



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Caracterización fitoquímica y evaluación de la actividad  
antioxidante y antimicrobiana de productos derivados de  
la hoja de Noni (*Morinda citrifolia* L.)

## **TESIS**

Que presenta

**Q.F.B. CAROLINA ISABEL VÁZQUEZ HERRERA**

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR. ARMANDO CARRILLO LÓPEZ

DR. ELHADI M. YAHIA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en el Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la dirección del Dr. Armando Carrillo López y del Dr. Elhadi M. Yahia, así como la asesoría de la MC. Claudia Barraza Elenes, la Dra. Irma Leticia Camacho Hernández y el Dr. Héctor Samuel López Moreno. Contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y del Programa de Fortalecimiento y Apoyo a Proyectos de Investigación de la Universidad Autónoma de Sinaloa (PROFAPI-UAS, Proyecto PROFAPI-2014/061). Carolina Isabel Vázquez Herrera recibió beca del CONACYT.



## **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

### **CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de **Culiacán** el día **01** del mes **febrero** del año **2020**, el (la) que suscribe **QFB Carolina Isabel Vázquez Herrera** alumno (a) del Programa de la **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos** con número de cuenta **1530744-1**, de la Unidad Académica **Facultad de Ciencias Químico-Biológicas**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **doctor Armando Carrillo López** y del **doctor Elhadi M. Yahia**, y cede los derechos del trabajo titulado **“Caracterización fitoquímica y evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de productos derivados de la hoja de Noni (Morinda citrifolia L.)”**, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carolina", is written over a horizontal line.

**Carolina Isabel Vázquez Herrera**

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradezco a mis directores de tesis, el **Dr. Armado Carrillo** por su apoyo y confianza en el desarrollo de este proyecto y por siempre dedicar tiempo para asesorarme. Y al **Dr. Elhadi Yahia** por su apoyo, asesoría y hospitalidad al recibirme en su laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición en la Universidad Autónoma de Querétaro.

A las instituciones que hicieron posible este proyecto, la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y la **Universidad Autónoma de Querétaro**.

A mis asesores, la **M.C. Claudia Barraza** por haber tenido siempre la mejor disposición para apoyarme, acompañarme y orientarme, gracias infinitas. A la **Dra. Leticia Camacho** por su orientación y atención para resolver dudas y por su enorme apoyo en el desarrollo experimental. Al **Dr. Samuel López Moreno** por la confianza, asesoría y apoyo en su laboratorio.

Al profesor **Q.F.B. Israel Partida López** por sus atenciones y apoyo técnico.

A mis compañeros de generación, **Yesenia, Jordi, Cynthia, Fernanda, Yazmín, Carlos, Julio, Demis, Martín, Maribel, Alette, Yudith, Samuel** y **Santos**, por hacer tan amenos estos años de formación académica, profesional y sobre todo, personal. Gracias a todos.

A mis compañeros de laboratorio en Querétaro, el **Dr. Braulio Cervantes, Alex, Rebeca, Alexis, Miguel** y **Omar**, su apoyo y compañerismo hicieron de mi estancia en Querétaro una experiencia inolvidable.

A la **M.C. Alma Astorga**, cuyo apoyo y disposición fue invaluable en el trabajo experimental de microbiología. Gracias.

**A todos y cada uno los profesores** de la **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, porque su experiencia y conocimientos son invaluable.

A **Harry** y a **mi familia**, que de no tenerlos siempre presentes, ningún esfuerzo valdría la pena.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
I. RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
II. INTRODUCCIÓN.....	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
A. FITOQUÍMICOS .....	7
1. Compuestos fenólicos .....	7
a. Flavonoides .....	8
b. Compuestos fenólicos no flavonoides.....	10
2. Clorofilas y carotenoides .....	10
3. Actividad biológica de los fitoquímicos.....	13
a. Actividad antioxidante .....	14
1) Ensayo de inhibición de radical DPPH .....	16
2) Ensayo de inhibición de radicales $\cdot\text{OH}$ en la degradación de 2-desoxi-D-ribose .....	17
3) Ensayo de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por cobre .....	19

4) Ensayo de la inhibición de hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano) .....	20
b. Actividad antimicrobiana.....	21
B. EL NONI ( <i>Morinda citrifolia</i> L.) .....	24
1. Descripción botánica, origen y distribución.....	24
2. Importancia económica .....	25
3. Productos derivados de noni.....	27
4. La hoja de noni.....	28
C. DECOCCIONES.....	32
D. SUBPRODUCTOS .....	35
IV. JUSTIFICACIÓN.....	37
V. HIPÓTESIS.....	38
VI. OBJETIVOS.....	39
A. OBJETIVO GENERAL .....	39
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
A. MATERIALES.....	40
1. Elaboración de las decocciones y obtención de los residuos de decocción de hoja de noni.....	40
B. MÉTODOS.....	41

1. Análisis fisicoquímicos.....	41
a. Humedad .....	41
b. Cenizas .....	42
c. Acidez titulable.....	43
d. pH .....	44
e. Sólidos solubles totales (°Brix).....	44
2. Caracterización fitoquímica .....	45
a. Compuestos fenólicos totales.....	45
1) Extracción de la muestra.....	45
2) Curva de calibración.....	46
3) Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales .....	46
b. Carotenoides totales y clorofilas totales.....	47
1) Extracción de la muestra.....	47
2) Curva de calibración de $\beta$ -caroteno .....	48
3) Cuantificación de carotenoides totales y clorofilas totales .....	48
c. Carotenoides individuales identificados y cuantificados por HPLC .....	49
1) Extracción de la muestra.....	49
2) Identificación y cuantificación de los carotenoides por HPLC .....	49
3. Evaluación de la capacidad antioxidante .....	50
a. Capacidad de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)...	50

1) Curva de calibración.....	50
2) Medición de la capacidad antioxidante .....	50
b. Capacidad de inhibición de radicales $\cdot\text{OH}$ en el ensayo de degradación de 2-deoxi-D-ribosa.....	51
1) Preparación de los extractos.....	51
2) Curva de calibración.....	52
3) Medición de la inhibición de degradación de 2-desoxi-D-ribosa .....	52
c. Capacidad de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por cobre.....	53
1) Obtención de las lipoproteínas de baja densidad .....	53
2) Curva de calibración.....	54
3) Medición de la capacidad de inhibición de oxidación de LDL .....	54
d. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano) (AAPH).....	55
1) Obtención de los eritrocitos.....	55
2) Medición de la capacidad de inhibición de hemólisis .....	55
4. Evaluación de la actividad antibacteriana .....	57
5. Análisis estadístico .....	58
VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
A. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS .....	59

1. Humedad y cenizas.....	59
2. Acidez titulable, pH y sólidos solubles totales .....	61
C. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA .....	63
1. Compuestos fenólicos totales .....	63
2. Clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> y totales .....	68
2. Carotenoides totales .....	71
3. Carotenoides individuales .....	74
D. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	83
1. Capacidad de inhibición del radical DPPH .....	83
2. Capacidad de inhibición de radicales OH en el ensayo de degradación de 2-desoxi-D-ribosa .....	87
3. Capacidad de inhibición de la oxidación de LDL inducida por cobre .....	90
4. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por AAPH .....	94
D. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	98
IX. CONCLUSIONES.....	101
X. BIBLIOGRAFÍA.....	103
ABREVIATURAS.....	125
ANEXOS.....	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Estructura básica de los flavonoides y algunas subclases de estos.	9
2	Estructuras de clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> , y algunos carotenoides representativos.	11
3	Características de la planta de <i>M. citrifolia</i> L., fruto y hoja.	26
4	Compuestos fenólicos totales de productos derivados de la hoja de noni.	65
5	El contenido de clorofilas en productos derivados de la hoja de noni.	69
6	Cromatogramas obtenidos por HPLC de productos derivados de la hoja de noni.	75
7	Capacidad de inhibición del radical DPPH de productos derivados de la hoja de noni.	84
8	Capacidad de inhibición de radicales OH <sup>•</sup> en el ensayo de degradación de 2-desoxi-D-ribosa de productos derivados de la hoja de noni.	88
9	Capacidad de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de productos derivados de la hoja de noni.	91

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Algunos de los compuestos identificados en la hoja de noni.	31
2	Contenido de humedad y cenizas de productos derivados de la hoja de noni.	60
3	Análisis fisicoquímico de productos derivados de la hoja de noni.	62
4	Carotenoides totales de productos derivados de hoja de noni.	72
5	Espectros de absorción de compuestos detectados e identificados en la hoja cruda de noni (HC) mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).	76
6	Contenido de $\beta$ -caroteno y luteína identificados por HPLC en productos derivados de la hoja de noni.	78
7	Cantidad del consumo diario recomendado de luteína y equivalentes de retinol en 10 gramos de muestra fresca de productos derivados de la hoja de noni.	82
8	Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria de productos derivados de hoja de noni.	95

## I. RESUMEN

La planta de *Morinda citrifolia* L. o noni, ha sido usada tradicionalmente para tratar algunas enfermedades, pero en los últimos años han surgido investigaciones sobre su composición y actividad biológica aumentando su valor comercial. Se ha encontrado que la hoja de noni tiene potencial para ser usada como fuente de compuestos fitoquímicos activos que ayuden en la prevención de algunas enfermedades. Se ha documentado el uso de hojas de noni en infusiones o decocciones, sin embargo este proceso podría dejar componentes residuales que podrían ser aprovechados. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de hoja de noni (HC), decocción y hoja residuo de la decocción. Se realizaron decocciones de 5 y 10 minutos (D-5 y D-10, respectivamente) y se obtuvieron las hojas residuo de cada una (R-5 y R-10, respectivamente). Para HC, R-5 y R-10 se obtuvieron extractos metanólicos (EMeOH), lipofílicos (ELF), hidrofílicos (EHF) y con metanol:hexano:acetona (EMHA). Se determinaron características fisicoquímicas (% Humedad, % Cenizas, pH, % AT y SST) y se determinó el contenido de compuestos fenólicos (CFT), clorofilas (ClfT) y carotenoides totales (CT) mediante técnicas espectrofotométricas en diferentes extractos, complementariamente se identificaron y cuantificaron carotenoides usando cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Se evaluó la capacidad antioxidante por las técnicas de inhibición del radical DPPH, ensayo de degradación de 2-desoxi-D-ribosa, inhibición de la oxidación de LDL e inhibición de la hemólisis eritrocitaria por espectrofotometría. La actividad antimicrobiana se evaluó con las bacterias *Salmonella* Typhimurium y *Listeria*

*monocytogenes* por el método de difusión en disco. Los resultados de % AT fueron: HC > R-5 > R-10 > D-10 > D-5, pH: R-10 > D-5 > R-5 > D-10 > HC y °Brix: HC > R-5 > R-10 > D-10 > D-5. Las cuentas de CFT (mgEAG/g bs) fueron mayores en HC que en R-5 y R-10; además, D-10 fue mayor que D-5. El contenido de ClFT fue menor en R-5 y R-10 con respecto a HC y no se detectó clorofila en D-5 y D-10. Se obtuvo un alto contenido de CT en HC, y éste fue mayor en R-5 y R-10, pero no se detectaron en las decocciones. Se identificó mediante HPLC que los carotenoides mayoritarios presentes fueron  $\beta$ -caroteno y luteína, tanto en HC, como en R-5 y R-10. La capacidad antioxidante varió entre las técnicas empleadas. El ensayo de DPPH ( $\mu\text{molET/g bs}$ ) siguió la tendencia de la cantidad de CFT. Para las técnicas de inhibición de degradación de 2-desoxi-D-ribosa e inhibición de oxidación de LDL, la tendencia fue similar entre ambas técnicas, sin embargo, los extractos de HC resultaron más efectivos para inhibir la oxidación de LDL que la de 2-desoxi-D-ribosa, y para ambas técnicas, D-5 y D-10 mostraron mejores resultados que R-5 y R-10. En el ensayo de inhibición de hemólisis las decocciones no tuvieron actividad, pero sí HC, tuvo actividad en los dos tipos de extracto evaluados (EMeOH y EHF), mientras que R-5 y R-10 tuvieron actividad sólo en el EMeOH. Ningún extracto tuvo actividad antibacteriana contra *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* en las condiciones evaluadas. En conclusiones, la hoja de noni, así como las decocciones y las hojas residuo de éstas podrían ser una buena fuente de compuestos bioactivos y considerarse un buen suplemento alimenticio añadiendo valor agregado a los productos subutilizados de la planta de *Morinda citrifolia* L.

## ABSTRACT

The plant of *Morinda citrifolia* L. or noni, has been used traditionally to treat some diseases, but in the last years there has been research about its composition and biological, indicating important potential commercial value. It has been found that the noni leaf has the potential to be used as a source of phytochemical compounds that can prevent some diseases and help in the improvement of human health. The use of noni leaves in infusions or decoctions has been documented, however, this process could leave residual components that could be exploited. The objective of this work was to determine the phytochemical composition and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of noni leaf (HC), decoction and leaf decoction residue. Decoctions of 5 and 10 minutes were performed (D-5 and D-10, respectively) and the residual leaves of each were obtained (R-5 and R-10, respectively). For HC, R-5 and R-10, methanolic (EMeOH), lipophilic (ELF), hydrophilic (EHF) and methanol: hexane: acetone (EMHA) extracts were obtained. Physicochemical characteristics were determined and the content of total phenolics (CFT), total chlorophylls (ClfT) and total carotenoids (CT) were determined by spectrophotometric techniques in different extracts, in addition individual carotenoids were identified and quantified using high pressure liquid chromatography (HPLC). The antioxidant capacity was evaluated by different assays, including the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging, 2-deoxy-D-ribose degradation, LDL oxidation inhibition and erythrocyte hemolysis inhibition assays using spectrophotometry. The antimicrobial activity was evaluated using the bacteria *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* by the disc diffusion method. The results of % AT were: HC > R-5 > R-10 > D-10 > D-5; pH: R-10

> D-5 > R-5 > D-10 > HC; and ° Brix: HC > R-5; D-10 > R-10 and D-5. The CFT (mgEAG / g dw) were higher in HC than in R-5 and R-10; in addition, D-10 was greater than D-5. The content of ClfT decreased in R-5 and R-10 with respect to HC, and its content of D-5 and D-10 was not observed. A high content of CT was obtained in HC that increased after the decoction process in R-5 and R-10, but were not detected in the decoctions; it was confirmed by HPLC that the major carotenoids present were  $\beta$ -carotene and lutein, both in HC, and in R-5 and R-10. Antioxidant capacity varied according to the techniques used. The DPPH assay ( $\mu\text{molET} / \text{g bs}$ ) followed the trend of the amount of CFT. For the techniques of inhibition of degradation of 2-deoxy-D-ribose and LDL oxidation inhibition, the trend was similar between both techniques, resulting (in terms of dry weight basis), a greater antioxidant capacity for decoctions, followed by HC and finally R-5 and R-10. In the hemolysis inhibition, test the decoctions had no activity, but HC had activity in the two types of extracts evaluated (EMeOH and EHF), and R-5 and R-10 had activity only in the EMeOH. No extract had antibacterial activity under the conditions evaluated. Therefore, it is concluded that the leaf of noni, as well as the decoctions and the residual leaves of these are good source of bioactive compounds, and can be considered as good nutritional supplement adding added value to the underutilized products of the plant of *Morinda citrifolia* L.

## II. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha ocurrido un auge en el aprovechamiento para el consumo de productos naturales que contribuyan a la mejoría de la nutrición y a la salud humana. Esto se debe a la preocupación mundial de contrarrestar la creciente evolución a una alimentación rica en grasas (especialmente saturadas), azúcar y sal, y deficiente en micronutrientes, fibra dietética y fitoquímicos, lo cual está relacionado con un aumento de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta (FAO 2009).

Por ello, la investigación científica ha llevado a buscar nuevas formas para la obtención de compuestos naturales que proporcionen al organismo nuevas fuentes de nutrición y a la vez, que cuenten con propiedades medicinales que ayuden a prevenir o contrarrestar enfermedades. Tal es el caso de productos derivados de plantas que, aunque se han usado por muchos años por diversas culturas, sus propiedades medicinales no están comprobadas y es de suma importancia tener bases científicas que proporcionen información acerca de su uso (Farzaneh y Carvalho 2015).

Muchos estudios recientes se han enfocado al estudio de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de plantas relacionadas con su contenido de metabolitos secundarios (Barbieri y col 2017). La planta de *Morinda citrifolia* L., conocida como “noni” es una de ellas, de la cual se conocen algunas propiedades, y ha sido usada por muchos años en la medicina polinesia tradicional (Chan-Blanco y col 2006). No obstante, no existe mucha información que sustente la efectividad de dichas propiedades. De esta planta, comercialmente se aprovecha mayormente el fruto, con el cual se producen jugos y extractos, además se encuentran también en el

mercado en forma de polvos o cápsulas que se comercializan como suplemento alimenticio o productos nutraceuticos (Motshakeri y col 2015).

Es por tanto, que resulta importante el estudio y cuantificación de los compuestos fitoquímicos a los que se le atribuyen las propiedades medicinales. En el caso de la hoja de noni, se ha encontrado información acerca de su uso en infusiones o decocciones y para la preparación de alimentos, y se han hecho estudios sobre la composición de fitoquímicos y capacidad antioxidante en las infusiones (West y col 2007, 2009). Sin embargo no hay estudios relacionados con el uso de la hoja residual de los extractos acuosos como subproducto. Diferentes investigadores señalan que los subproductos de la industria de alimentos pueden ser una importante fuente de compuestos bioactivos, por ejemplo, existen estudios donde se ha reportado que en el bagazo de algunas frutas, después de la extracción de jugo, permanece una gran cantidad de fitoquímicos que muestran una alta capacidad antioxidante (Sojka y col 2015).

Además se ha reportado que entre las propiedades medicinales de la planta de noni, se encuentra la actividad para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos (Bushnell y col 1950; Jayaraman y col 2008; Selvam y col 2009)

Es por esto, que el objetivo de este trabajo consistió en determinar el contenido algunos fitoquímicos importantes, así como evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de infusiones y hoja residual de noni.

### **III. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **A. FITOQUÍMICOS**

Diversidad de estudios mencionan que la actividad nutracéutica de las plantas es debida a los fitoquímicos. Éstos, son compuestos químicos que se encuentran en las plantas, y derivan de metabolismos secundarios. Se cree que la presencia de éstos, así como sus concentraciones dependerán en gran medida de las condiciones geográficas y culturales de crecimiento (suelo, luz, precipitación y aire), así como de los factores poscosecha (cosecha, almacenamiento, transporte, procesamiento, etc.) (Deng y col 2010; Farzaneh y col 2015). A grandes rasgos, los fitoquímicos se pueden clasificar según su estructura química en alcaloides, fitoquímicos organosulfurados, terpenoides, y compuestos fenólicos (Barberi y col 2016).

