra. La reacción también fue positiva para el liofilizado de extracto acuoso de fruto y su extracto etanólico.

La reacción de Liebermann-Burchard es típica de los esteroides que contienen dos dobles enlaces conjugados, en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble en un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. La reacción debe

realizarse en medio absolutamente anhidro, ya que, al existir moléculas de agua, éstas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la reacción con el núcleo esteroideal o triterpenoide.²⁹

Los flavonoides son metabolitos secundarios de una gran distribución en el reino vegetal y pueden estar presentes en todas las partes de las plantas. En éstas se encuentran fundamentalmente en forma de glicósidos, esto les infiere una alta solubilidad en agua y disolventes polares, lo cual se incrementa por la alta polaridad de sus estructuras.²⁷

Los flavonoides han sido empleados para la reducción de la fragilidad capilar, protección frente a estados tóxicos agudos, en terapéutica estrogénica e inflamatoria por su acción similar a la cortisona. Además son usados como antioxidantes, antivirales, antidiarreicos, antihelmínticos y citostáticos.^{1,2,17,18}

La variación estructural de los flavonoides es inmensa, tanto por la naturaleza del azúcar como para la posición del enlace glicosídico.²⁷

Las estructuras de los diversos tipos de flavonoides, dependen de la naturaleza del oxígeno heterocíclico, pues este deriva del pirano, del pirilo, o de la -pirona. La ciclización se acomete entre el tercer carbono de la cadena y un grupo OH del anillo A en posición orto a esta cadena, lo cual conlleva a la formación de la estructura del cromeno o cromona.²⁷

La identificación de flavonoides fue positiva en los extractos metanólico y acuoso de la hoja y en los liofilizados de sus extractos acuoso y etanólico, según Olga Lock y en los extractos etanólico y acuoso, según Migdalia Miranda, dando una coloración roja. En el caso del fruto, la reacción se consideró como negativa, ya que el color final fue verde, ésta se puede deber a factores que influyen en la concentración de fitoconstituyentes de la planta como: época, clima, edad, suelo; aunque según bibliografía, algunas veces las coloraciones azul o verde son consideradas positivas.²⁹

En la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico concentrado, dando como productos al hidrógeno molecular, que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente, actúa sobre el grupo carbonilo de dos flavonas, produciendo una coloración roja, este aumento de intensidad es debido a que el magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado.²⁹

Las Quinonas comprenden un grupo de productos muy distribuidos en la naturaleza y de estructuras relacionadas, en la mayoría de los casos, con pigmentos naturales. Son más comunes en vegetales, aunque algunas estructuras se han obtenido de hongos, líquenes, insectos, o de animales marinos. Por lo general, en dependencia

del grado de conjugación de la estructura presentan colores tales como el amarillo, rojo o carmelita, aunque también algunos intermedios. Cuando las estructuras se presentan en formas de sales o con sustituciones hidroxílicas, los colores pueden ser púrpura, azul o verde.²⁷

Dentro de este grupo tenemos a las antraquinonas y naftoquinonas. Las antraquinonas se encuentran fundamentalmente en vegetales. Sus coloraciones varían del amarillo al rojo, siendo de las quinonas las más distribuidas en la naturaleza. Se presentan en forma de glicósidos, la unión de los azúcares por hidroxilos ocurren en las posiciones 1 ó 2 del núcleo base estructural. Las mejores fuentes de obtención de las naftoquinonas corresponden a los vegetales. Usualmente la pigmentación más común en ellas es la amarilla. El uso más generalizado es como pigmentos coloreados (lawsona). En la naturaleza no aparecen formando glicósidos.²⁷

La identificación de quinonas fue positiva, dando una coloración rojiza en la fase acuosa en el extracto etéreo de la hoja, en los liofilizados de sus extractos acuoso y etanólico y para el fruto, en el liofilizado de su extracto acuoso y extracto etanólico, lo que nos indica la presencia de antraquinonas y naftoquinonas, según Prueba de la Gota y en el extracto etanólico, según Migdalia Miranda.