##### **1. Compuestos fenólicos**

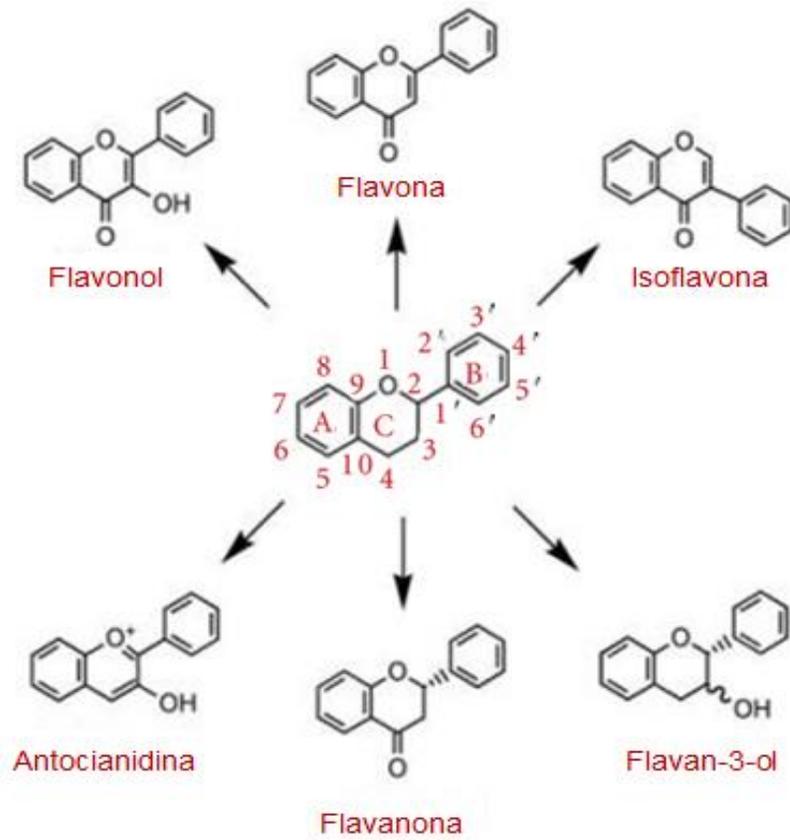
Los compuestos fenólicos se han estudiado con mayor énfasis en años recientes ya que se ha demostrado que pueden ser benéficos para la salud humana, entre varias otras funciones. A diferencia de las vitaminas, que pueden generar beneficios a corto plazo, la ingesta a largo plazo de los compuestos fenólicos puede traer beneficios sobre algunas enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y diabetes Tipo II (Crozier y col 2006).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos a él. Pueden ser clasificados de acuerdo con el número y arreglo de sus átomos de carbono y se encuentran comúnmente

conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grandes grupos: los flavonoides y no flavonoides (Crozier y col 2006).

#### **a. Flavonoides**

Son compuestos fenólicos formados por una estructura general básica de quince carbonos, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son el grupo de fenólicos más numeroso. Los flavonoides están presentes principalmente en la epidermis de algunas hojas, la cáscara de algunas frutas y en muchas flores; tienen importantes funciones como metabolitos secundarios. Los flavonoides en las plantas están involucrados en los procesos de protección contra la luz UV y de pigmentación, la estimulación de nódulos fijadores de nitrógeno y la resistencia a algunas enfermedades. El esqueleto básico de flavonoides puede tener numerosos sustituyentes. Es común encontrar sustituyentes hidroxilo en las posiciones 4', 5 y 7. Las principales subclases son las flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas (**Figura 1**). Los azúcares y los grupos hidroxilo existentes en las moléculas de flavonoides aumentan su solubilidad en agua, mientras que sustituyentes como grupos metilo e isopentilo, los hacen lipofílicos (Crozier y col 2006). Los flavonoides unidos a azúcares se conocen como flavonoides glicosilados y es más común encontrarlos en vacuolas, mientras que las agliconas, los flavonoides que no están unidos a azúcares, están presentes en regiones lipofílicas como glándulas de aceite o capas cerosas (Puppo 1992).



**Figura 1.** Estructura básica de los flavonoides y algunas subclases de estos.

Fuente: Crozier y col (2006).

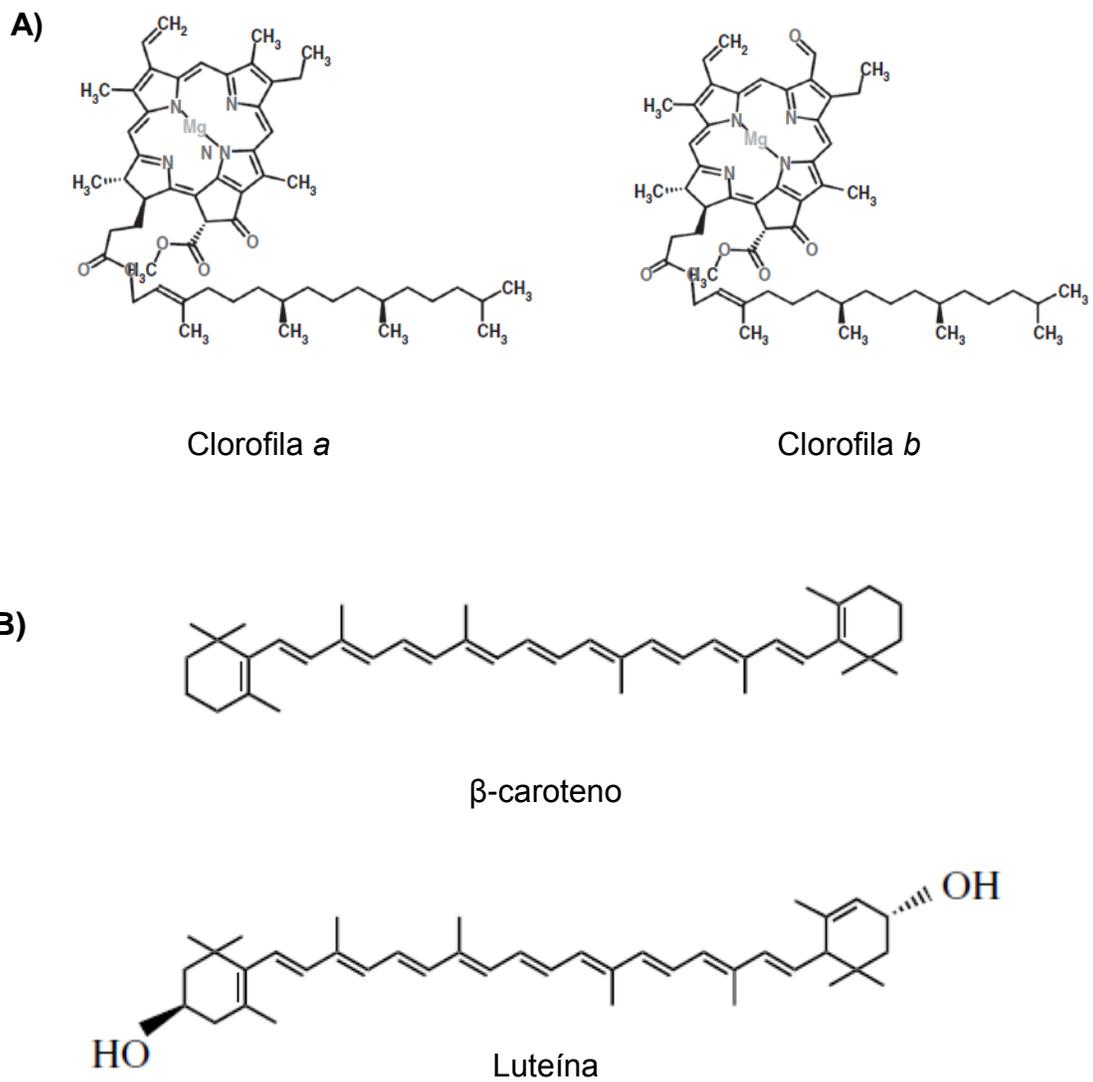
## **b. Compuestos fenólicos no flavonoides**

Los ácidos fenólicos son los compuestos no flavonoides más representativos en la dieta (principalmente el ácido gálico, el cual es precursor de los taninos hidrolizables), los hidroxicinamatos y sus derivados conjugados, y los estilbenos. Los estilbenos son fitoalexinas, compuestos producidos por las plantas en respuesta al ataque por hongos, bacterias y virus patógenos (Crozier y col 2006).

## **2. Clorofilas y carotenoides**

Las clorofilas y los carotenoides son los pigmentos más abundantes en las plantas, sin embargo no sólo son importantes debido a su función fisiológica y coloración que le confieren, sino también por el papel que juegan en la salud humana (Agostini-Costa y col 2014).

Las clorofilas son derivados de dihidroporfirinas quelatadas con un átomo de magnesio en el centro de la molécula. Contienen un anillo isocíclico y son hidrofóbicas debido al alcohol isoprenoico monoinsaturado  $C_{20}$ , el fitol, que está esterificado. Las principales clorofilas de importancia alimentaria son las clorofilas *a* y *b* (**Figura 2A**), las cuales difieren sólo en los grupos  $-CH_3$  y  $-CHO$ , respectivamente, del carbono 7, y son las únicas que se encuentran en plantas superiores con mayor predominancia de la clorofila *a*, en una relación molar clorofila *a/b* de 2.56 a 3.45. En el tejido vegetal, la clorofila es liberada de su complejo proteico seguido por la eliminación del fitol y posiblemente feofitinización. Este proceso degradativo también se observa en los alimentos por efecto del procesamiento y por la severidad del tratamiento. La degradación procede por oxidación de la estructura del anillo a



**Figura 2.** Estructuras de (A) clorofilas *a* y *b* y (B) carotenoides representativos.

Fuente: Krinsky y Johnson (2005); Pareek y col (2017).

clorinas y finalmente por formación de productos finales incoloros (Delgado-Vargas y Paredes-López 2003; Pareek y col 2017).

Los carotenoides son los pigmentos responsables de la mayoría de colores amarillos, anaranjados y rojos de frutos y hojas de las plantas, este color se debe a la presencia de un cromóforo consistente total o parcialmente de una cadena de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides están presentes en todos los tejidos capaces de realizar fotosíntesis, junto con las clorofilas, así como en tejidos no fotosintéticos como componentes de cromoplastos. Químicamente los carotenoides son terpenoides, formados básicamente por ocho unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. En los carotenoides naturales sólo se encuentran tres elementos: C, H y O (**Figura 2B**). El oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo. Dentro de los carotenoides se pueden distinguir dos grupos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, que poseen oxígeno en su molécula. Los dobles enlaces conjugados presentes en los carotenoides son los responsables de la intensa coloración de los alimentos que contienen estos pigmentos (Meléndez-Martínez y col 2004).

Los carotenoides son estables en su ambiente natural, no así a procesos térmicos, así que es probable que, durante procesos de cocción de alimentos, estos pigmentos puedan degradarse. Sin embargo, otros tratamientos como altas presiones parecen no afectar significativamente los niveles de carotenoides (Meléndez-Martínez y col 2004). La mayoría de los carotenoides y clorofilas son poco o completamente insolubles en agua, y su biodisponibilidad está influenciada por la

matriz alimentaria, los niveles de lípidos y los polimorfismos genéticos individuales (Loranty y col 2010).

### **3. Actividad biológica de los fitoquímicos**

El consumo de productos vegetales está asociado con el bajo riesgo de incidencia de enfermedades, lo que se relaciona, entre otros efectos, con su contenido de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos, por ejemplo los flavonoides. Estos compuestos muestran una gran capacidad de captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, además de poseer otras actividades como anti-inflamatorias, antimicrobiana, antineoplásica, antialérgica, entre otras (Kuskoski y col 2005).

Los carotenoides pueden actuar como pro-oxidantes o antioxidantes dependiendo del potencial redox de la molécula y del entorno, entre otros factores. La inestabilidad misma de los carotenoides en procesos oxidativos se corresponde con una alta protección para otros compuestos frente a agentes oxidantes. Los carotenoides que contienen 9 o más dobles enlaces conjugados pueden inactivar algunas formas reactivas de oxígeno, como el oxígeno singulete. El  $\beta$ -caroteno posee una característica importante que lo diferencia del resto de antioxidantes solubles en grasas, la de ser más efectivo a bajas presiones de oxígeno (Meléndez-Martínez y col 2004).

Existen diversos estudios *in vivo* e *in vitro* que indican que los carotenoides son importantes antioxidantes lipofílicos de la dieta, y su consumo regular puede reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Loranty y col 2010).

Los productos vegetales son la mejor fuente de carotenoides, sobre todo por su papel como provitamina A (Saini y col 2015). Además, se ha demostrado que una dieta rica en vegetales ricos en carotenoides disminuye el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada con la edad y formación de cataratas (Saini y col 2015). Por otro lado, se han determinado los perfiles de carotenoides de especies de bayas y frutas tropicales, lo que sugiere que existe el potencial de altos niveles de estos pigmentos en extractos acuosos de frutas y hierbas derivadas de éstos. Sin embargo, aunque puede haber cantidades apreciables de carotenoides en hojas frescas, este valor puede reducirse considerablemente durante el procesamiento, dando lugar a diversos productos de degradación (Loranty y col 2010). Además, otros factores como parte de la planta, especie, grado de madurez y prácticas de cultivo y manejo en post-cosecha tienen efecto sobre los niveles de los carotenoides (Raju y col 2007; Yahia y col 2018).

También se han hecho investigaciones sobre el papel biológico de las clorofilas sobre la salud humana, y se ha sugerido que ayudan en la interrupción de enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Sangeetha y col 2010).

#### **a. Actividad antioxidante**

El interés por los antioxidantes naturales en las plantas ha aumentado debido al crecimiento a nivel mundial del uso de extractos de plantas para usarse como aditivos en alimentos y cosméticos, sobre todo para asegurar la calidad y/o estabilidad de los lípidos y productos que contienen lípidos (Loranty y col 2010). Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que, cuando está presente a baja

concentración en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o evita significativamente la oxidación de ese sustrato” (Frankel y Meyer 2000). Los antioxidantes pueden actuar neutralizando la acción nociva de especies reactivas por tres mecanismos principales: donación de átomos de hidrógeno, transferencia de electrones individuales y quelación de metales de transición (Granato y col 2018).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son especies potencialmente reactivas derivadas de las reacciones de oxígeno que ocurren en el organismo. Aunque son necesarios para las funciones celulares, por ejemplo la señalización y regulación celular (Foyer 2018), el desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes puede generar estrés oxidativo (Shukla y col 2012). Estos radicales se producen por procesos endógenos (enzimas oxidativas, cadena respiratoria) o exógenos (fumar, toxinas, contaminación del aire, entre otros) y pueden dañar a los ácidos nucleicos y las membranas, siendo uno de los factores que contribuyen a la aterosclerosis, cataratas, cáncer, isquemia (vasoconstricción, trombosis), gota, envejecimiento, demencia, diabetes, fibrosis pulmonar y enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Loranty y col 2010).

Especialmente para la aterosclerosis, se ha sugerido que las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) tienen un importante papel en el inicio y desarrollo de esta enfermedad. Muchos estudios han demostrado que la oxidación de las LDL puede retrasarse con sustancias antioxidantes tales como la vitamina E,  $\beta$ -caroteno y ubiquinol contenidos en la lipoproteína, asimismo, extractos de plantas medicinales con propiedades antioxidantes retardan este proceso en sistemas *in vitro*, así como la aparición de la aterosclerosis en modelos *in vivo* (Loy

y col 2002). Por otro lado, el organismo está expuesto a un exceso de radicales libres y resulta improbable que un solo antioxidante sea capaz de proteger a las células de la amplia gama de trastornos agudos y crónicos originados por el exceso de radicales libres (Farzaneh y Carvalho 2015).

Hay muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La estrategia más utilizada es probar la actividad antioxidante total de determinada sustancia frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical en sistemas *in vitro*. La pérdida de color ocurre proporcionalmente con la concentración. Sin embargo, las determinaciones *in vitro*, nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski y col 2005). A pesar de que existen muchos métodos para la medición de actividad antioxidante, uno sólo no es capaz de identificar todos los posibles mecanismos que están implicados en la oxidación (Frank y Meyer 2000).

A continuación se describen algunos ensayos que se utilizan para la medición de la capacidad antioxidante de extractos de plantas reportados en la literatura.

### **1) Ensayo de inhibición de radical DPPH**

El método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) evalúa la capacidad antioxidante de sustancias o extractos que pueden reaccionar con un radical estable, DPPH, en solución metanólica. El método está basado en la medición de la absorbancia de los cambios en la concentración de DPPH después de la reacción con un antioxidante. En la reacción, el electrón desapareado del radical DPPH es reducido por la donación de un átomo de hidrógeno de la sustancia antioxidante (AH) o una especie radical (R<sup>•</sup>), como se indica en la siguiente reacción:



La reducción del radical DPPH se monitorea midiendo la absorbancia a 515 nm durante la reacción, ya que en su forma radical, el DPPH<sup>•</sup> de color violeta absorbe a esta longitud de onda, pero al ser reducido, la absorción disminuye cambiando a un color amarillo (Brand-Williams y col 1995; Dawidowicz y col 2012).

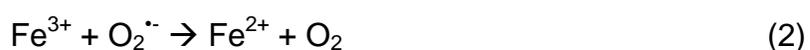
El método de DPPH es fácil, rápido y más económico que otros métodos para medir la capacidad antioxidante *in vitro*, y puede ser adaptado a extractos con diferentes solventes como etanol, metanol, benceno, acetona acuosa y etanol acuoso, entre otros (Cheng y col 2006).

## **2) Ensayo de inhibición de radicales <sup>•</sup>OH en la degradación de 2-desoxi-D-ribosa**

Los daños sobre el ADN se pueden generar a través de procesos metabólicos y/o por diversos agentes químicos o físicos externos (Cadet y col 2016). Una de las especies de oxígeno más reactivas en sistemas biológicos es el radical hidroxilo (<sup>•</sup>HO), que puede formarse por la exposición a radiaciones ionizantes y al contacto de ciertos metales de transición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y están involucrados en muchas enfermedades degenerativas, pudiendo atacar incluso a alcanos, que son considerados moléculas estables a condiciones fisiológicas (Aruoma 1994; Chobot 2010).

La reacción de Fenton (ecuación 1) se desarrolla debido a la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con metales de transición (como Fe, Cu, Cr o Mn), que actúan como

catalizadores, y se acelera por la adición de agentes reductores, como el ácido ascórbico, generando radicales hidroxilo (Chobot 2010), que están implicados en rutas de degradación del ADN bajo condiciones fisiológicas (Cadet y col 2016). Los catalizadores luego son regenerados en reacciones de Haber-Weiss (ecuación 2) (Chobot 2010).



En el ensayo de la desoxirribosa, se produce la reacción de Fenton a partir de Fe (III)-EDTA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de ácido ascórbico para atacar a la molécula de 2-desoxi-D-ribosa. Esta mezcla de reacción se calienta con ácido tiobarbitúrico (TBA), a bajo pH. Los  $\cdot\text{OH}$  que no sean atrapados por el EDTA, atacarán a la molécula de desoxirribosa provocando su oxidación, generando un cromógeno color rosado, que es un complejo del producto de descomposición de desoxirribosa, malondialdehído (MDA) con TBA. Sin embargo, cuando en la reacción existan compuestos capaces de competir por los radicales hidroxilo, tales como compuestos fenólicos, se inhibirá la oxidación de la desoxirribosa y no se formará el cromógeno. El producto cromógeno formado se monitorea espectrofotométricamente a 532 nm (Aruoma 1994).

Se ha sugerido que el daño ocasionado por el sistema Fe (III)-EDTA /  $\text{H}_2\text{O}_2$  / ácido ascórbico, se asemeja al daño ocasionado en el ADN por radiaciones ionizantes (Aruoma 1994). Por lo que los resultados obtenidos con este ensayo

darían una idea de la protección sobre el ADN que confieren los compuestos antioxidantes presentes en el material vegetal.

### **3) Ensayo de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por cobre**

El desarrollo de aterosclerosis es consecuencia de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), en gran medida generada principalmente por ERO y por la presencia de cantidades catalíticas de metales (Loy y col 2002; Milde y col 2007). Esto es debido a que las LDL oxidadas al ser reconocidas por macrófagos, originan células espumosas dando lugar a la formación de estrías grasas que, al acumularse, constituyen la placa aterosclerótica (Pérez-Guerra 2007). Se ha demostrado que el consumo de antioxidantes provenientes de frutas y vegetales está asociado a la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se ha sugerido que la combinación de varios tipos de antioxidantes naturales tiene un mayor beneficio a la salud, ya que puede haber efectos sinérgicos sobre la inhibición de la peroxidación lipídica (Milde y col 2007). Los productos de degradación de la peroxidación lipídica tales como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 2-propenal (acroleína) e isopropanol se pueden medir en plasma u orina como índice indirecto de estrés oxidativo. El ensayo que más frecuentemente se utiliza para esta medida es la determinación de la oxidación de LDL en plasma *ex vivo*, donde se miden las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) generadas por un oxidante, en el cual se forma un cromóforo producto de la reacción de una molécula de malondialdehído (MDA) con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA). Se calienta una sustancia antioxidante con

TBA en condiciones ácidas y el complejo formado MDA/TBA se lee a 532 nm. El ambiente ácido es generado por ácido tricloroacético (TCA), que precipita las proteínas y se aumenta la sensibilidad del complejo MDA/TBA extrayendo con un solvente orgánico como butanol (Calmarza-Calmarza 2008).

#### **4) Ensayo de la inhibición de hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)**

El estrés oxidativo también puede afectar gravemente a nivel celular, especialmente en la membrana, ya que es el primer sitio de contacto al ataque de radicales libres (Bonarska-Kujawa y col 2011). El daño del estrés oxidativo en los eritrocitos puede derivar en enfermedades tales como  $\beta$ -talasemia, anemia falciforme, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y otras hemoglobinopatías (Zhao y col 2017).

La membrana de los eritrocitos está compuesta por 39.5 % de proteínas y 35.1 % de lípidos (principalmente ácidos grasos poliinsaturados), lo que la hace altamente susceptible a la peroxidación. Además, las células rojas de la sangre contienen grandes cantidades de oxígeno y de hierro proveniente de la hemoglobina, por lo que pueden ser iniciadores del proceso oxidativo (Meshkini 2015). Por esto, los eritrocitos han sido considerados un excelente modelo experimental sobre el daño ocasionado por el estrés oxidativo en las membranas celulares (Zhao y col 2017). Se sabe que el  $H_2O_2$  puede penetrar la membrana de los eritrocitos dañando a la célula desde ambos sitios de la membrana (Meng y col 2015). Es por ello que la incorporación de compuestos antioxidantes tiene un papel fundamental para la preservación de la

integridad estructural y funcional de la membrana celular, ayudando al equilibrio iónico y la actividad de receptores y enzimas unidas a ella (Meshkini 2015).

Cuando se libera el hierro de la hemoglobina debido al estrés oxidativo, puede unirse a metabolitos intracelulares y componentes de la membrana que pueden generar radicales hidroxilo a partir de la reacción con  $O_2$  en reacciones tipo Fenton, provocando la peroxidación lipídica de la membrana (Durán y col 2013). El [dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)], abreviado como AAPH, es un iniciador de radicales libres por descomposición térmica sin la adición de cofactores, que ha sido usado comúnmente para evaluación de antioxidantes naturales (Lim y col 2002; Wang y col 2017). En este método *ex vivo* se evalúa el porcentaje de inhibición de la hemólisis de eritrocitos de un extracto o compuesto antioxidante cuando se incuba con la presencia del inductor de radicales AAPH a partir de  $H_2O_2$ .

#### **b. Actividad antimicrobiana**

En febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) dio a conocer una lista de las bacterias patógenas para las que se necesitan nuevos antibióticos de manera urgente, ya que presentan altos niveles de resistencia a los antibióticos actualmente disponibles, y se ha dado prioridad como un problema de salud a nivel mundial debido a la fácil propagación de enfermedades infecciosas ocasionadas por estos microorganismos altamente resistentes (OMS 2017). Dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) las infecciones más recurrentes se dan por bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* y a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella*. Éstas

constituyen un problema sanitario y económico, ya que propagan fácilmente provocando efectos nocivos agudos o crónicos (Ruiz y col 2017).

La resistencia antibiótica se define como “la resistencia de una bacteria al tratamiento con drogas antibióticas que originalmente eran eficaces para el tratamiento de la infección causada por ese microorganismo” (Barberi y col 2017). Esto ha dado lugar a que se piense en nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos naturales en combinación con los antibióticos ya existentes, con el fin de mejorar el efecto del antibiótico. El estudio en décadas pasadas de compuestos fitoquímicos, ha figurado a la actividad antimicrobiana como una de sus propiedades más estudiadas. Esto ha llevado a la investigación de nuevas formas de aplicación de estos compuestos como potenciales antimicrobianos (Barbieri y col 2017). Anesini y col (1993), estudiaron 132 especies de plantas conocidas por sus propiedades terapéuticas, y encontraron que la ebullición en agua de bulbos y hojas produjo extractos muy activos contra bacterias resistentes a penicilina (Anesini y col 1993).

Este tipo de estudios ha dado lugar a la búsqueda de nuevas formas de combatir infecciones, y dado que la síntesis de nuevos antibióticos conlleva muchos años para la disponibilidad al mercado, estudios recientes han demostrado que el uso combinado de antibióticos actualmente disponibles con compuestos fitoquímicos provenientes de fuentes naturales, puede incrementar la actividad de estos antibióticos y disminuir la dosis de los mismos; ya que la monoterapia con fitoquímicos requeriría de altas dosis para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) comparada con la de un fármaco antibiótico (Barbieri y col 2017).

Dentro de las infecciones más recurrentes se encuentra la salmonelosis que es causada por la bacteria *Salmonella*. El género *Salmonella* es representativo de la familia Enterobacteriaceae, bacilos gram-negativos formadores de esporas. En este tipo en particular presentan tres tipos de antígenos: somático O, flagelar H y capsular Vi. Existen dos especies del género *Salmonella*: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*. La última se divide a la vez en seis subespecies: entericae, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica. (Gutiérrez-Castillo y col 2008).

Existen alrededor de 2500 cepas diferentes (serotipos o variantes séricas) de *Salmonella* spp., pero los dos serotipos de *Salmonella* más importantes son la *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, porque son las que provocan el mayor problema de infecciones gastrointestinales a nivel mundial. Si bien estas infecciones suelen ser un trastorno sin complicaciones y muchas veces no requerir tratamiento, sí puede provocar síntomas graves que ponen en riesgo la vida en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos (OMS 2013). Desde principios de la década de 1990 se han identificado cepas de *Salmonella* resistentes a una gama de antimicrobianos, que en la actualidad representan un problema de salud pública grave (OMS 2013). Por su parte, la listeriosis, la infección causada por *Listeria monocytogenes*, puede causar infecciones invasivas durante el embarazo en mujeres y provocar la pérdida del feto, nacimientos prematuros o infecciones en neonatos; en pacientes inmunocomprometidos puede causar gastroenteritis febril autolimitada y tiene una mortalidad superior al 30 % (OMS 2018).

## **B. EL NONI (*Morinda citrifolia* L.)**

### **1. Descripción botánica, origen y distribución**

La planta de *Morinda citrifolia* L., llamada comúnmente “noni”, es un pequeño árbol perenne, miembro de la familia Rubiaceae. El género *Morinda* contiene aproximadamente 80 especies, incluyendo *citrifolia*. Su nombre científico proviene originalmente de las palabras del latín “*morus*” atribuido a mora, e “*indicus*” que proviene de su origen indio. El noni es originario del sureste de Asia y crece en regiones tropicales y subtropicales (Carrillo-López y Yahia 2011; Assi y col 2015; Motshakeri y col 2015).

Las flores perfectas del noni son pequeñas, blancas y tubulares, se agrupan juntas y se insertan en el pedúnculo, con corola de color blanco verdoso (Chan-Blanco y col 2006).

El fruto es de forma oval, de aproximadamente 4-10 cm de largo por 3-4 cm de diámetro. Este fruto al madurar, tiene un olor a queso rancio, y debido a esto también se le conoce como “fruto del queso” (Carrillo-López y Yahia 2011). Su superficie es ligeramente arrugada y los rangos de color van de verde a amarillo, hasta un blanco o gris traslúcido en el tiempo de cosecha, con pequeños brotes marrones rojizos que contienen a las semillas. (Chan-Blanco y col 2006).

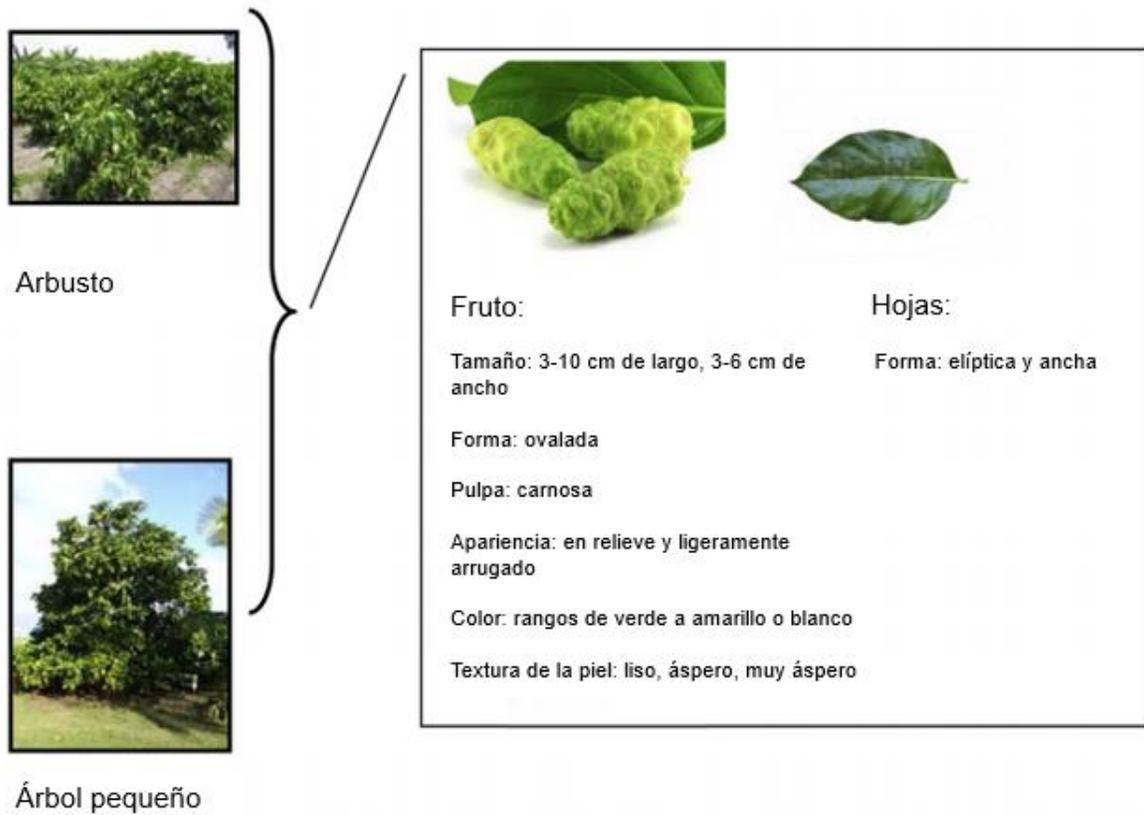
Las semillas son similares en tamaño y forma a las semillas de manzana, pero tienen una capa más dura (Carrillo-López y Yahia 2011). Se encuentran en pequeños pozos conteniendo cuatro semillas color marrón rojizo, de forma triangular, de aproximadamente 3.5 mm (Chan-Blanco y col 2006).

La hoja exhibe un amplio rango de tamaño y forma, ha sido descrita como elíptica y ovalada o redondeada, ancha y brillante, de hasta 25 cm de largo (Dittmar 1993; Pawlus y col 2007). En la **Figura 3** se describen las características físicas de *M. citrifolia* L.

## **2. Importancia económica**

El noni ha sido cultivado más allá de su área de origen, en Norte América, en México y en algunos países del Centro y Sur de América. Los grandes mercados de productos del noni son Norte América, Europa, Japón y México, Asia y Australia, lo cual ha tenido crecimiento gracias a los beneficios a la salud que ofrece esta planta. Se estima que el mercado de productos de noni es de un valor de alrededor de US\$400 millones de dólares (Carrillo-López y Yahia 2011). Los productos comerciales del noni son derivados principalmente del fruto, en forma de jugo, puré o cápsulas de polvo. Por el crecimiento económico que ha tenido en los últimos años, la Comisión Europea, en 2003, aceptó el uso del jugo de noni pasteurizado como un producto seguro para el consumo humano (European Commission 2003), y en 2008, la Comisión Europea aceptó el uso seguro de las hojas de noni (European Commission 2008).

En México en 2016, la SAGARPA reportó una superficie sembrada de 67.30 Ha de noni, con un rendimiento promedio de 7.85 Ton/Ha, y un precio medio rural de 4799.56 \$/Ton. Son pocos los estados que producen cantidades importantes de noni en México, dentro de estos se encuentran Nayarit con una producción de 239.49 Ton, Guerrero con 224.64 Ton, Jalisco con 54.96 Ton, Veracruz con 16.5 Ton, Michoacán



**Figura 3.** Características de la planta de *M. citrifolia* L., fruto y hoja.

Adaptado de Motshakeri y col (2015).

con 9.27 Ton y Tabasco con 7.5 Ton. El valor comercial de este cultivo se centra principalmente en la elaboración de productos a base del fruto de noni, principalmente jugo (SAGARPA 2016).

### **3. Productos derivados de noni**

En la medicina polinesia tradicional, el noni ha sido usado por alrededor de 2000 años para tratar diversas enfermedades. Actualmente, el fruto de noni se comercializa en forma de jugos o cápsulas de polvo como alimento funcional en Asia, Europa y Norteamérica, ya que se le atribuyen propiedades como modulador del sistema inmune, agente anticancerígeno, regulador del ciclo menstrual, antiinflamatorio, antimutagénico, antioxidante, antimicrobiano, entre otras. En estudios *in vivo* e *in vitro*, el noni y productos derivados han mostrado efectos analgésico, anti-mutagénico y anti-carcinogénico, actividad antiinflamatoria y la capacidad de eliminar los radicales libres, de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, de regular el colesterol, de estimular el sistema inmunológico y de regular la función celular (Motshakeri y col 2015).

Además del jugo de noni, las propiedades terapéuticas de la fruta han resultado en el uso generalizado de noni en otras formas de productos como suplementos dietéticos, entre ellos cápsulas de gel, pastillas, jarabes, bebidas, polvos, purés, extractos, entre otros (Motshakeri y col 2015).

No obstante, la industria de procesamiento del noni se ha centrado en el fruto, siendo menos aprovechadas otras partes de la planta, como la hoja, que también presenta potencial beneficioso para la salud por su contenido de fitoquímicos (Chan-Blanco y col 2006). Actualmente, la hoja se comercializa seca para la preparación de

infusiones, ya que este método resulta una manera sencilla de extraer los compuestos benéficos que se han encontrado en esta parte de la planta.

#### **4. La hoja de noni**

La hoja del noni ha sido usada para tratar diversas enfermedades en la medicina Polinesia tradicional por más de 2000 años por sus diversas propiedades. Entre las cuales se encuentran la actividad antioxidante y la antimicrobiana, lo que se ha atribuido a las cantidades importantes de compuestos fenólicos y no fenólicos (Chan-Blanco y col 2006). En la Polinesia francesa, se ha utilizado la hoja del noni para cocinar pescado que se envuelve en las mismas y al final se consume. También fueron tradicionalmente usadas en las Islas del Pacífico y el Caribe como infusión para el cuidado y mantenimiento de la salud (West y col 2007). Además, resulta conveniente que la planta sea de fácil cuidado, fuerte y que pueda crecer bajo diferentes condiciones (West y col 2007).

Las hojas de noni se han usado tradicionalmente para tratar quemaduras de la piel, dolores de cabeza, fiebre, fracturas óseas, calambres menstruales, infestaciones de insectos, dolor reumático, úlceras, gota, hemorragia interna, tiña y neuralgia (Nelson y Elevitch 2006; Nerurkar y col 2015). Y en estudios actuales se ha probado su actividad para tratar infecciones helmínticas, tuberculosis, estrés oxidativo, heridas abiertas, como antialérgico (Nerurkar y col 2015) e hiperlipidémico (Mandukhail y col 2010). Se han realizado estudios *in vitro* donde extractos etanólicos de hoja de noni podrían mejorar la pérdida de peso disminuyendo la actividad de la enzima lipoprotein lipasa (LPL), la cual es un factor clave para el almacenamiento de la grasa en los tejidos adiposos, y por lo tanto en el desarrollo de

obesidad (Pak-Dek y col 2008). En estudios *in vivo*, ha disminuido significativamente la glucosa en plasma de ratas diabéticas (Nerurkar y col 2015).

Aunque su consumo como alimento está documentado, no hay muchos estudios al respecto sobre la composición nutrimental de la hoja de noni. Sin embargo, Sudjaroen (2012), realizó un estudio sobre la composición química de un grupo de plantas y vegetales de la región de Songkram, Tailandia, en donde incluyó las hojas de noni (*Morinda citrifolia* L.), se determinó la siguiente composición nutrimental: 76.56% agua, 4.71% proteína cruda, 1.42% grasa cruda, 1.97% ceniza, 4.34% fibra dietaria total, de la cual 3.15% es insoluble y 1.19% es soluble, y 11% carbohidratos. Además, se determinó el contenido de calcio, vitamina C y  $\beta$ -caroteno, obteniendo 469.71 mg/100 g, 3.48  $\mu$ g/100 g y 45.78 mg/100 g, respectivamente. Entre los flavonoides que se han identificado en la planta de noni se encuentran catequina, epicatequina, kaempferol, quercetina y rutina (Montshakeri y col 2015).

Las hojas de noni también proveen una fuente de proteína para la dieta en áreas tropicales donde otras fuentes de proteína no están siempre disponibles. Además, se le ha considerado una excelente fuente de  $\beta$ -caroteno, ya que a esto se le atribuyó el mejoramiento de la ceguera nocturna en niños de la isla de Kiribati (ubicada en el Océano Pacífico, en el Noreste de Australia) que consumían la hoja de noni en su alimentación. Las hojas de noni están incluidas en las tablas de composición de alimentos para el Este de Asia y las Islas del Pacífico de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (West y col 2007).

Debido a estos conocimientos tradicionales, y al creciente mercado de productos de noni, en Japón, Europa y Estados Unidos se ha incrementado el consumo de productos hechos a base de hoja de noni. West y col (2009), realizaron un estudio sobre la toxicidad en ratas de infusiones de la hoja seca de noni, encontrando que su consumo no presentó un riesgo potencial para la salud (West y col 2009). En 2008, el Panel de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) concluyó que el uso de hojas de noni secas y tostadas para la preparación de infusiones a los niveles previstos de ingesta, es seguro (Zhang y col 2016).

Aalbersberg y col (1993), estudiaron el contenido de carotenoides en las hojas, corteza y fruto de *M. citrifolia* y encontraron que las hojas fueron una fuente sustancial de carotenoides y por lo tanto, tienen un gran potencial para tratar deficiencia por vitamina A (Pawlus y col 2007). Otro estudio, pero en extractos acuosos de la hoja de *M. citrifolia* en Brasil, mostró la presencia de alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y triterpenoides. En el **Cuadro 1** se presentan algunos de los compuestos encontrados en hoja de noni (Abou-Assi y col 2017).

La identificación de estos compuestos en la hoja de noni ha llevado a la investigación de su actividad biológica en diferentes extractos. Zin y col (2002) encontraron propiedades antioxidantes en extractos metanólicos de hoja de noni similares a la vitamina E y butilhidroxitolueno (BHT), que redujeron la oxidación de lípidos que causan malos sabores en alimentos. La administración oral de extractos metanólicos de hoja de noni en ratones con linfoma, lograron incrementar la actividad

**Cuadro 1.** Algunos de los compuestos identificados en la hoja de noni.

<b>Compuesto</b>	<b>Clasificación química</b>	<b>Actividad</b>
Americanina A	Lignano	Larvicida, antioxidante
Prolina Leucina Cisteína Metionina Glicina Histidina Isoleucina Ácido glutámico Fenilalanina Serina Treonina Triptófano Tirosina Arginina Valina	Aminoácido	Fuente de aminoácidos esenciales y condicionales
Quercetin-3-O-β-D-glucopiranososa Quercetin-3-a-L-ramnopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosido	Flavonoides	Antimicrobiano
Ácido ursólico	Triterpenoides	Anticancerígeno
β-sitosterol	Esteroles	Disminuye el colesterol en sangre y estimula sistema inmune
Citrifolinosido B	Iridoides	Supresor de la inducción a UVB Activador de Protein-1 (AP-1)
Kaempferol 3-O-β-D-glucopiranosil-(1-2)-a-L-ramnopiranosil-(1-6)-β-D-galactopiranosido	Derivados de clorofila	Podría participar en la reducción de los niveles de glucosa en sangre
Escopoletina	Derivado de cumarina	Efecto antiproliferativo de cáncer

Adaptado de Abou-Assi y col (2017).

de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y de glutatión y ácido ascórbico. Se sabe que el linfoma progresa por especies como  $\cdot\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$  (Anitha y Mohandass 2006).