La reacción de Bornträger, produce una coloración roja cuando el hidróxido de sodio reacciona con uno de los grupos hidroxilo, tanto de las antraquinonas como de las naftoquinonas ya que la coloración depende de la cantidad de electrones deslocalizados en movimiento.²⁹

Las antocianinas designan tanto a las antocianinas propiamente dichas como a las antocianidinas, es decir, tanto al glicósido como al aglicón.

El término leucoantocianina se refiere a sustancias capaces de convertirse en antocianinas por calentamiento con un ácido mineral; pueden ser monoméricas, como las leucoantocianinas, o también poliméricas, como en el caso de los taninos.²⁷

La identificación de leucoantocianidinas fue positiva en el extracto acuoso de droga tamizada según Prueba de la Gota, dando una coloración roja en la fase acuosa y en el extracto etanólico, según Migdalia Miranda la aparición de color rojo a marrón en la fase amíllica corresponde a la presencia de antocianidinas. A pH bajo, las antocianidinas en solución presentan un color rojo.

En la reacción de Rosenheim, el ácido clorhídrico produce una deshidratación del grupo hidroxilo de la posición 3 de la leucoantocianidina y catequina, que es favorecida por la temperatura (100°C), además se produce la ruptura del anillo heterocíclico. La deslocalización de $12 e^-$ y $2 e^-$ n, por todo el metabolito, produce la coloración roja de la leucoantocianidina y marrón de la catequina. El alcohol amílico, es el solvente que extrae la antocianidina y la catequina deshidratada observándose la coloración respectiva en dicha fase orgánica.²⁹

En el caso de extracción de alcaloides con soluciones acuosas es necesario un pH ácido, buscando con esto la conversión de los alcaloides en sus respectivas sales, solubles en agua. En el caso de los alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos se encontraron en el extracto acuoso de hoja, según Migdalia Miranda.²⁴

Dentro de las reacciones de identificación de alcaloides con reactivos generales, se encuentran las reacciones de precipitación. Éstas se basan en un intercambio, que normalmente el anión voluminoso del reactivo en acción reemplaza a los aniones pequeños de las sales de los alcaloides.²⁹

Luego de realizada la identificación preliminar de los metabolitos secundarios de *Morinda citrifolia* L. "noni", procedimos a la extracción y cuantificación de los flavonoides totales en hoja, liofilizados de sus extractos acuoso y etanólico y para el fruto, en liofilizado de su extracto acuoso.^{25,26}

Observando los resultados referente a las hojas de "noni" en las Tablas 4 y 5, la extracción que obtuvo mayor concentración fue el extracto obtenido mediante reflujo, con un promedio de 1.49, luego con promedios de 0.89 y 0.90, los liofilizados del decocto al 10% y extracto etanólico, respectivamente. Obteniéndose la menor concentración con la extracción obtenida utilizando el equipo Soxhlet (0.05).

Tenemos que mencionar que el promedio obtenido en los liofilizados fue casi similar, por lo tanto podemos deducir que, el uso adecuado puede ser tanto como un decocto o un extracto etanólico, que son las dos maneras utilizadas por la población empíricamente.^{9,19}

Según la literatura revisada, y además utilizando la lógica, la concentración más alta de flavonoides se debió presentar en la extracción continua por Soxhlet, debido a que este procedimiento permite que el solvente se encuentre en contacto permanente con la droga. Pero, para obtener resultados óptimos, necesitamos que no haya presencia de sesgos.²⁷

En el Gráfico 1, los resultados encontrados mediante el método estadístico de ANOVA, presentaron significancia estadística, es decir los tratamientos utilizados fueron diferentes significativamente ($P < 0.5$). Por lo cual, se procedió a analizar los datos mediante la Prueba de Duncan, con la cual podemos corroborar los resultados, obteniéndose para el extracto mediante reflujo, el promedio de 1.49, siendo seguido por las demás extracciones, como en el análisis ANOVA.

En el caso de la extracción realizada al fruto (Tabla 6), obtuvimos como promedio: 0.25, siendo mucho menor que el alcanzado con los extractos de hojas.