Además, se ha evaluado la actividad antimicrobiana en diferentes extractos de hoja de noni en diferentes estudios. Se ha demostrado que puede inhibir el crecimiento de bacterias como *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus* gracias a compuestos fenólicos como acubina, *l*-asperulósido, alizarina y escopoletina (Abou-Assi y col 2017). Sharma y Sharma (2010) demostraron la inhibición del crecimiento con extractos de hoja de noni combinado con *Eclipta alba* con resultados positivos sobre todas las bacterias *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*; y en *Candida albicans*.

### **C. DECOCCIONES**

Las preparaciones herbales son probablemente el método más común de la medicina tradicional para tratar diversas afecciones. Se les conoce coloquialmente como té, lo cual proviene en realidad de la infusión preparada con la planta del té (*Camelia sinensis*) (Pamplona 2006). Estas preparaciones pueden ser infusiones o decocciones, las primeras son aquellas en donde el material vegetal (hojas, flores, raíces o tallos) se extrae con un solvente que puede ser agua, aceite comestible o alcohol y se deja en reposo o suspendido en el solvente por un tiempo determinado. En las decocciones, se deja hervir el material vegetal durante unos minutos permitiendo la salida de más sustancias, aunque pueden perderse algunos compuestos de aroma; suelen usarse cuando se buscan las propiedades medicinales

o la actividad biológica sobre las características organolépticas (Visht y Chaturvedi 2012).

El consumo de infusiones y decocciones ha sido muy popular alrededor del mundo por muchas generaciones, pero en la última década su consumo se ha incrementado hasta en un 30% debido principalmente a que hay estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran su potencial para combatir enfermedades degenerativas (da Silveira y col 2014). Los estudios han correlacionado los beneficios a la salud del consumo de estas bebidas con la presencia de flavonoides y otros compuestos fenólicos, los cuales han demostrado actividades antioxidantes (da Silveira y col 2014). Además, el uso de tratamientos con hierbas para combatir enfermedades tiene efectos secundarios mínimos, o probablemente ninguno, si se compara con tratamientos químicos, que presentan efectos secundarios (Farzaneh y Carvalho 2015). Por otro lado, el uso de la medicina tradicional y remedios naturales suele ser a veces, la única fuente asequible para el tratamiento de enfermedades en las comunidades de bajos recursos económicos (OMS 2002).

El consumo de té proporciona un blindaje quimiopreventivo contra enfermedades neurodegenerativas, cáncer y enfermedades cardiovasculares que son de interés creciente en las investigaciones actuales; este blindaje es probablemente el resultado de la capacidad de los extractos herbales sobre la actividad citotóxica y la generación de citoquinas (Farzaneh y Carvalho 2015).

Da Silveira y col (2014), realizaron un estudio de optimización para encontrar las mejores condiciones de preparación de infusiones y decocciones de té mate (*Ilex paraguariensis*), una de las bebidas más consumidas en algunos países de Sud

América incluyendo Brasil y Argentina y que tiene alto contenido de rutina, un flavonoide compuesto por una molécula de quercetina unido a un disacárido, compuesto de ramnosa y glucosa, al que se le atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y hepatoprotectoras; estos autores mencionan que el método y las condiciones de preparación de las infusiones puede alterar la composición química del té. Factores como la velocidad de transferencia de los compuestos, la cantidad de hojas usadas, el tamaño de partícula, el volumen de agua, la temperatura, la presencia o ausencia de agitación, la duración de la infusión y el uso de ingredientes adicionales como azúcar o leche también puede alterar la composición química de la bebida (da Silveira y col 2014).

Las hojas de noni han sido usadas tradicionalmente por los pobladores de islas del Pacífico y el Caribe para elaborar infusiones que se consumen para promover y mantener la salud (West y col 2009).

West y col (2009), realizaron un estudio para comparar las propiedades antioxidantes de infusiones de hoja seca de noni en comparación con infusiones de té verde. Estos autores concluyeron que la eliminación de radicales DPPH de la infusión de hojas de noni fue mayor que la infusión de té verde (81.6% frente a 57.5%,  $P < 0,001$ ). Los contenidos medios de quercetina y kaempferol de la infusión de hojas de noni secadas fueron 0.24 y 0.14  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En la infusión de té verde, estos valores fueron 0.16 y 0.06  $\mu\text{g/mL}$ . Se observó que la infusión de hoja de noni secada contenía 1.5 veces más quercetina y 2.3 veces más kaempferol que la infusión de té verde. Esto puede explicar, en parte, la mayor actividad de eliminación del radical DPPH de la infusión de hojas de noni. Sin embargo, los

autores mencionan que estos valores pueden variar debido a que los componentes pueden diferir de acuerdo al origen y grado de secado de las hojas (West y col 2009). Farzaneh y Carvalho (2015), también mencionaron que, aunque se correlaciona la actividad antioxidante con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en las plantas, existe una gran cantidad de compuestos que también pueden ofrecer actividad antioxidante. También se ha atribuido el efecto antioxidante en la inhibición de la peroxidación lipídica y la inhibición de radicales  $\cdot\text{OH}$  al contenido de rutina en extractos acuosos de la hoja de noni (Serafini y col 2011).

Se han realizado estudios sobre el contenido de compuestos fenólicos en infusiones de algunas plantas y los beneficios que éstos traen a la salud, sin embargo, hay pocos estudios sobre el contenido de carotenoides y otros pigmentos, como las clorofilas, ya que éstos al ser lipofílicos, no se extraen con el agua de infusión, pero sí podría quedar una cantidad importante en las hojas residuo. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los carotenoides son importantes antioxidantes lipofílicos, y que su consumo regular disminuye el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Loranty y col 2010).

#### **D. SUBPRODUCTOS**

Como en muchos procesamientos de alimentos, después de la elaboración de decocciones quedan residuos que bien podrían considerarse como subproductos. Se ha demostrado en algunos subproductos un contenido importante de compuestos bioactivos que podrían aprovecharse (Zhou y col 2009). En este sentido, Sáyago-Ayerdi y col (2014), evaluaron el potencial nutricional, fitoquímico y antioxidante de subproductos de decocciones de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y

consideraron al subproducto de la decocción de flor de jamaica como un material rico en polifenoles y fibra dietaria, que podría usarse como fuente de antioxidantes naturales.

En el caso de decocciones de plantas medicinales, no se encontraron muchos estudios sobre el uso del subproducto. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la hoja de noni presenta un contenido importante de fibra dietaria y  $\beta$ -caroteno (Sudjaroen 2012), los cuales son compuestos lipofílicos que no se extraerían con el agua usada para la preparación herbal, pudiendo resultar en una fuente potencial de estos compuestos. Se sabe que los procesos de cocción, como las decocciones, podrían favorecer la extracción de compuestos en el material vegetal y facilitar su disponibilidad para la absorción de los mismos (Misra y col 2013; Kao y col 2014).

Se han encontrado importantes cantidades de estos compuestos en la planta de *Morinda citrifolia* (Chan-Blanco y col 2006; Motshakeri y col 2015), sin embargo, no existen muchos reportes de las cantidades finales de estos compuestos en extractos acuosos de la hoja, así como tampoco se han encontrado reportes de las cantidades residuales en la hoja como subproducto del extracto.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La planta del noni (*Morinda citrifolia* L.) es poco conocida en México, sin embargo, se ha reportado que posee diversas propiedades medicinales, entre las que se encuentran actividades antioxidante y antimicrobiana. Actualmente el fruto se consume en México principalmente procesado en forma de jugo, puré o como suplemento alimenticio. Al ser un cultivo que requiere relativamente pocos cuidados tiene un gran potencial de desarrollo en México debido a que algunos estados cuentan con las condiciones climatológicas adecuadas para su crecimiento. Además, se ha demostrado que las diversas condiciones ambientales promueven la producción de diferentes metabolitos secundarios incluso dentro de una misma variedad de planta, por lo que es importante caracterizar la planta de noni de la región. Por sus propiedades medicinales y nutrimentales, el uso del fruto del noni va en aumento, sin embargo, se ha restado importancia a otras partes estructurales de la planta, como la hoja, de la cual se ha demostrado que posee cantidades importantes de compuestos fitoquímicos que podrían proporcionarle propiedades medicinales. Por otro lado, la elaboración de productos a partir del fruto o de la hoja, dejan residuos de la planta que podrían contener aún considerables cantidades de compuestos fitoquímicos o nutrimentales que son desaprovechados.

Debido a esto, la orientación de este trabajo estuvo encaminada a darle un uso a la hoja del noni mediante la realización de decocciones de la misma, y determinar el potencial de aprovechamiento del subproducto resultante con el fin de determinar sus compuestos fitoquímicos y evaluar sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, tanto de la decocción como de la hoja residuo.

## **V. HIPÓTESIS**

La decocción de la hoja de noni, así como la hoja residuo de la decocción, presentan cantidades importantes de fitoquímicos y propiedades antioxidante y antimicrobiana.

## **VI. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

Realizar la caracterización fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de productos derivados de la hoja del noni (decocción y hoja residuo de la decocción).

### **B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Realizar el análisis fisicoquímico (humedad, cenizas, pH, acidez titulable y sólidos solubles totales) de hoja, decocción y residuo de decocción de hoja de noni.
2. Determinar la composición de fitoquímicos importantes (fenólicos totales, clorofilas totales y carotenoides totales) en hoja, decocción y residuo de decocción de hoja de noni.
3. Identificar y cuantificar el contenido de carotenoides utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) en hoja, decocción y residuo de decocción de hoja de noni.
4. Evaluar la capacidad antioxidante de hoja, decocción y residuo de decocción de hoja de noni utilizando 4 ensayos, incluyendo “inhibición del radical DPPH”, “inhibición de oxidación de LDL”, “inhibición de la degradación de 2-desoxi-D-ribosa” e “inhibición de la hemólisis eritrocitaria”.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de hoja, decocción y hoja residuo de decocción noni en cepas de bacteria.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

Se utilizó como materia prima hojas de noni (*Morinda citrifolia* L.) recolectadas de diferentes árboles en un huerto ubicado en Carretera Sanalona, Culiacán, Sinaloa, en abril de 2017. Las hojas fueron seleccionadas por similitud de tamaño y color, para obtener muestras homogéneas. Fueron trasladadas al laboratorio de Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde se llevó a cabo su lavado con agua corriente, sanitización y enjuague con agua destilada. Las muestras fueron secadas y almacenadas a -20 °C para posteriormente ser liofilizadas. De esta etapa de liofilización se obtuvo la muestra de hoja cruda (HC).

#### 1. **Elaboración de las decocciones y obtención de los residuos de decocción de hoja de noni**

Para la realización de las decocciones se utilizó el liofilizado de HC, siguiendo un método de preparación de decocciones a partir de polvo de hierbas. Se usaron 2 gramos de hoja seca (liofilizada) por cada 250 mL (que es lo que se añade típicamente a una infusión) de agua destilada a 100°C con calentamiento continuo. El polvo de materia seca se colocó dentro de un filtro de papel para cafetera sobre una canastilla de tela, y ésta se puso dentro del agua en ebullición, a fin de simular una bolsa de té comercial. Se realizaron decocciones con dos tiempos de procesamiento, 5 y 10 minutos, denominadas como D-5 y D-10, respectivamente. Se prepararon

cada vez que se realizaron análisis dejando enfriar a temperatura ambiente antes de efectuar el análisis.

Para cada una de las decocciones, se obtuvieron los residuos de decocción de hoja, los cuales fueron removidos del exceso de humedad y congelados a -20 °C hasta su liofilización. Las muestras de residuo de decocción de hoja de noni se denominaron R-5 y R-10, para 5 y 10 minutos respectivamente.

## **B. MÉTODOS**

### **1. Análisis fisicoquímicos**

#### **a. Humedad**

Se determinó el contenido de humedad mediante el método termogravimétrico 972.2 descrito por la AOAC (2012) en las muestras de hoja cruda (HC), decocción de 5 min (D-5), decocción de 10 min (D-10), residuo de decocción de hoja de 5 min (R-5) y residuo de decocción de hoja de 10 min (R-10). El método se basa en someter la muestra a desecación en una estufa de aire forzado hasta obtener peso constante. Mediante la cuantificación de la pérdida de peso, se determina el porcentaje de humedad contenido en la muestra.

El análisis se llevó a cabo por triplicado. Se colocaron una serie de cápsulas de porcelana en una estufa (marca Felisa, Modelo FE-292D, Serie 0511109) por 24 horas a 100 °C para conseguir el peso constante (PCc). Se pesaron 1.5 g de muestra fresca (PMf) junto con la cápsula de porcelana utilizando una balanza analítica (Marca Sartorius ED2245) y posteriormente se secaron en la estufa durante 24 horas a 100 °C. Una vez pasado el tiempo de secado por convección se dejaron enfriar a

temperatura ambiente por 30 min en un desecador. Después se determinó el peso de la muestra seca (PMs) calculando el contenido de humedad con la siguiente fórmula:

$$Humedad(\%) = \frac{PMf - (PMs - PCc)}{PMf} (100)$$

Donde:

PMf = Peso de la muestra fresca (g)

PCc = Peso constante de la cápsula (g)

PMs = Peso del recipiente con la muestra seca (g)

#### **b. Cenizas**

Se siguió la metodología 940.26 de la AOAC (2012) por triplicado. Esta determinación se llevó a cabo colocando varios crisoles de porcelana en una estufa con aire forzado para obtener peso constante (Thermolyne, Modelo FB1415M, Serie 1257050461027, México) por espacio de 24 h a una temperatura de 100 °C. Enseguida fueron ambientados durante 30 min en un desecador y se registró el peso (W2). Inmediatamente después a cada crisol se le adicionaron 2 g de muestra fresca (PMf), los cuales fueron sometidos a carbonización en una placa de calentamiento (Thermolyne, Modelo SP131015, Serie 130040705026). Los crisoles con la muestra carbonizada fueron colocados en una mufla por espacio de 5 h a una temperatura de 550 °C. Pasado este tiempo, la temperatura de la mufla se bajó hasta los 100 °C, para posteriormente colocar los crisoles con la muestra en el desecador en el cual se mantuvieron por 30 minutos, finalizado esto, se registró su peso (W1). Los cálculos fueron realizados de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Cenizas(\%) = \frac{W1 - W2}{PMf} (100)$$

Donde:

W1 = Peso del crisol con cenizas (g)

W2 = Peso del crisol (g)

PMf = Peso de la muestra fresca (g)

### c. Acidez titulable

Se llevó a cabo de acuerdo con el método oficial de la AOAC (2012), que consistió en pesar 5 g de cada muestra, en fresco (HC, R-5 y R-10) a los cuales se les adicionaron 50 mL de agua destilada neutra (pH=7), posteriormente se filtró y se tomó una alícuota de 20 mL para proceder a titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar un pH de  $8.1 \pm 0.2$  (punto de vire de la fenolftaleína). En el caso de las decocciones (D-5 y D-10), se usaron 50 mL de la misma como alícuota para las mediciones. Los cambios de pH fueron observados en un potenciómetro (Orion 420-A, USA) y el porcentaje de acidez titulable se expresó como el porcentaje de ácido cítrico que fue calculado con la siguiente ecuación:

$$AT(\%) = \frac{[(VG)(MEqA)(N)(V)]}{[(PM)(A)]} (100)$$

Donde:

VG = mL de NaOH gastados en la titulación.

V = Volumen total de la disolución.

N = Normalidad del NaOH (0.1 M).

A = Alícuota de la muestra.

MEqA = Peso miliequivalente del ácido cítrico (0.064 g)

PM = Peso de la muestra.

Nota: En el caso del cálculo de las decocciones, se dividió solamente entre el volumen de la alícuota (A), sin tomar en cuenta volumen total de la disolución (V) ni peso de la muestra (PM).

#### **d. pH**

Para la medición del pH se siguió la metodología de la AOAC (2012), para la cual se utilizó un potenciómetro digital (Orion 420-A, USA) previamente calibrado a pH 4, 7 y 10; en las mismas alícuotas obtenidas para el análisis de acidez. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **e. Sólidos solubles totales (°Brix)**

El contenido de sólidos solubles totales se llevó a cabo mediante refractometría de acuerdo al método 932.12 de la AOAC (2012), donde se colocaron unas gotas de cada decocción en un refractómetro (marca ATAGO 1-877-USA), con ajuste automático de temperatura. Para el caso de HC, R-5 y R-10, se realizaron las mediciones en las soluciones obtenidas para el análisis de acidez titulable (5 g de muestra en 50 mL de agua destilada), se pusieron unas gotas en el refractómetro para tomar la lectura, reportándose los resultados como °Brix. Las cuantificaciones se realizaron a temperatura ambiente, por triplicado.

## **2. Caracterización fitoquímica**

### **a. Compuestos fenólicos totales**

#### **1) Extracción de la muestra**

La extracción se llevó a cabo por triplicado mediante dos metodologías. La primera fue siguiendo la metodología propuesta por Gómez-Romero y col (2010) con algunas modificaciones, en HC, R-5 y R-10. Se pesaron  $0.5 \pm 0.05$  g de muestra liofilizada, se agregaron 5 mL de metanol, se homogenizó en vortex (Scientific Industries, Modelo No. G560) durante 1 minuto, y se sonicó durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm (Eppendorf AG, 5811F No. 0030768) a 2 °C durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante en un matraz de fondo redondo y se repitió el mismo procedimiento con el pellet adicionando otros 5 mL de metanol. Se juntaron ambos sobrenadantes en el matraz bola y se evaporaron bajo presión reducida a 40 °C en rotavapor (Heidolph, modelo LABOROTA4011, serie 100500495, Alemania). El extracto seco resultante se resuspendió en 5 mL de metanol, se filtró con membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenó en viales ámbar a -20 °C hasta el análisis y se denominó como extracto metanólico (EMeOH).

La segunda metodología, fue pesando por triplicado 0.5 g de muestra liofilizada (HC, R-5 y R-10), el cual se homogenizó en vortex por espacio de 1 min con 25 mL de una mezcla de hexano:diclorometano (1:1 v/v). Después, las muestras fueron sometidas a ultrasonido por 20 min y a centrifugación a una velocidad de 4000 rpm por 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recuperados y los sedimentos fueron sometidos al mismo proceso de extracción descrito con anterioridad. Terminada la segunda extracción, los sobrenadantes fueron reunidos y concentrados por medio de

un rotavapor a 40 °C y presión reducida. El extracto seco y concentrado fue resuspendido en 10 mL de acetona, y después se filtró con membrana de 0.45 µm, éste se designó como extracto lipofílico (ELF). Los sedimentos residuales producto de las centrifugaciones de los ELF se sometieron a una nueva extracción con 20 mL de una mezcla de acetona:agua:ácido acético (70:29.5:0.5 v/v/v) mediante homogenización, sonicación y centrifugación bajo las mismas condiciones mencionadas en el apartado anterior, se juntaron los sobrenadantes sin concentrar en rotavapor, y se obtuvo el extracto hidrofílico (EHF) (Wu y col 2004).

## **2) Curva de calibración**

Para la curva de calibración se realizó una solución stock, por triplicado, de ácido gálico 1 mg/ mL en agua destilada. Posteriormente se prepararon diluciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/mL, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo el ensayo de Folin-Ciocalteu que se explica en el paso siguiente.

## **3) Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales**

Para efectuar el ensayo se siguió la metodología de Singleton y col (1999) se adicionaron en tubos de vidrio, 500 µL de agua destilada, 125 µL del extracto (decocción, EMeOH o EHF, y de cada dilución para el caso de la curva de calibración), el cual se oxidó con 125 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. Luego de 6 min de reposo en oscuridad, se adicionaron 1250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% como catalizador y 1000 µL de agua destilada. Después de 90 min de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Modelo GENESYS 10 UV, Serie 2H7G229001, USA). El contenido de fenólicos totales se reportó como

miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg AG/100g bs) y por 100 gramos de muestra en base húmeda (mg AG/100g bh).

## **b. Carotenoides totales y clorofilas totales**

### **1) Extracción de la muestra**

La extracción de carotenoides y clorofilas se llevó a cabo mediante la metodología de Ornelas-Paz y col (2013), con algunas modificaciones. Los extractos se realizaron por triplicado. Para el caso de HC, R-5 y R-10 (liofilizadas) se pesó 1 g de muestra y se pusieron en tubos tipo Falcon de 50 mL, y para el caso de D-5 y D-10, se pesaron 200 g del líquido (que corresponden aproximadamente a 200 mL) y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL. A cada muestra se le adicionó 0.1 g de  $\text{Ca}_2\text{CO}_3$  para neutralizar los ácidos presentes y 20 mL de metanol. Esta mezcla se homogenizó en Ultraturrax durante 1 min y el homogenizado se filtró por vacío en papel filtro Whatman No. 3. Se realizaron 2 lavados adicionales con metanol (20 mL c/u) y luego 2 lavados (20 mL c/u) con una mezcla de hexano:acetona (1:1 v/v) conteniendo 0.1% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, hasta que el residuo sólido quedó decolorado. El filtrado se vació a un embudo de separación de 500 mL, se agregaron 40 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 10% y se agitó vigorosamente durante 1 min; seguido de esto se hicieron 3 lavados con agua destilada (50 mL c/u) y se agitó durante 30 seg en cada lavado. Se dejó reposar durante 15 min hasta la separación de fases para después decantar y separar la fase orgánica, la cual se colocó en matraces bola cuidando que no quedaran gotas de la fase acuosa (en cuyo caso se retiraron cuidadosamente con pipeta Pasteur de vidrio). El solvente orgánico del extracto se evaporó en rotavapor por 15 min a 40 °C. Una vez obtenido el extracto

concentrado, en el caso de hoja cruda y hoja residuo, se resuspendió en 2 mL de acetona grado HPLC; y en el caso de decocción, se resuspendió en 2 mL de acetona y adicionalmente, se evaporó el solvente con corriente de nitrógeno y finalmente se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de acetona grado HPLC. Los extractos se filtraron con membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman International Ltd, Maidstone, England) y se pusieron en viales para las mediciones.

## 2) Curva de calibración de $\beta$ -caroteno

Se pesaron 0.001 g de estándar de  $\beta$ -caroteno y se aforaron a 10 mL con acetona generando una solución stock de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (se realizó por triplicado). De ella se tomaron 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L}$  y se completaron a 2 mL con acetona para cada dilución. La curva de calibración fue generada con concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , utilizando acetona como blanco.

## 3) Cuantificación de carotenoides totales y clorofilas totales

Una vez obtenidos los extractos, se hicieron diluciones adecuadas con acetona y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro (Modelo GENESYS 10 UV, Serie 2H7G229001, USA) a tres longitudes de onda: 450, 645 y 662 nm. La determinación de clorofilas se calculó con las ecuaciones de Lichtenthaler y Buschmann (2001):

$$\text{Clorofila } a \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 11.24 A_{662} - 2.04 A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 20.13 A_{645} - 4.19 A_{662}$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

Donde:

$A_{662}$  = Absorbancia de la muestra a 662 nm

$A_{645}$  = Absorbancia de la muestra a 645 nm

El resultado de clorofilas totales se expresó como mg/g bs y mg/100 g bh de clorofilas totales.

El contenido de carotenoides totales se calculó con las mediciones de absorbancia a 450 nm a partir de la curva de  $\beta$ -caroteno, y restando de este valor el contenido de clorofila total de las ecuaciones anteriores. Se expresó en mgE $\beta$ -caroteno/g bs y mgE $\beta$ -caroteno/100 g bh.

### **c. Carotenoides individuales identificados y cuantificados por HPLC**

#### **1) Extracción de la muestra**

El análisis de carotenoides individuales se realizó con los mismos extractos obtenidos para carotenoides totales. Las mediciones se realizaron el mismo día de obtención de los extractos.

#### **2) Identificación y cuantificación de los carotenoides por HPLC**

Los extractos fueron inyectados en volúmenes de: HC, R-5 y R-10, 10  $\mu$ L; y D-5 y D-10, 15  $\mu$ L; en un sistema HPLC (HP 1100, Agilent Technologies Co, Palo Alto, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD). Se utilizó una columna YMC C<sub>30</sub> de 3  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm en fase reversa a 15 °C. La fase móvil consistió en agua (A), metanol (B) y metil *ter*-butil-éter (C) con una velocidad de flujo de 0.75 mL/min y el siguiente gradiente: 4% A / 94.5% B / 1.5% C al minuto 0; 4% A / 68% B / 28% C al minuto 31; y 4% A / 53% B / 43% C al minuto 52. Los espectros de

absorción fueron registrados a 441, 452, 447 y 665 nm. La identificación y cuantificación de los picos se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros de absorción de estándares de  $\beta$ -caroteno y luteína (Cervantes-Paz, 2012).

### **3. Evaluación de la capacidad antioxidante**

#### **a. Capacidad de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)**

Se siguió la metodología de Brand-Williams y col (1995) para la evaluación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical DPPH. En el que se determinaron los cambios de concentración del radical DPPH después de ser reducido por la acción de donación de átomos de hidrógeno de una sustancia antioxidante, produciéndose un cambio de color de violeta a amarillo que es medido espectrofotométricamente.

##### **1) Curva de calibración**

Para la curva de calibración se preparó una solución stock de Trolox 1 mg/mL en metanol (por triplicado) para realizar diluciones de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160  $\mu\text{g/mL}$ .

##### **2) Medición de la capacidad antioxidante**

Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de cada extracto (ELF, EHF, EMeOH, decocción) o de cada dilución de Trolox, con 2900  $\mu\text{L}$  del radical DPPH en tubos de vidrio. De igual manera se determinó la absorbancia de un control de 100  $\mu\text{L}$  de metanol y 2900  $\mu\text{L}$  de radical DPPH. La mezcla se agitó por 10 s en vortex y se dejó reposar por 30 min en la oscuridad. Después de este tiempo, se leyó la absorbancia a 515 nm y se calculó la

capacidad antioxidante como % de inhibición del radical DPPH mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición del radical DPPH} = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

Donde:

$A_0$  = Absorbancia del control (metanol)

$A$  = Absorbancia de la muestra

El valor de la capacidad de inhibición del radical DPPH se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de base seca y por 100 gramos de base húmeda ( $\mu\text{moles ET/g bs}$  y  $\mu\text{moles ET/100 g bh}$ ).

## **b. Capacidad de inhibición de radicales $\cdot\text{OH}$ en el ensayo de degradación de 2-deoxi-D-ribosa**

### **1) Preparación de los extractos**

En este ensayo los solventes orgánicos pueden interferir debido a que los radicales hidroxilo reaccionan con la mayor parte de los solventes orgánicos (Chobot 2010), por lo que los extractos metanólicos (EMeOH) se concentraron en rotavapor para eliminar el solvente y fueron resuspendidos con buffer de fosfatos salino, PBS, ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05 M, NaCl 0.15 M) 50 mM, pH 7.4. Así también, los extractos hidrofílicos (EHF) se prepararon con acetona al 70 % en agua y una vez obtenido, se eliminó la acetona en rotavapor para dejar un extracto acuoso. Las decocciones se evaluaron de manera directa.

## 2) Curva de calibración

Se realizó, por triplicado, una solución stock de catequina en PBS a 1 mg/mL, y a partir de ésta se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 10, 20, 50, 80 y 100 µg/mL.

## 3) Medición de la inhibición de degradación de 2-desoxi-D-ribosa

Se llevó a cabo la metodología utilizada por Dorman y col (2003) con algunas modificaciones. El ensayo consistió en mezclar, en tubos de vidrio, 500 µL de extracto (o dilución de catequina), 100 µL de 2-desoxi-D-ribosa 2.8 mM, 200 µL de una solución premezclada de FeCl<sub>3</sub> 100 µM con EDTA 104 µM 1:1 (v/v), 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM y 100 µL de ácido ascórbico 100 µM. Para el blanco se adicionaron 500 µL de PBS 50 mM en lugar de muestra. La mezcla de reacción se agitó y se incubó a 37°C durante 1 hr en baño de agua con agitación constante. Transcurrido este tiempo se le adicionó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 2.8 % (v / v en agua destilada) y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1.0 % (v / v en NaOH 0.05 N) y se sometió a calentamiento en baño de agua durante 20 min a temperatura de 95°C. Para detener la reacción, después de los 20 min, se colocaron las muestras en baño de hielo durante aproximadamente 5 min. Posteriormente, se le adicionaron 2 mL de *n*-butanol, se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 21 °C para separar la fase orgánica de la acuosa. Finalmente la fase orgánica fue leída en espectrofotómetro a 532 nm. El porcentaje de captación de radicales hidroxilo (% CROH) se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de } \bullet OH = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

Donde:

$A_0$  = Absorbancia del control (PBS)

A = Absorbancia de la muestra

Los resultados se reportaron como equivalentes de catequina por gramo de base seca (mg EC/g bs) o por 100 g de base húmeda (mg EC/100 g bh).

### **c. Capacidad de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por cobre**

El ensayo se basó en el método descrito por Loy y col (2002) con modificaciones de Jacobo-Valenzuela (2011), el cual evalúa el efecto antioxidante sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La preparación de los extractos fue similar a la del ensayo de inhibición de la oxidación de 2-deoxi-D-ribosa.

#### **1) Obtención de las lipoproteínas de baja densidad**

Se utilizó suero obtenido de voluntarios sanos mediante punción venosa, recolectado en tubos de plástico sin anticoagulante del sistema Vacutainer. Para la separación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se utilizó el reactivo precipitante de HDL colesterol (marca SPINREACT, Ref: 1001095) y se siguió la metodología de separación de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para lo cual, se adicionaron 100  $\mu$ L de reactivo precipitante por cada mL de suero, se dejó reposar 10 min y se centrifugó a 3000 g durante 10 min para obtener la pastilla de LDL. La cual, después de eliminar el sobrenadante, se solubilizó con buffer de fosfatos (PBS) a pH de 7.4, agregando 1 mL de buffer por cada 100 mg de pastilla de LDL (para una concentración de 0.1  $\mu$ g/mL).

## 2) Curva de calibración

Se realizó por triplicado, una solución stock de Trolox de 1 mg/mL, a partir de la cual se obtuvieron diluciones para concentraciones de 10, 15, 20, 30, 50 y 80 µg/mL.

## 3) Medición de la capacidad de inhibición de oxidación de LDL

En tubos de vidrio, se adicionaron 200 µL de la solución de LDL en buffer de fosfatos salino (para una concentración de 0.2 µg/mL en la mezcla de reacción), seguido de 100 µL de muestra (extracto o dilución de Trolox) y 100 µL de CuSO<sub>4</sub> 0.5 mM, se completó el volumen a 1 mL con PBS. Para el blanco se usó PBS en vez de muestra. La mezcla se agitó en vortex por algunos segundos y se llevó a incubación a 37 °C durante 3 horas con agitación constante. Después de este periodo, se adicionó 1 mL de TCA al 15 % (v / v en agua destilada) y 1 mL de TBA al 0.37 % (v / v en NaOH 0.05 N). Se agitó y se llevó a incubación en baño de agua a 95 °C durante 20 min para la formación del complejo TBA-MDA. Una vez pasada la incubación, se llevó a baño de hielo durante aproximadamente 5 min para detener la reacción. Se adicionaron 2 mL de *n*-butanol y se agitó vigorosamente en vortex. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 24 °C para separación completa de las fases. Una vez obtenida la fase superior, se leyó su absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro (Modelo GENESYS 10 UV, Serie 2H7G229001, USA).

Para la determinación del porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de Oxidación de LDL} = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

A<sub>0</sub> = Absorbancia del control (PBS)

A = Absorbancia de la muestra

Los resultados se reportaron como equivalentes de Trolox por gramo de base seca ( $\mu\text{moles ET/g bs}$ ) o por 100 g de base húmeda ( $\mu\text{moles ET/100 g bh}$ ).

**d. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano) (AAPH)**

La determinación de la actividad anti-hemolítica de los extractos se realizó según la metodología de Aman y col (2013) con algunas modificaciones. Los extractos fueron los mismos que se utilizaron para el ensayo de la degradación de 2-desoxi-D-ribosa.

**1) Obtención de los eritrocitos**

El ensayo de la inhibición de hemólisis eritrocitaria se llevó a cabo usando muestras de sangre de voluntarios sanos. Las muestras de sangre se recolectaron mediante punción venosa en tubos con EDTA. Se centrifugaron a 2500 xg durante 15 min y se descartó el plasma cuidadosamente con pipeta pasteur de vidrio eliminando además la porción leucocitaria. Una vez que se obtuvo la porción eritrocitaria se llevaron a cabo de 3 a 4 lavados de los eritrocitos con 5 volúmenes de buffer de fosfatos salino, PBS 1X, ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl, NaCl, ajustado a pH de 7.4), descartando cada vez el sobrenadante y la capa leucocitaria sobrante. Finalmente, se preparó una suspensión de eritrocitos al 5 % con PBS para el ensayo.

**2) Medición de la capacidad de inhibición de hemólisis**

En tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 0.25 mL de suspensión de eritrocitos al 5 %, 0.25 mL de extracto a diferentes concentraciones y 0.25 mL de AAPH [dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)] 200 mM. La mezcla se

incubó durante 3 horas a 37 °C con agitación constante. Después de la incubación, la mezcla se transfirió a tubos tipo Falcon de 15 mL y se diluyó con 8 volúmenes de PBS. Se centrifugó a 2500 g durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a 540 nm.

Se realizaron los siguientes controles:

- Control de estabilidad de eritrocitos: 0.25 mL de suspensión de eritrocitos con 0.5 mL de PBS.
- Control de estabilidad de los eritrocitos frente a la muestra (negativo): 0.25 mL de suspensión de eritrocitos, 0.25 mL de muestra y 0.25 mL de PBS.
- Control de hemólisis con AAPH: 0.25 mL de suspensión de eritrocitos, 0.25 mL de AAPH y 0.25 mL de PBS.
- Control de hemólisis total (positivo): 0.25 mL de suspensión de eritrocitos y 0.5 mL de agua destilada.
- Antioxidantes de referencia: 0.25 mL de suspensión de eritrocitos, 0.25 mL de antioxidante de referencia (ácido ascórbico o Trolox) y 0.25 mL de AAPH.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de hemólisis} = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

$A_0$  = Absorbancia del control de hemólisis con AAPH

$A$  = Absorbancia de la muestra

El resultado se reportó como % de inhibición de hemólisis.

#### 4. Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó mediante la técnica de Kirby-Bauer (difusión en disco) de acuerdo con la metodología indicada en el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012) y la utilizada por Sharma y Sharma (2010) y Nofouzi y col (2016). Las cepas bacterianas (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) fueron sembradas hasta su fase logarítmica (37°C / 18-20 h), en medio infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés). Se llevó a cabo la preparación de una suspensión del inóculo en PBS 1X ajustando su turbidez a 0.5 del estándar de McFarland ( $1 - 2 \times 10^8$  UFC / mL; %A =  $0.08 \pm 0.1$  a una longitud de onda de 625 nm). Se realizó la inoculación del agar Mueller-Hinton mediante un hisopo estéril previamente humedecido con la solución de bacterias, eliminando el exceso, y se estrió sobre la base del agar abarcando toda la superficie. Se dejó secar por 3-5 min antes de colocar las soluciones a evaluar.

Los extractos a evaluar (EMeOH de HC, R-5 y R-10; y D-5 y D-10) fueron evaporados a sequedad en el caso de los EMeOH, y liofilizados en el caso de las decocciones, y suspendidos en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % en agua estéril. Las soluciones fueron colocadas en discos de papel filtro Whatman No. 3, con un diámetro de 6 mm, previamente esterilizados en autoclave (a 121 °C por 15 min) usando un volumen de 10 µL en cada disco. Se usó como control positivo gentamicina 10 µg/mL y como control negativo DMSO al 10%.

Las cajas inoculadas se dejaron durante algunos minutos después de colocar los discos para permitir que los extractos fueran bien difundidos en el agar, se invirtieron

las cajas Petri y se incubaron a 37°C durante 18 a 20 h. Una vez terminado el periodo de incubación se midieron los halos de inhibición visualmente con ayuda de un vernier. Se consideró zona de inhibición halos mayores a 6 mm.

## **5. Análisis estadístico**

Se empleó estadística inferencial con un diseño completamente al azar a través del análisis de varianza (ANOVA), con un diseño unifactorial. Los resultados se expresaron como promedios de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar. La comparación de medias se determinó mediante la prueba de Fisher (LSD), con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHIC Centurion XVI.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

#### 1. Humedad y cenizas

El contenido de humedad entre la hoja cruda de noni (HC) y los residuos de decocciones de hoja de noni (R-5 y R-10) no tuvieron diferencia estadística significativa. Los resultados se muestran en el **Cuadro 2**. Este valor concuerda con lo reportado por Sudjaroen (2012) para hoja fresca de noni de una región de Tailandia, en donde se reportó un contenido de humedad de 76.56 %; y el de Andarwulan y col (2012) de 85.46 %. Sin embargo, para las decocciones de hoja de noni, D-5 y D-10, el contenido de humedad fue mucho más elevado que las muestras de HC, R-5 y R-10, ya que su composición es mayormente agua. En el caso de R-5 y R-10, no tuvieron diferencia significativa con respecto a HC, lo cual podría indicar que el proceso de decocción no alteró significativamente la estructura / composición de la hoja que le permite retener la humedad. Jabeen y col (2015), reportaron que la humedad de las hojas de té (*Camellia sinensis*), con la que se elabora la bebida de té verde y té negro, cuando son frescas, oscilan entre 70 y 83 %, sin embargo debido a los procesos que anteceden a la elaboración del té, el contenido de humedad puede ser de 60 a 72 %.

El porcentaje de cenizas en R-5 y R-10 fue significativamente menor con respecto a HC, y presentaron diferencia entre ambas, siendo menor a los 10 minutos. Esta diferencia no se observó en las decocciones, ya que no hubo diferencia entre D-5 y D-10. Sudjaroen en 2012, reportó un contenido de cenizas de 1.97 % en hoja

**Cuadro 2.** Contenido de humedad y cenizas de los productos derivados de la hoja de noni.

	<b>% Humedad</b>	<b>% Cenizas</b>
<b>HC</b>	80.6643 ± 1.2563 <sup>b</sup>	2.5395 ± 0.2111 <sup>a</sup>
<b>D-5</b>	99.7964 ± 0.0094 <sup>a</sup>	0.0299 ± 0.0031 <sup>d</sup>
<b>D-10</b>	99.7171 ± 0.0040 <sup>a</sup>	0.0491 ± 0.0047 <sup>d</sup>
<b>R-5</b>	81.6125 ± 0.9479 <sup>b</sup>	1.6257 ± 0.0385 <sup>b</sup>
<b>R-10</b>	81.4414 ± 0.8842 <sup>b</sup>	1.2841 ± 0.0859 <sup>c</sup>

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (Fisher,  $\alpha=0.05$ ). Media de 3 repeticiones ± desviación estándar.

fresca de noni, menor al resultado obtenido en el presente trabajo para HC ( $2.5395 \pm 0.2111$  %). Algunos autores reportan los diferentes factores climáticos, ecológicos o genéticos pueden generar variabilidad en la composición de diferentes cultivares (Sáyago-Ayerdi y col 2014).

Sáyago-Ayerdi y col (2014) realizaron un estudio en cuatro cultivares de flor (cáliz) de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y determinaron que alrededor de 53 - 57 % de las cenizas permanecieron en el residuo de cáliz después de una decocción de 5 minutos. En los residuos de las decocciones de hoja, tanto de 5 como de 10 min (R-5 y R-10), se observó una retención de cenizas de 64.02 % en R-5 y 50.56 % en R-10 con respecto a HC. Esto debido, probablemente, a que un tiempo de decocción más prolongado facilita la salida de componentes minerales al agua de decocción. Estos minerales podrían contener, entre otros, compuestos como  $\text{CaCO}_3$ , KCl y pequeñas cantidades de  $\text{SiO}_2$ , según el estudio de caracterización por difracción de rayos X de cenizas en diferentes partes estructurales de noni, realizado por Garay y col (2011).