Encontramos un estudio del 2008 realizado en Malasia, en el cual se determinó in vitro la eficacia de extractos de hoja (MLE) y de frutas (MFE) de *Morinda citrifolia* L. en la inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL). El resultado del estudio demostró que la inhibición más alta en la actividad

de la LPL se exhibió en MLE (66% + / - 2,1%), que fue significativamente mayor que la mostrada con MFE (54,5% + / - 2,5%), extracto de té verde (GTE) (54,5% + / - 2,6%) y catequina (43,6% + / - 6,1%).³¹

Los glicósidos flavonoides se extraen de forma eficiente con alcoholes de baja masa molecular, en particular metanol y etanol, cuando el material es seco, ofrece ventajas emplear una serie de extracciones con tres o cuatro disolventes, incrementando la polaridad. Todos los flavonoides en etanol presentan una banda más o menos intensa a 200-270 nm, y otra de mayor intensidad a mayor longitud de onda, donde pueden observarse otras bandas de mayor intensidad.²⁷

En las frutas y hortalizas sin tratar, los flavonoles se presentan como glicósidos y está ausente la aglicona. El flavonol más abundante es la quercetina. Entre las hortalizas, la concentración más alta de quercetina glicósidos se encuentra en

cebollas (3 a 500 mg/kg), bretones (100 mg/kg), judías francesas (30 a 45 mg/kg) y brócolis (30 mg/kg). Entre las frutas examinadas según un estudio, la concentración de quercetina es en promedio de 15 mg/kg, teniendo las manzanas la concentración más elevada de 21 a 72 mg/kg. Los flavonol glicósidos están presentes en uvas y se han registrado valores que van desde 8 a 97 mg/kg de peso en fresco.³⁰

En las Tablas 4, 5 y 6 se observa que el contenido promedio de flavonoides totales expresados como quercetina alcanzan valores de: 1.9 g/kg y 70 mg/kg, para las extracciones a reflujo y Soxhlet, respectivamente, en los liofilizados de los extractos acuoso y etanólico de hoja 1.14 y 1.15 g/kg y en el fruto 319 mg/kg, lo que nos indica que *Morinda Citrifolia* L. contiene una alta concentración de flavonoides y comparando con las hortalizas y frutas antes mencionadas, se encontraría entre las más altas.

CONCLUSIONES

De los resultados encontrados en el presente estudio, se concluye que:

1. En la identificación preliminar de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni", se encontraron metabolitos secundarios como: esteroides, quinonas, flavonoides y leucoantocianidinas.
2. En la cuantificación espectrofotométrica de

los flavonoides totales expresados como quercetina, se determinó que el extracto con mayor porcentaje correspondió a la extracción a reflujo de hoja con 0.191%, seguido de los liofilizados de los extractos acuoso y etanólico de hoja con 0.114 y 0.115% respectivamente, la extracción Soxhlet de hoja con 0.007% y el liofilizado del extracto acuoso de fruto con 0.032%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trease W, Evans C. Farmacognosia. 13º ed. Ed. Mc Graw-Hill. México, 1991. pp. 3
2. Claus E, Tyler V. Farmacognosia. 6º ed. Ed. El Ateneo S.A. Argentina, 1968. pp. 1, 135
3. Pío Font Quer. Plantas medicinales. 10º ed. Ed. Labor S.A. España, 1962. pp. 595-596
4. Mendiola C. Biodiversidad y Desarrollo en el Perú. Ecología en el Perú [en línea] [15 de Abril del 2009] URL: www.peruecologico.com.pe Disponible en: www.peruecologico.com.pe/lib_c21_t09.htm
5. Carotenuto D. Rescatar el saber milenario de las culturas indígenas. San Marcos al día [en línea] 2004 [12 de Abril del 2009] URL: www.unmsm.edu.pe. Disponible en: www.unmsm.edu.pe/Noticias/julio/d21/veramp.php?val=1
6. Rodríguez M, Boffill M, Lorenzo G, Sánchez P. Evaluación Preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de *Morinda citrifolia* L. Rev Cubana Plant Med 2005; 10(3-4)
7. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Ed. CORPUS. Argentina, 2004. pp. 803-805
8. Mostacero J y otros. Taxonomía de Fanerógamas útiles del Perú. Ed. Normas Legales S.A.C. Volumen I. Trujillo-Perú, 2002. pp. 23, 27, 28
9. Salomón S, López O, García C. Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de hojas de *Morinda citrifolia* L. (noni). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2009; 14(2)
10. Dixon AR, McMillen H, Nina L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian Medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). Econ Botany. 1999; 53(1):51-68.
11. AGIS Phytochemical Database. US National Agricultural Library Phytochemical [serie en Internet]. [citado 5 abril 2009]. Disponible en: <http://www.probe.nalusda.gov.8300/cgi-bin/browse/phytochemicals>
12. Altonn H. Noni: Research will begin to test the plant against cancer and its symptoms. Star Bulletin [serie en Internet]. [citado 7 de abril 2009]. Disponible en: http://www.nonimaui.com/noni_news/SB-7-19-01.html
13. TenBruggencate J. Native plants can heal your wounds. Star Bulletin & Advertiser [serie en Internet]. [citado 5 abril 2009]. Disponible en: http://www.nonimaui.com/noni_news/heal-wounds.html
14. Hall S. Anti-cancer activity of *Morinda citrifolia* [serie en Internet]. [citado 5 abril 2009]. Disponible en: <http://www.tahitian-juice.com/public/studies.html>