El contenido de cenizas en hojas para elaboración de té es un parámetro importante de calidad, como mencionaron Jabeen y col (2015), ya que da indicios de malas prácticas en los procesos y en la adulteración de las hojas con material mineral a fin de mejorar los rendimientos. Estos autores reportaron un contenido de 3.7 % de cenizas en hojas frescas de *Camellia sinensis*, mayor a nuestros resultados para hoja fresca de noni (HC).

## **2. Acidez titulable, pH y sólidos solubles totales**

Los resultados del análisis fisicoquímico se muestran en el **Cuadro 3**. Los datos mostraron un decremento en el porcentaje de acidez titulable (%AT) y de sólidos

**Cuadro 3.** Análisis fisicoquímico de productos derivados de la hoja de noni.

	<b>AT (%)</b>	<b>pH</b>	<b>SST (°Brix)</b>
<b>HC</b>	0.226 ± 0.011 <sup>a</sup>	4.95 ± 0.06 <sup>c</sup>	6.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>D-5</b>	0.001 ± 0.0004 <sup>d</sup>	5.41 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>e</sup>
<b>D-10</b>	0.002 ± 0.0001 <sup>d</sup>	5.31 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>d</sup>
<b>R-5</b>	0.126 ± 0.011 <sup>b</sup>	5.34 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>b</sup>
<b>R-10</b>	0.111 ± 0.005 <sup>c</sup>	5.63 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>c</sup>

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min, AT: acidez titulable.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (Fisher,  $\alpha=0.05$ ). Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

solubles totales (SST) en las decocciones y en los residuos con respecto a la hoja cruda. Asimismo, el pH tuvo un aumento significativo en las decocciones y las hojas residuo con respecto a la hoja cruda.

Los valores de SST de las decocciones resultaron similares a los reportados por Gamboa-Gómez y col (2017) en infusiones de hojas de roble (*Quercus convallata* y *Quercus arizonica*), 0.1 °Brix. Resultados similares a los obtenidos para las decocciones de hoja de noni,  $0.1 \pm 0.0$  y  $0.2 \pm 0.0$  °Brix para D-5 y D-10, respectivamente. Entre los dos tiempos de decocción se obtuvieron diferencias significativas, lo cual sugiere que un mayor tiempo de contacto con el agua, los sólidos solubles aumentan en la decocción. En cuanto a R-5 y R-10, se observó un menor nivel de los SST con respecto a la HC, teniéndose un mayor contenido en R-5 que en R-10, lo que corresponde a lo determinado para sus respectivas decocciones. Por otro lado, en el mismo estudio de Gamboa-Gómez y col (2017), se reportó un pH de 6.02 y 5.42 para las infusiones de diferentes hojas de roble, con un % AT de 3.0 y 2.7, respectivamente. Resultados similares de pH se obtuvieron en D-5 y D-10, sin embargo para % AT, los resultados fueron más bajos, reflejando un bajo contenido de ácidos en las decocciones. Los valores de pH aumentaron después del proceso de decocción, obteniéndose aumento significativo en decocciones y hojas residuo con respecto a la hoja cruda.

## **C. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA**

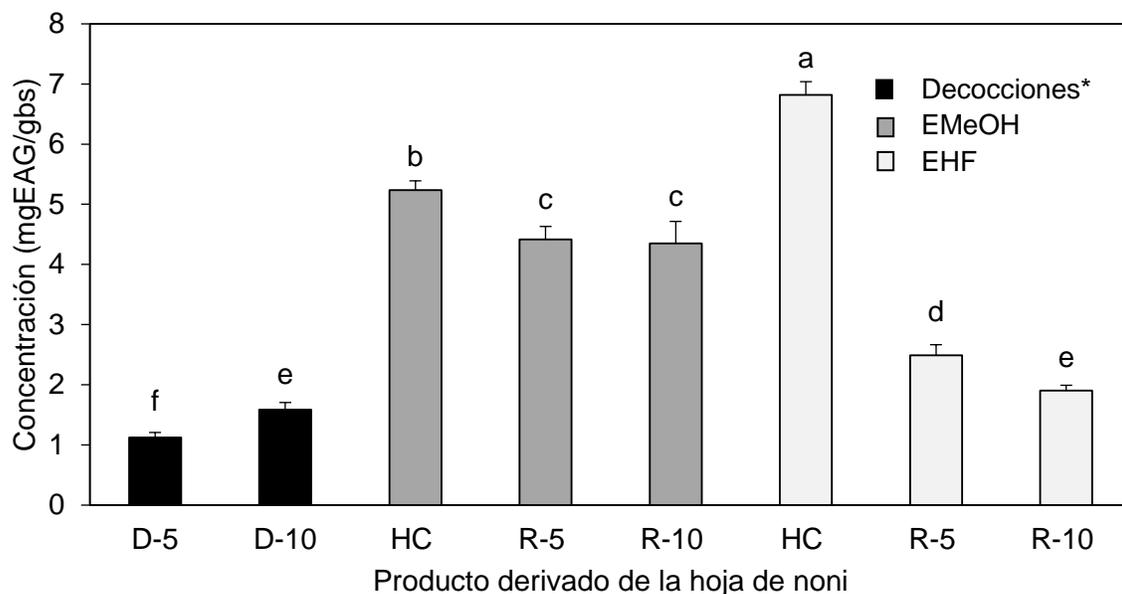
### **1. Compuestos fenólicos totales**

Se determinó la composición de compuestos fenólicos totales (CFT) de los extractos metanólicos e hidrofílicos de HC, R-5 y R-10, así como de las decocciones

D-5 y D-10 y los resultados se muestran en la **Figura 4**. En base seca, el contenido más alto se presentó en el EHF de HC, presentándose el contenido en el siguiente orden descendente HC EHF > HC EMeOH > R-5 EMeOH = R-10 EMeOH > R-5 EHF > R-10 EHF = D-10 > D-5. Teniendo en cuenta que los solventes usados para los diferentes extractos de HC, R-5 y R-10 tienen distinta polaridad, puede notarse que, para HC, el EHF tuvo mayor contenido de CFT ( $6.82 \pm 0.21$  mgEAG/g bs) que su EMeOH ( $5.24 \pm 0.15$  mgEAG/ g bs) correspondiente. Sin embargo, además de la polaridad, la obtención de los EHF fue el segundo proceso después de una extracción lipofílica (con una mezcla de hexano:diclorometano 1:1 v/v), por lo que puede suponerse que ya no existen compuestos hidrofóbicos que podrían interferir en la medición de CFT (los cuales son mayormente hidrofílicos), como en el caso de EMeOH donde puede haber una mezcla de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos.

En R-5 y R-10, los EHF ( $2.49 \pm 0.18$  y  $1.90 \pm 0.09$  mgEAG/g bs, respectivamente) tuvieron menor contenido que sus correspondientes EMeOH ( $4.42 \pm 0.21$  y  $4.35 \pm 0.37$  mgEAG/g bs, respectivamente). D-10 presentó un contenido de CFT de  $1.58 \pm 0.12$  mgEAG por gramo de liofilizado usado para la elaboración de la decocción (recordando que se usaron 2 g de HC liofilizada por cada 250 mL de agua, o bien, 0.8 g por 100 mL), correspondiéndose el contenido del EHF de R-10, que resultó menor que R-5. Caso similar ocurrió en D-5 ( $1.12 \pm 0.09$  mgEAG por gramo de liofilizado), que fue menor que D-10, correspondiendo a un mayor contenido residual de compuestos fenólicos en R-5.

Las bebidas herbales son populares por los efectos beneficiosos sobre la salud, lo cual se ha asociado a los compuestos fenólicos (Rocha-Guzmán y col 2012). Sin



**Figura 4.** Compuestos fenólicos totales de productos derivados de la hoja de noni. HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico. \*Representa el contenido por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

embargo, la forma de preparación puede influir en gran medida en la composición final del extracto (Fotakis y col 2016). La decocción de la hoja de noni tuvo un mayor contenido de CFT a los 10 minutos que a los 5 minutos, lo cual podría ser debido al mayor tiempo de contacto con el agua, mejorando la migración de los CFT.

Fotakis y col (2016), estudiaron las diferencias entre infusiones (15 min) y decocciones a diferentes tiempos (2 y 15 min), de diez hojas de plantas; determinaron que la mayoría de las hojas tuvo un mayor contenido de CFT en las infusiones, sólo dos de ellas tuvieron el mayor contenido en las decocciones de 15 minutos; sin embargo, entre las dos decocciones, la mayoría de las de 15 min, resultaron con un mayor contenido de CFT, lo cual atribuyeron a que el tratamiento térmico más prolongado pudo liberar una mayor cantidad de estructuras aglicona. Esto también explicaría un mayor contenido en D-10 con respecto a D-5. Los CFT en D-5 y D-10 (que para fines comparativos en términos de base seca serían  $4.40 \pm 0.33$  y  $6.23 \pm 0.47$  mgEAG/g bs, respectivamente) fueron menores a infusiones de hojas de roble (*Quercus*), estudiadas por Sánchez-Burgos y col (2013), en donde obtuvieron un rango de 6.98 a 17.26 mgEAG/g bs, y a infusiones de té verde (*Camellia sinensis*) de 33.00 a 90.27 mgEAG/gbs (Erturk y col 2010). Además, ambas decocciones también resultaron en menor contenido de CFT que en el estudio de Serafini y col (2011) en decocciones de hoja de noni durante 15 minutos, donde se cuantificaron 196.8 mgEAG/g bs, y se identificaron rutina, derivados de quercetina y kaempferol por HPLC.

Los compuestos fenólicos totales en HC, en ambos extractos (EMeOH y EHF), resultaron mayores a lo reportado en hoja de noni por Andarwulan y col (2012)

(72.72 mg/100 g bh), donde además determinaron ácidos fenólicos y flavonoides, entre los que encontraron ácidos clorogénico y ferúlico, quercetina y kaempferol. También Zin y col (2006), determinaron los CFT en hojas de noni, obteniendo 0.81 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra seca en extractos etanólicos, mucho menor al obtenido en el presente trabajo en ambos extractos de HC.

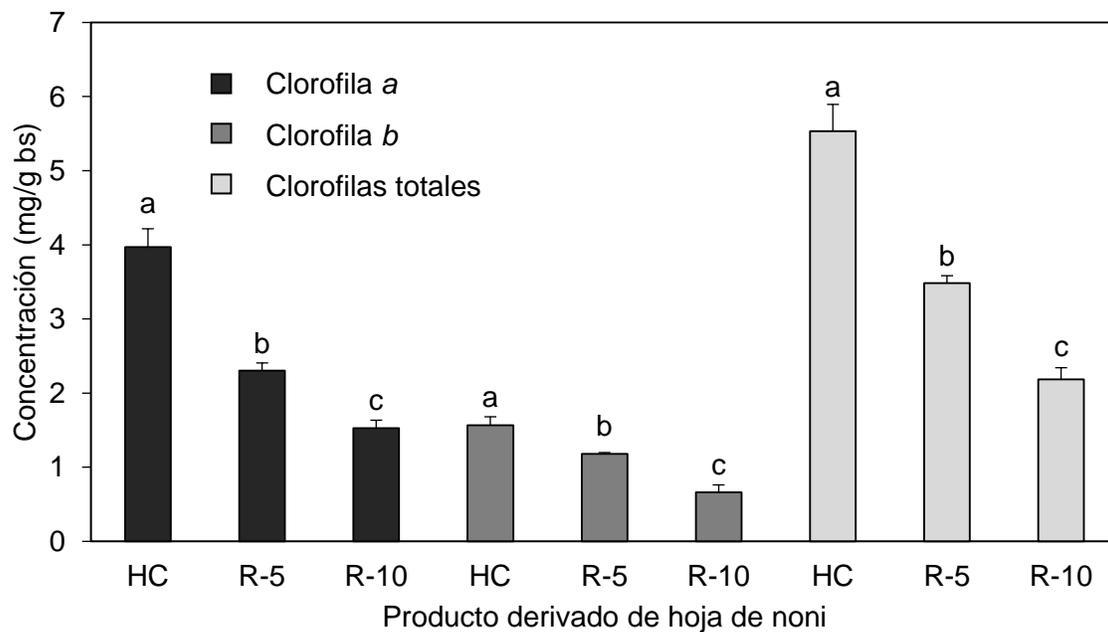
Se sabe que la mayoría de los compuestos fenólicos son solubles en agua, pero pueden degradarse con procesos térmicos muy severos (Chrpova y col 2010; da Silveira y col 2014). En este estudio, EMeOH y EHF de R-5 y R-10 tuvieron un decremento después de las decocciones, ya que una parte de los CFT son lixiviados hacia el agua de decocción. Esto fue más claro en los EHF, ya que ambos fueron más bajos que HC y aparentemente ocurrió mayor lixiviación con un proceso de decocción más prolongado. En EMeOH, estas diferencias no resultaron tan claras, ya que aunque fueron menores que HC, no presentaron diferencia significativa entre ambos (R-5 y R-10) y tuvieron mayor contenido que los EHF. Esto puede deberse a que el solvente de extracción (MeOH puro) de estos extractos, podría extraer más tipos de compuestos no fenólicos y, como señalan algunos autores, la prueba para medir compuestos fenólicos totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu no es una prueba específica y puede detectar otros compuestos que no son fenólicos (Zin y col 2006). Además, es probable que la afectación del metanol rompa la membrana de las células y esto mejore la extracción (Garrido y col 2013). Kao y col (2014) observaron el efecto de diferentes tiempos de ebullición sobre 4 vegetales de hoja, en dos de los cuales observaron un decremento continuo de los CFT. Sin embargo, en los otros dos hubo un aumento en los primeros minutos, pero decrecieron a

medida que se aumentó el tiempo en ebullición. Caso similar ocurrió en EHF de R-5 y R-10, el tiempo más prolongado provocó disminución del contenido de CFT. Ferracane y col (2008) señalan que en fases iniciales del tratamiento térmico pueden liberarse los compuestos fenólicos por modificaciones en la matriz vegetal e inactivarse la polifenoloxidasas, pero después ocurre degradación de tales compuestos.

## **2. Clorofilas a, b y totales**

No se detectó la presencia de clorofilas en las decocciones, esto pudo ser debido a que las clorofilas son altamente sensibles a procesos térmicos y a su naturaleza en parte lipofílica, por la presencia en su estructura de una cadena esterificada de fitol (Taiz y Zeiger 2002; Kang 2018), por lo que no se solubilizan fácilmente en agua. La **Figura 5** contiene los resultados de clorofilas medidas espectrofotométricamente. En el caso de HC, se determinó un valor de clorofilas totales de  $5.53 \pm 0.36$  mg/g bs que resultó de la suma del contenido de clorofila *a* ( $3.97 \pm 0.25$  mg/g bs) y clorofila *b* ( $1.57 \pm 0.11$  mg/g bs). Sin embargo, en la literatura comúnmente pigmentos como clorofilas y carotenoides se reportan en peso fresco (en 100 gramos de muestra fresca), para HC los valores anteriores corresponden a  $107.02 \pm 6.93$ ,  $76.72 \pm 4.77$  y  $30.29 \pm 2.17$  mg/100 g de base húmeda (bh), respectivamente para cada uno de los parámetros anteriores.

El contenido de clorofilas totales de HC fue menor al reportado por Znidarcic y col (2011) para cinco diferentes vegetales de hoja que son consumidos comúnmente en



**Figura 5.** El contenido de clorofilas en productos derivados de la hoja de noni. HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. ND: No detectado. El valor de clorofilas totales representa la suma de las clorofilas (*a* y *b*) individuales. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

los países mediterráneos, los cuales variaron dentro de un rango de 200.44 a 359.62 mg/100 g de peso fresco y con una relación clorofila *a* /*b* de 2.57. Se presentó similitud con los valores de la relación clorofila *a*/*b*, que en HC fue de 2.53. Sin embargo, para otros vegetales las concentraciones de clorofilas pueden variar. Mou (2005) reportó valores desde 4.69 a 109.28 mg/100 g bh para ocho diferentes variedades de lechuga.

En extractos de R-5 y R-10, fue evidente una pérdida significativa de clorofilas *a*, *b* y totales. Los procesos térmicos extremos, como el proceso de decocción a 100 °C, da lugar a la degradación de clorofilas resultando en derivados libres de  $Mg^{2+}$ , tales como las feofitinas, que provocan una decoloración del verde brillante de las hojas a tonos marrón-olivo (Kang y col 2018). Además, según los resultados, hubo mayor degradación de clorofilas a los 10 minutos de decocción, ya que R-10 fue significativamente menor que R-5 para clorofilas totales, clorofila *a* y clorofila *b*; dando lugar a pérdida de clorofilas totales del 37 y el 60 % en R-5 y R-10, respectivamente.

Las clorofilas son los pigmentos más abundantes en los vegetales, y pueden traer beneficios a la salud debido a que son moléculas con gran potencial antioxidante. Aunque se ha reportado su efecto pro-oxidante debido a la transferencia de energía del oxígeno singulete para formar especies reactivas de oxígeno (Lanfer-Marquez y col 2005). Asimismo, se ha reportado que las clorofilas, así como sus derivados feofitinas pueden brindar un efecto protector a aceites vegetales comestibles almacenados en oscuridad evitando sus auto-oxidación

(Lanfer-Marquez y col 2005). Esto sugiere que la actividad antioxidante de vegetales verdes podría atribuirse también a las clorofilas presentes.

## **2. Carotenoides totales**

Los resultados de carotenoides totales se pueden observar en el **Cuadro 4**. El contenido de CT en HC, de  $83.98 \pm 2.82$  mgE $\beta$ -car/100 g bh, resultó mayor que el obtenido para hoja de noni por Aalbersberg y col (1993), quienes cuantificaron 12.40 mg de carotenoides/100 g bh, así como los resultados obtenidos por Tee y Lim (1991) quienes cuantificaron CT espectrofotométricamente y por HPLC en hoja de noni, obteniendo valores de 7.05 y 12.27 mg/100 g bh, para cada uno de los métodos respectivamente.

Por otro lado, el contenido de carotenoides totales en base seca fue de  $4.34 \pm 0.15$ ,  $7.96 \pm 0.09$  y  $6.91 \pm 0.18$  mgE $\beta$ -car/g de muestra de HC, R-5 y R-10, respectivamente, con diferencia significativa entre las tres muestras.

En vegetales verdes y de hoja, los carotenoides se localizan en las membranas tilacoides de los cloroplastos incorporados en complejos con proteínas, lo cual dificulta la extractabilidad de los carotenos de la matriz vegetal (Bernhardt y Schilch 2006). Sin embargo, algunos estudios indican que el procesamiento de alimentos puede ayudar a liberar los carotenoides de la matriz alimentaria, ya que se puede romper la pared celular y ocurrir desnaturalización de aquellas proteínas que se encuentran formando complejos con los carotenoides (Inácio-Alves y col 2013).

Con este argumento, suponemos que el proceso térmico que ocurrió durante la decocción de la hoja, pudo aumentar la extractabilidad de los carotenoides en los

**Cuadro 4.** El contenido de carotenoides totales de productos derivados de la hoja de noni.

	<b>Carotenoides totales</b>	
	(mgE $\beta$ -car/g bs)	(mgE $\beta$ -car/100 g bh)
<b>HC</b>	4.34 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	83.98 $\pm$ 2.82
<b>D-5</b>	ND	ND
<b>D-10</b>	ND	ND
<b>R-5</b>	7.96 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	146.44 $\pm$ 1.69
<b>R-10</b>	6.91 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	128.26 $\pm$ 3.38

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min.

ND: No detectado.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

residuos de decocciones de hoja obteniéndose una mayor concentración de los mismos. Sin embargo, también podría ocurrir cierto grado de degradación a tiempos más prolongados de ebullición (Lu y col 2018), obteniéndose menor contenido de CT, como se observó en R-10. A pesar de ello, ambas hojas residuo, R-5 y R-10 tuvieron un contenido significativamente mayor de carotenoides totales con respecto a HC.

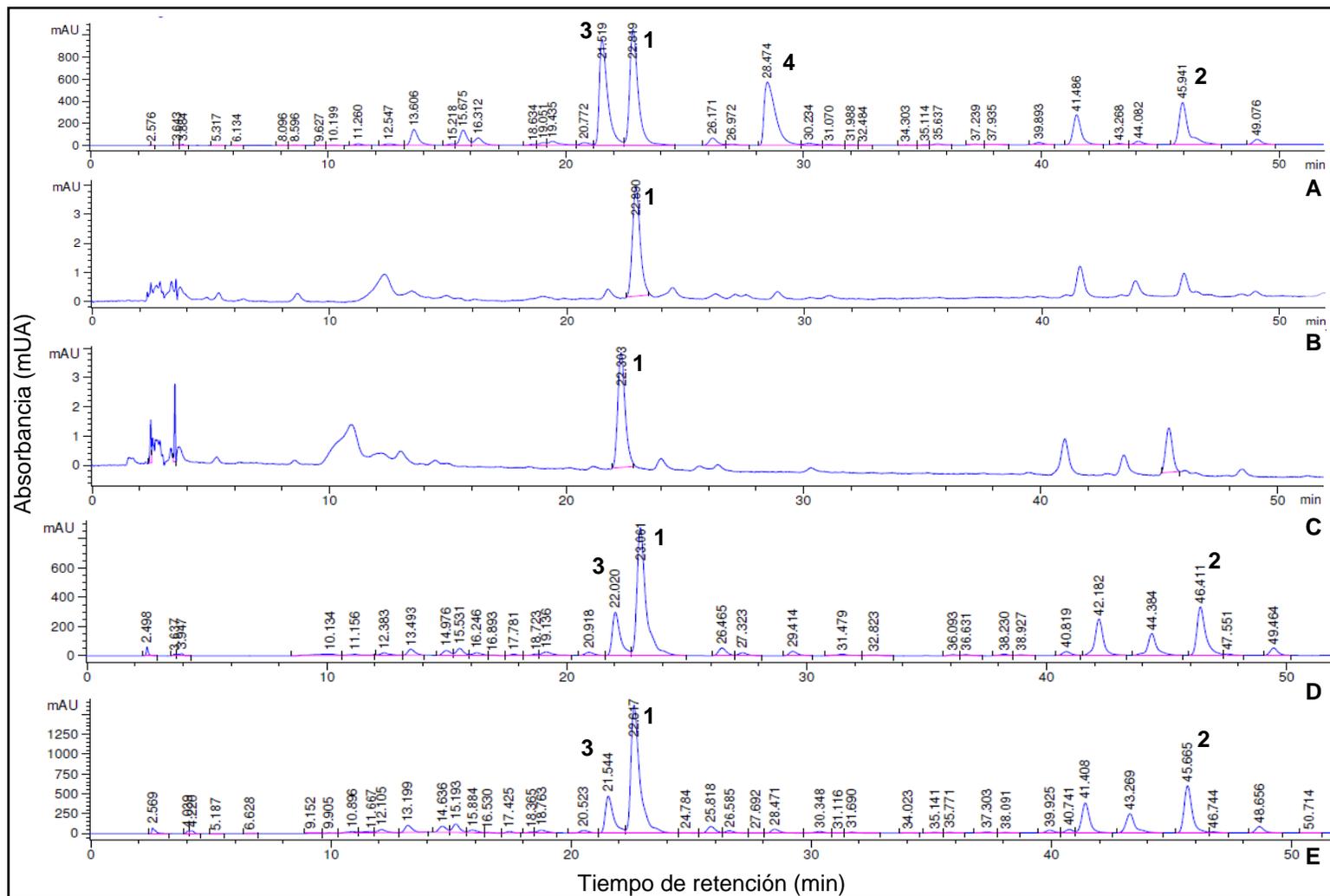
Aunque el tratamiento con calor puede ayudar la liberación de carotenoides (Sanchez y col 2014), no se logró observar presencia de carotenoides totales en las decocciones medidas espectrofotométricamente. Esto debido a la naturaleza mayormente lipofílica de estos compuestos.

Algunos estudios han demostrado que diferentes tratamientos térmicos pueden ayudar a mejorar el contenido de carotenoides en productos vegetales, además de lograr mayor biodisponibilidad. Kao y col (2014) concluyeron que en vegetales de hoja verde, sometidos a ebullición en agua a diferentes tiempos de cocción, se obtuvo un mayor contenido de carotenoides en hojas de cilantro, de camote y de albahaca tailandesa con respecto a muestras frescas. Sin embargo, dependiendo de la matriz vegetal, a mayores tiempos de ebullición, la concentración de carotenoides fue menor. En hojas de camote, a los 5 minutos de ebullición, la concentración de carotenoides totales fue mayor que a 10 minutos. En el presente trabajo, en R-10 se observó una menor cantidad de CT con respecto a R-5. Además, se ha demostrado que en otros vegetales ricos en carotenoides, como la zanahoria, la cocción puede aumentar la respuesta plasmática de  $\beta$ -caroteno y la biodisponibilidad *in vitro* (Hedren y col 2002).

Cabe señalar que los extractos para la determinación tanto de carotenoides totales como individuales del presente trabajo no fueron saponificados. A pesar de que la literatura reporta que el paso de saponificación es importante para remover los lípidos y clorofilas, así como para hidrolizar ésteres de carotenoides, algunos autores han indicado que este paso extiende el tiempo del análisis y puede provocar formación de artefactos y degradación de carotenoides y que la saponificación debería incluirse en la metodología de extracción sólo cuando sea necesario, ya que algunas muestras, como los vegetales de hoja, tienen un bajo contenido de lípidos y de ésteres de carotenoides; asimismo, las clorofilas pueden ser identificadas durante los análisis cromatográficos (Rodríguez-Amaya y col 2008). Debido a que en análisis preliminares de este estudio no se observó diferencia considerable entre extractos saponificados y no saponificados, se decidió no saponificar.

### **3. Carotenoides individuales**

En la **Figura 6** se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC para la identificación y cuantificación de carotenoides en las muestras de HC, D-5, D-10, R-5 y R-10. En HC, se identificaron 23 compuestos con espectros de absorción característicos de estructuras de carotenoides y 12 con espectros de absorción característicos de clorofilas (**Cuadro 5**). Sin embargo, sólo se cuantificaron  $\beta$ -caroteno y luteína ya que se contó con sus estándares y los cuales fueron los carotenoides encontrados en mayor cantidad en las muestras.



**Figura 6.** Cromatogramas obtenidos por HPLC de productos derivados de hoja de noni. (A) HC: Hoja cruda, (B) D-5: Decocción de 5 min, (C) D-10: Decocción de 10 min, (D) R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y (E) R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. (1) Luteína, (2)  $\beta$ -caroteno, (3) clorofila *b* y (4) clorofila *a*.

Se muestran los cromatogramas detectados con longitud de onda de 452 nm para HC, R-5 y R-10; y de 447 nm para D-5 y D-10.

**Cuadro 5.** Espectros de absorción de compuestos detectados e identificados en la hoja cruda de noni (HC) mediante cromatografía de líquidos de alta presión.

No. de pico	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	Tipo de compuesto
1	8.096	472, 654	D-Clrf
2	8.596	420, 435, 666	D-Clrf
3	9.549	427, 657	D-Clrf
4	10.199	410, 410, 459, 666	D-Clrf
5	11.260	410, 430, 459, 666	D-Clrf
6	12.547	415, 439, 470	D-Cart
7	13.606	419, 442, 471	D-Cart
8	15.218	410, 434, 461	D-Cart
9	15.675	415, 439, 467	D-Cart
10	16.312	402, 424, 451	D-Cart
11	18.634	334*, 427, 444, 471	D-Cart
12	19.051	424, 447, 474	D-Cart
13	19.435	423, 446, 475	D-Cart
14	20.772	418, 441, 469	D-Cart
15	21.519	470, 651	Clorofila <i>b</i>
16	22.819	423, 447, 476	Luteína
17	26.171	428, 454, 481	D-Cart
18	26.972	417, 444, 471	D-Cart
19	28.474	435, 665	Clorofila <i>a</i>
20	30.234	385, 417, 435, 666	D-Clrf
21	31.070	439, 665	D-Clrf
22	31.988	421, 440, 476	D-Cart
23	32.484	443, 655	D-Clrf
24	34.303	416, 440, 477	D-Cart
25	35.114	421, 441, 471	D-Cart
26	35.637	420, 445, 470	D-Cart
27	37.239	421, 441, 471	D-Cart
28	37.935	417, 665	D-Clrf
29	39.893	425, 449, 477	D-Cart
30	41.486	422, 442, 471	D-Cart
31	43.268	375, 416, 438	D-Cart
32	44.082	430, 454, 481	D-Cart
33	45.941	424, 449, 477	β-caroteno
34	46.028	412, 666	D-Clrf
35	49.076	426, 449, 475	D-Cart

D-Clrf: Derivado de clorofila, D-Cart: Derivado de carotenoide, \*pico *cis*.

El contenido de  $\beta$ -caroteno en nuestras muestras de HC fue de  $46.47 \pm 2.66$  mg/100 g bh, y fue comparable con el obtenido por Sodjaroen (2012) dentro de un estudio realizado sobre diferentes plantas locales de Tailandia, en donde se obtuvieron 45.78 mg de  $\beta$ -caroteno/100 g bh en hoja de noni. Por otro lado, resultó mayor al reportado por Tee y Lim (1991), de 3.108 mg/100 g bh. La diferencia en el contenido de carotenoides en hojas de noni puede deberse a varios factores, como las diferentes condiciones en que se realizó la cosecha, edad de las hojas, estación del año, factores ambientales o condiciones de extracción y cuantificación (Raju y col 2007). El contenido de luteína en HC ( $32.79 \pm 2.55$  mg/100 g bh), fue hasta 3.6 veces mayor que el reportado por Tee y Lim (1991) en hoja de noni (8.84 mg/100 g bh).

El contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína en hoja de noni (HC), resultó mayor que otras fuentes vegetales conocidas como fuentes ricas de estos carotenoides reportadas en literatura, tales como zanahoria (6.15 mg de  $\beta$ -caroteno/100 g bh; 0.51 mg de luteína/100 g bh) y espinaca (5.79 mg de  $\beta$ -caroteno/100 g bh; 4.42 mg luteína/100 g bh) (Vargas-Murga y col 2016).

Así como ocurrió con el contenido de carotenoides totales, el contenido de luteína y de  $\beta$ -caroteno, fue mayor en los residuos de decocciones de hoja, en R-5 y R-10 respecto a HC, pero sin diferencia significativa entre ambos residuos (**Cuadro 6**).

El hecho de que haya ocurrido un aumento en el contenido de carotenoides en R-5 y R-10 podría deberse también a que durante el proceso de decocción, los sólidos hidrosolubles son lixiviados hacia el agua de decocción, presentándose un fenómeno

**Cuadro 6.** El contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína identificados por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) en productos derivados de la hoja de noni.

	$\beta$ -caroteno		Luteína	
	(mg/g bs)	(mg/100 g bh)	(mg/g bs)	(mg/100 g bh)
<b>HC</b>	2.40 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	46.47 $\pm$ 2.66	1.70 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	32.79 $\pm$ 2.55
<b>D-5</b>	ND	ND	NC	NC
<b>D-10</b>	ND	ND	NC	NC
<b>R-5</b>	3.53 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	64.88 $\pm$ 6.83	2.02 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	37.13 $\pm$ 0.58
<b>R-10</b>	3.57 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	66.22 $\pm$ 3.80	1.91 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	35.46 $\pm$ 1.68

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de 5 min y R-10: Residuo de decocción de 10 min. ND: No detectado, NC: No cuantificable. Las longitudes de onda de cuantificación fueron 452 y 447 nm para  $\beta$ -caroteno y luteína, respectivamente.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

de concentración de los compuestos liposolubles en los residuos de hoja. Es por ello, que la concentración aumentada tanto de  $\beta$ -caroteno como de luteína, reafirman los resultados espectrofotométricos para carotenoides totales, en donde se sugirió que el sometimiento a un tratamiento térmico podría mejorar la extractabilidad de algunos carotenoides. Estos resultados pueden ser debido a que el tratamiento térmico provoca la degradación de paredes celulares y de compartimentos intracelulares, liberando así las sustancias antioxidantes (Lutz y col 2011), siendo tal vez la matriz estructural de la pared celular un importante factor en el control de la capacidad de las células para mantener la integridad de los fitoquímicos (Burns y col 2003). Por lo que se podría atribuir el mayor contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína en R-5 y R-10 al proceso de decocción.

Aunque los carotenoides de hortalizas de hoja tienen bajo grado de absorción, en comparación con los de frutos o más aún, con carotenoides sintéticos, son los de mayor contribución de carotenoides en la dieta humana (Saini y col 2015). A pesar de ello, se ha indicado que diferentes procesamientos, entre ellos el proceso de decocción en agua, pueden ayudar a liberar los carotenoides de la matriz alimenticia y hacerlos más accesibles para su absorción en el sistema digestivo (Hedrén y Svanberg 2002). Un aumento de 27 % en la accesibilidad de  $\beta$ -caroteno de pulpa de zanahoria en un método de digestión *in vitro*, después de un proceso de ebullición en agua fue reportado por Hedrén y Svanberg (2002). Tras el proceso de decocción, R-5 y R-10 no tuvieron diferencia significativa entre ambos en el contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína, pero sí se presentó un aumento de aproximadamente 1.4 y 1.2 veces de  $\beta$ -caroteno y luteína, respectivamente, en comparación con la hoja cruda.

La luteína tiene un papel importante en el organismo, principalmente debido a que previene el daño ocasionado por la luz azul que ingresa en el ojo, la degeneración macular relacionada con la edad y la formación de cataratas (Krinsky y Johnson 2005). Al igual que el  $\beta$ -caroteno, el contenido de luteína fue alto en HC respecto a otras fuentes vegetales. A pesar de que los carotenoides no son compuestos que presentan alta solubilidad en agua, las xantofilas presentan solubilidad parcial debido a los átomos de oxígeno en su estructura, por lo que se podría esperar la migración de xantofilas, como la luteína, hacia el agua de las decocciones (Loranty y col 2010). En el caso de las decocciones de hoja de noni, tanto en las de 5 min como en las de 10 min, se pudo observar la presencia de luteína en los resultados obtenidos por HPLC. Sin embargo, las concentraciones en ambos casos estuvieron por debajo del límite de cuantificación. Loranty col (2010) determinaron, en un estudio de pigmentos lipofílicos, que en infusiones de 25 plantas probadas, sólo la luteína pudo solubilizarse en el agua en un rango del 0 al 10.5 %, atribuyendo este resultado a la baja solubilidad de la luteína, tanto en agua fría o caliente, a las diferencias estructurales de la matriz del material de cada muestra y a otros fitoquímicos que pueden aumentar o disminuir la solubilización de la luteína.

Así como el  $\beta$ -caroteno, la luteína también fue significativamente mayor en su contenido en R-5 y R-10. Otros autores han reportado mayor cantidad en el contenido de luteína en vegetales de hoja después de ebullición en agua. Pasaporte y col (2014) determinaron un aumento de más de 200 % en el contenido de luteína en hojas de moringa (*Moringa oleífera*) después del sometimiento en ebullición

durante 15 min. Atribuyendo estos resultados a la degradación de enzimas oxidantes de carotenoides que se produce durante el proceso térmico, a la liberación de carotenoides de los complejos proteínicos o a la estabilidad de la luteína al calor. Liu y col (2007) reportaron que el contenido de luteína en hojas de *Sauropus androgynus* (consumida popularmente en el Sureste de Asia) aumentó 28 % después de ebullición durante 20 min, mientras que no se detectó luteína en el agua de cocción.

El  $\beta$ -caroteno es el precursor principal de la vitamina A, necesaria para el funcionamiento normal del sistema visual, la función inmune, la integridad de las células epiteliales y el crecimiento, desarrollo y reproducción (FAO 2004). Ya que la molécula de la vitamina A (retinol) es la mitad de la molécula de  $\beta$ -caroteno, pero con una molécula de agua añadida al final de la cadena (De Carvalho y col 2013), su actividad se expresa como equivalentes de retinol (ER), considerándose que 1  $\mu$ g de retinol es equivalente a 6  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno. En el **Cuadro 7** se muestran los ER para las muestras de HC, R-5 y R-10, así como la contribución al consumo diario recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (en el cuadro se muestra el consumo de referencia de 600  $\mu$ g ER por día, que corresponde al requerimiento de un hombre adulto), y la contribución al consumo diario recomendado de luteína por la Asociación Americana de Optometría (American Optometric Association) de 10 mg/día (Pasaporte y col 2014).

Además de  $\beta$ -caroteno y luteína, se identificaron las clorofilas *a* y *b* (**Figura 6**) utilizando sus espectros de absorción, siendo las longitudes de onda máximas para

**Cuadro 7.** Cantidad del consumo diario recomendado de luteína y equivalentes de retinol en 10 gramos de muestra fresca de productos derivados de la hoja de noni.

<b>10 g de muestra bh proporcionan</b>				
	Luteína (mg)	% del nivel diario recomendado de luteína <sup>a</sup>	*ER (µg)	% del nivel diario recomendado de ER <sup>b</sup>
<b>HC</b>	3.28	32.79	774.50	129.08
<b>D-5</b>	NC	-	ND	-
<b>D-10</b>	NC	-	ND	-
<b>R-5</b>	3.713	37.13	1081.33	180.22
<b>R-10</b>	3.546	35.46	1103.67	183.95

<sup>a</sup>10 mg / día para luteína y <sup>b</sup>600 µg ER / día.

NC: No cuantificable

ND: No detectado

\*ER: Equivalentes de retinol

clorofila *a* de 435 y 665 nm, y las de clorofila *b* de 470 y 651 nm. Ambas clorofilas se identificaron en HC, sin embargo, en R-5 y R-10 el pico de clorofila *b* fue menor con respecto a HC, y el pico de clorofila *a* no se identificó. Esto se debe a que, como ya se mencionó, la clorofila es altamente sensible a altas temperaturas y se degrada fácilmente (Kang y col 2018). En D-5 y D-10 no se identificaron clorofilas.

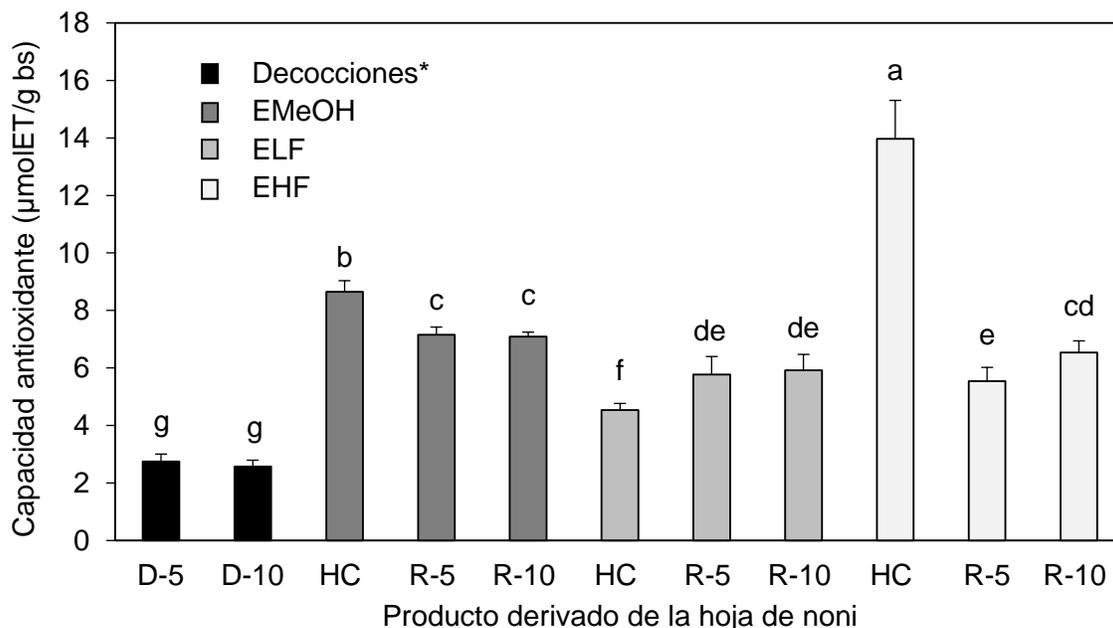
## **D. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

### **1. Capacidad de inhibición del radical DPPH**

En la **Figura 7** se presentan los resultados obtenidos para el ensayo de inhibición del radical DPPH de decocciones de hoja de noni y de tres tipos de extractos (EMeOH, ELF y EHF) de HC, R-5 y R-10. Se puede observar que el extracto que tuvo la mayor inhibición del radical fue el EHF de HC seguido por el EMeOH de HC.