15. Hernández M, Prieto E. Plantas que contienen Polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999;18(1):12-4
16. Muñoz A, Ramos-Escudero D, Alvarado-Ortiz C, Castañeda B. Evaluación de la Capacidad Antioxidante y Contenido de Compuestos Fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú*. 2007, 73, N° 3 (142-149)
17. Kuklinski C. Farmacognosia. Ed. Omega S.A. España, 2000. pp. 106-109
18. Lock de Ugaz O. Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. Pontificia Universidad Católica del Perú. [serie en Internet]. [citado 15 mayo 2009]. Disponible en: <http://www.maca-peruana.com/analisis.htm>
19. Bustamante S. Noni (*Morinda citrifolia*): ¿Dónde termina la ficción y comienza el conocimiento científico? Programa de Farmacología Molecular y Clínica – ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. [serie en Internet]. [citado 15 mayo 2009]. Disponible en: <http://www.sochifito.cl/files/publicacion/noni.pdf>
20. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Ed. Síntesis S.A. España, 1999. pp. 213-214
21. Sang S, Cheng X, Zhu N, Stark RE, Badmaev V, Ghai G, et al. Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(9):4478-81.
22. Lock de Ugaz O. Control de Calidad de Plantas Medicinales y de Fitofármacos: Métodos Químicos y Cromatográficos. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1998.
23. Boncun B, Zari G, Villalobos J, De los Ríos E, Ruiz S. Guía de Prácticas de Farmacognosia II. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Farmacotecnia. Trujillo-Perú, 2005. pp. 55-59
24. Miranda M, Cuéllar A. Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad Habana, 2000. pp. 41-52.
25. Gutiérrez Y, Miranda M, Varona N, Rodríguez A. Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Rev Cubana Farm* 2000; 34(1):50-5
26. Ruiz S. Determinación de la técnica de extracción de flavonoides totales de las hojas de *Mangifera indica* L. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, 2008.
27. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y Productos Naturales. Ed. Félix Varela. Ciudad de La Habana, 2001. pp. 159-161, 168-171, 242-243, 261-265, 273-274, 278-283.
28. Montgomery D, Peck E, Vining G. Introducción al Análisis de Regresión Lineal. 3º ed. Ed. Compañía Editorial Continental. México. 2005. pp. 27-28.
29. Ganoza M. Fundamentación Química de las Reacciones de Coloración y Precipitación en la Identificación de Metabolitos Secundarios de Plantas Medicinales. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2001. pp. 14,20-24,27,41-42,45,48-49.
30. Oficina Española de Patentes y Marcas. Mejoras en o relacionadas con la solubilización de flavonoles [serie en Internet]. [citado 15 febrero 2010]. Disponible en: www.espatentes.com/pdf/2230267_t3.pdf
31. Pak-Dek MS, Abdul-Hamid A, Osman A, Soh CS. Inhibitory effect of *Morinda citrifolia* L. On lipoprotein lipase activity. Dept. of Food Science, Faculty of Food Science and Technology, Univ. Putra Malaysia [serie en Internet]. [citado 15 febrero 2010]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?>

Recibido: 11 julio 2010 | Aceptado: 23 septiembre 2010