En cuanto a los residuos de decocciones de hoja, R-5 y R-10 de los EMeOH no tuvieron diferencia significativa entre ellos, y tuvieron menor capacidad antioxidante que HC del mismo tipo de extracto. Asimismo, R-5 y R-10 de EHF resultaron en menor capacidad antioxidante que HC del mismo tipo de extracto. Por el contrario, en los ELF, la muestra que tuvo la menor capacidad de inhibición del radical fue la HC, mientras que R-5 y R-10 no tuvieron diferencia significativa.

La capacidad de inhibición del radical DPPH de decocciones, EMeOH y EHF, se relacionó con el contenido de CFT. En ambos ensayos, se observó una tendencia entre su contenido de CFT y su capacidad de inhibición del radical. El EHF de HC, que tuvo el mayor contenido de CFT, también fue el mayor inhibidor de DPPH. El EMeOH de HC tuvo menor capacidad antioxidante que el EHF pero se observó una



**Figura 7.** Capacidad de inhibición del radical DPPH de productos derivados de la hoja de noni. HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. EMeOH: Extracto metanólico, ELF: Extracto lipofílico, EHF: Extracto hidrofílico. \*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

tendencia similar en cuanto a CFT con las otras muestras. R-5 y R-10 de EMeOH no tuvieron diferencia significativa, similar a su contenido de CFT. Además, resultaron menores que HC del mismo extracto. En cuanto los EHF de R-5 y R-10 presentaron diferencias significativas, pero no con la misma tendencia que su contenido de CFT, ya que R-10, el cual tuvo menor contenido de CFT, resultó en mayor capacidad antioxidante que R-5.

A pesar de que no se midió el contenido de CFT de los ELF (ya que se considera a los compuestos fenólicos de naturaleza hidrofílica), su capacidad de inhibición de radical DPPH podría estar relacionada con su contenido de carotenoides. Puede notarse que R-5 y R-10 de este tipo de extractos resultó en mayor capacidad antioxidante que HC. Esto coincide con su contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína, que resultaron más elevados en los residuos de decocciones hoja que en la hoja cruda de noni. El  $\beta$ -caroteno presenta capacidad de eliminación de radicales libres, tales como el DPPH a bajas concentraciones (Sen-Gupta y Gosh 2013); así como la luteína, lo cual puede atribuirse a su estructura no sólo de dobles enlaces conjugados, sino a los grupos hidroxilo terminales que le proporcionan un alto efecto antioxidante (Sindhu y col 2010).

Por otro lado, aunque D-10 presentó mayor contenido de CFT que D-5, no hubo diferencia significativa en su capacidad de inhibición de DPPH. West y col (2009) evaluaron la capacidad de inhibición de DPPH en infusiones de hoja seca de noni, obteniendo un 81.6 % de inhibición del radical, esto fue mucho más alto que lo determinado en el presente trabajo para D-5 y D-10, que fue de 24.9 y 23.1 % de inhibición, respectivamente (lo que corresponde a  $10.81 \pm 1.01$  y  $10.12 \pm 0.86$

$\mu\text{mol ET/g}$  en base seca, respectivamente). Esta diferencia puede deberse al método de preparación en ambos casos, ya que en el estudio de los autores mencionados, se llevó a cabo un proceso de infusión (sin ebullición continua) y un secado previo de la hoja, lo cual podría haber elevado la cantidad de flavonoles agliconas, aumentando la capacidad antioxidante en las infusiones. Deng y col (2011), sugirieron que después de un proceso térmico de secado en las hojas de noni, se pueden degradar glucósidos de flavonoles por termohidrólisis a sus correspondientes agliconas, lo cual podría aumentar su bioactividad.

Pese a que existen coincidencias entre el contenido de CFT y la capacidad de inhibición del radical DPPH, los compuestos individuales pueden presentar distinta capacidad antioxidante, ya que esta depende de factores como la estructura del compuesto antioxidante y de los mecanismos de acción involucrados (Zin y col 2006). Se ha demostrado que distintas fracciones cromatográficas de extractos de diferentes partes de la planta de *M. citrifolia*, presentan capacidad antioxidante diferente a su contenido de compuestos fenólicos (Zin y col 2006). Lo que explicaría, algunas de las discrepancias que se presentaron en la capacidad antioxidante de los diferentes extractos analizados.

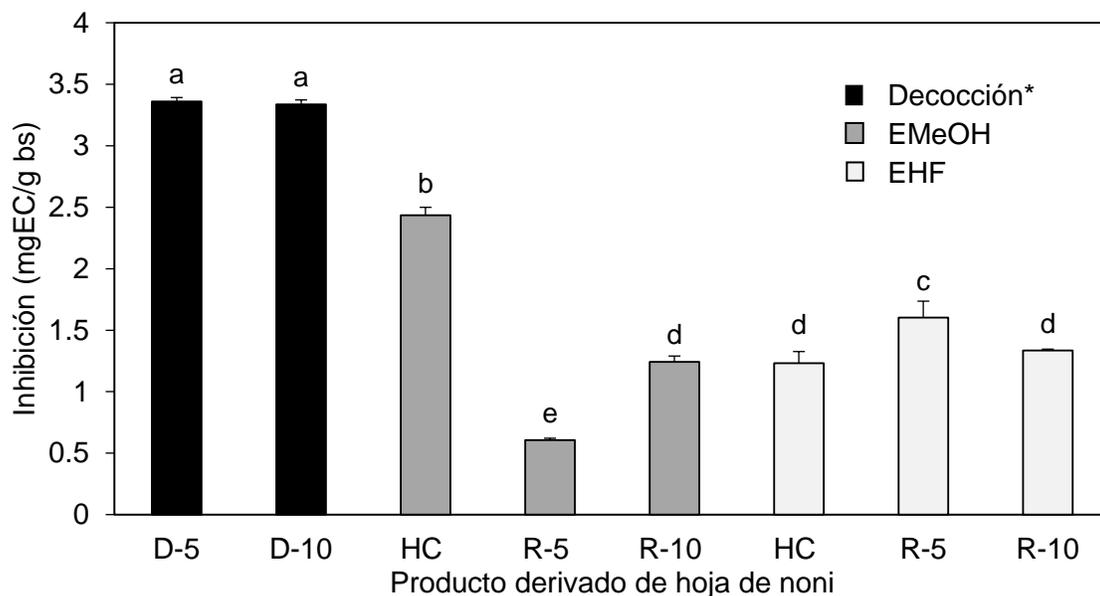
Por otro lado, tales diferencias también pueden deberse al tipo de solvente utilizado para cada extracto. Como destacaron Dawidowicz y col (2012), la reacción de estabilización del radical DPPH se ve influenciada por este factor, sin embargo no mencionan cómo el tipo de solvente afecta dicha reacción; pero con diferentes solventes utilizados (con la misma cantidad del antioxidante BHT), la acetona permitió una menor concentración de DPPH remanente que el metanol y que el

hexano. Además, estos autores determinaron que un mayor contenido de agua en el solvente aumentó la capacidad antioxidante. Esto podría coincidir con los solventes utilizados en el EHF de HC (donde se utilizó acetona acuosa), que proporcionó la mayor capacidad antioxidante en este ensayo.

## **2. Capacidad de inhibición de radicales OH en el ensayo de degradación de 2-desoxi-D-ribosa**

El ensayo de inhibición de la 2-desoxi-D-ribosa resultó significativamente mayor en las decocciones de 5 y 10 minutos, sin diferencia entre ambas, por encima del valor obtenido para los extractos de HC, R-5 y R-10. La capacidad de inhibición de la oxidación de 2-desoxi-D-ribosa de las muestras, fue expresada como equivalentes de catequina (EC), para la homogenización de los resultados con un compuesto antioxidante conocido que no dependa de la concentración del extracto. Los valores de la **Figura 8** corresponden a porcentajes de inhibición de 67.78 %, D-5; 67.35 %, D-10; 41.91 %, HC EMeOH; 15.49 %, R-5 EMeOH; 24.80 %, R-10 EMeOH; 21.55 %, HC EHF; 26.02 %, R-5 EHF; y 22.80 %, R-10 EHF.

Aunque la capacidad de inhibición de radicales sintéticos como el DPPH es un indicativo del poder reductor de radicales libres de las sustancias antioxidantes (principalmente de compuestos fenólicos), éste no es un radical biológicamente relevante. Los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) por otro lado, son los radicales más importantes en sistemas biológicos, debido a que son altamente reactivos y degradan fácilmente azúcares, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados, entre otras moléculas (Dorman y col 2003). En este caso, D-5 y D-10 resultaron los extractos más antioxidantes comparados con todas las demás muestras. Esto puede deberse



**Figura 8.** Capacidad de inhibición de radicales  $\text{OH}^\bullet$  en el ensayo de degradación de 2-desoxi-D-ribosa de productos derivados de la hoja de noni. HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico. \*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

a su contenido de CFT, que actúan como estabilizadores de radicales. Dorman y col (2003) determinaron la capacidad inhibidora de radicales  $\text{OH}^\bullet$  en el ensayo de 2-desoxi-D-ribosa de extractos acuosos de cuatro plantas de la familia *Lamiaceae*, y determinaron valores de  $\text{IC}_{50}$  de 2.16 a 3.4 mg/mL. Aunque no se determinaron valores de  $\text{IC}_{50}$  en el presente trabajo, las decocciones, a concentraciones de 8 mg/mL, exhibieron más del 50 % de inhibición de la oxidación de desoxirribosa.

La capacidad de evitar la degradación de desoxirribosa por  $\text{OH}^\bullet$  en extractos acuosos de hoja de noni, fue evaluada por Serafini y col (2011) a distintas concentraciones. Estos autores obtuvieron resultados inhibitorios en todas las concentraciones probadas (1 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), que resultaron similares al Trolox; lo que relacionaron con su contenido de CFT (196.8 mg/mL). Esto resulta comparable con el resultado de D-5 y D-10, ya que a pesar de que su contenido de CFT no fue tan alto como en el estudio de Serafini y col (2011), fue suficiente para inhibir la degradación de la desoxirribosa.

La capacidad de inhibición de radicales de los compuestos fenólicos no sólo depende de la cantidad de ellos presente en un extracto, sino de varios factores, como la cantidad y posición de grupos hidroxilo en los anillos, la capacidad de donación de electrones e hidrógeno y de la estabilidad de productos de oxidación de los fenólicos (Cheng 2003). Puede ser debido a estos factores que la capacidad de inhibición de  $\text{OH}^\bullet$  resultó más baja para los extractos de HC, R-5 y R-10, aunque su contenido de fenólicos no fuera más bajo que las decocciones para todos los casos, por lo que la capacidad antioxidante no parece depender solamente de la cantidad de CFT. Los extractos de HC resultaron más activos que los extractos de R-5 y R-10

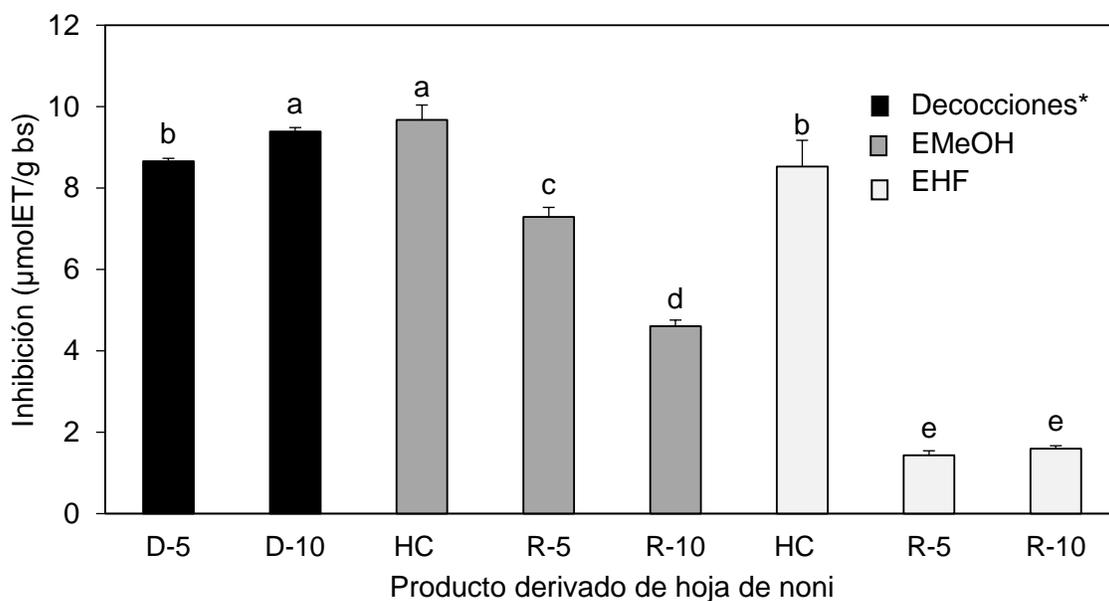
en el caso de los EMeOH, ya que como se ha mencionado antes, en las hojas residuo de la decocción se supone que queda muy poca cantidad de fenólicos remanentes que son lixiviados en la decocción. Sin embargo, para los EHF no ocurrió lo mismo, presentándose mayor capacidad antioxidante en R-5 (HC y R-10 sin diferencia significativa).

### **3. Capacidad de inhibición de la oxidación de LDL inducida por cobre**

Los resultados obtenidos de inhibición de la oxidación de LDL se muestran en la **Figura 9** y fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de base seca ( $\mu\text{molET/g bs}$ ) y por 100 gramos de base húmeda ( $\mu\text{molET}/100 \text{ g bh}$ ). A diferencia del ensayo de la desoxirribosa, en la inhibición de oxidación de LDL sí se presentaron diferencias significativas entre las decocciones, teniendo mayor inhibición D-10. Por otro lado, la HC, tanto de EMeOH como de EHF, resultó mayor que R-5 y R-10. Mostrando tendencia similar a la observada en el ensayo de DPPH para estos extractos, así como con su contenido fenólico, el cual fue menor en los residuos de decocciones de hoja que en HC.

De la **Figura 9**, los porcentajes de inhibición correspondientes a las muestras fueron de 82.25 %, D-5; 89.06 %, D-10; 73.30 %, HC EMeOH; 55.68 %, R-5 EMeOH; 37.48 %, R-10 EMeOH; 64.88 %, HC EHF; 12.38 %, R-5 EHF; y 13.57 %, R-10 EHF.

La oxidación de las LDL que ocurre por un exceso de radicales libres, tiene como su consecuencia más importante el desarrollo de aterosclerosis, pero también puede intervenir en el desarrollo de otras enfermedades crónicas de importancia mundial como la diabetes mellitus y la enfermedad renal crónica (Carvajal-Carvajal 2015).



**Figura 9.** Capacidad de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de productos derivados de la hoja de noni. HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico. \*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

Este ensayo, a pesar de no ser un método bien estandarizado para la comparación entre distintos laboratorios (Ghani y col 2017), utiliza un sustrato de alta importancia biológica, las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y puede ser indicativo del potencial antioxidante de un extracto o sustancia antioxidante sobre estas moléculas.

La capacidad de inhibición de la oxidación de LDL en los extractos se le atribuye principalmente a los compuestos fenólicos, ya que pueden actuar como eliminadores de radicales, o como agentes quelantes de los iones de cobre (Chandrasekara y col 2018).

El porcentaje de inhibición que presentó HC en ambos extractos, resultó mayor que el obtenido por Salleh y col (2002) en extractos metanol acuosos de hoja de noni que fue de 5 % de inhibición de la oxidación de LDL inducida por cobre, para un extracto de concentración 12.5 µg/mL. La HC en ambos extractos, en nuestro estudio tuvo mayor inhibición, 73.30 % el EMeOH y 64.88 % el EHF, a concentraciones de 25 mg/mL. Esta diferencia con el estudio de Salleh y col (2002), puede deberse a las diferencias en la concentración del extracto, de solvente de extracción, de la composición de fitoquímicos o a la muestra de LDL usada. Sin embargo, estos autores aunque no midieron el contenido de fenólicos, realizaron una comparación con los reportes en literatura y no establecieron una asociación directa entre la inhibición de la oxidación de LDL y el contenido de fenólicos reportado, atribuyendo la capacidad de inhibición a otros compuestos antioxidantes como carotenos y ácido ascórbico. Cirico y Omaye (2006) sugirieron que la mezcla de compuestos fenólicos puede ejercer efectos sinérgicos en la protección de la oxidación de LDL, pudiendo

resultar mayor que el efecto de los compuestos individuales. Esto podría explicar las diferencias en las capacidades de inhibición de extractos con diferente solvente, ya que no se conoce qué compuestos individuales existen en cada extracto y qué efecto podría ejercer cada uno sobre la peroxidación lipídica.

Serafini y col (2011), determinaron la actividad inhibitoria de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) inducida por AAPH, en decocciones de hoja de noni a diferentes concentraciones (1 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) y observaron inhibición en todas las concentraciones probadas. Aunque, si bien Serafini y col (2011) no utilizaron LDL sino yema de huevo como sustrato lipídico, en ambos casos las decocciones de hoja de noni lograron inhibir la formación de TBARS.

En el presente estudio, todos los extractos analizados lograron cierto nivel de inhibición de TBARS, pero las decocciones tuvieron efecto similar a los extractos de HC (D-5 y HC EHF; y D-10 y HC EMeOH sin diferencias significativas entre ellos). De estos resultados podría considerarse que los compuestos que dieron la actividad inhibitoria en decocciones y en hoja cruda podrían ser mayormente de naturaleza hidrofílica, mientras que en los residuos de decocciones de hoja (R-5 y R-10) la proporcionarían compuestos más lipofílicos.

Como mencionaron Chaniad y col (2018), un mayor efecto antioxidante en la peroxidación de lípidos podría deberse a que la estructura de la molécula antioxidante sea menos lipofílica y pueda disociarse en el medio acuoso donde se generaron los radicales. Aunque no se conoce con exactitud qué estructuras están presentes en D-5 y D-10, se supone su naturaleza hidrofílica, por lo que podría ser esta la razón de una mayor inhibición en las decocciones que en los extractos de

residuos de decocciones de la hoja. Existen reportes de los componentes aislados en hoja de noni, dentro de los que se encuentra el lignano americanina A (Assi y col 2015), este mismo compuesto, igual que otros de este tipo, se identificó en fruto de noni por Kamiya y col (2004), y se determinó que inhibió la oxidación de LDL inducida por cobre con un  $IC_{50}$  de 3.70  $\mu$ M. Además, estos autores relacionaron un mayor número de grupos OH en las estructuras de los lignanos aislados con un mayor efecto antioxidante.

#### **4. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por AAPH**

En el **Cuadro 8** se muestran los resultados de la capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria de los extractos a diferentes concentraciones. Se usaron Trolox y ácido ascórbico como antioxidantes control, los cuales produjeron un alto porcentaje de inhibición de la hemólisis a concentraciones bajas (400  $\mu$ g/mL), comparado con las concentraciones de inhibición de los extractos.

Para ambos tipos de extracto (EMeOH y EHF) en HC, se observó inhibición a las concentraciones usadas. Tanto para EMeOH como para EHF, se determinó un mayor porcentaje de inhibición a una concentración más alta de extracto. Para los EMeOH, a una concentración de 100 mg/mL, HC y R-5 no presentaron diferencia significativa, pero R-10 sí presentó diferencia con las dos anteriores. Sin embargo, en R-5 y R-10 no ocurrió inhibición a la concentración más baja del EMeOH (25 mg/mL).

Para EHF, sólo en HC ocurrió inhibición de la hemólisis a ambas concentraciones analizadas, 42 y 21 mg/mL, pero los residuos de decocciones de

**Cuadro 8.** Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil- amidinopropano) de productos derivados de la hoja de noni.

	<b>Concentración de extracto (mg/mL)</b>	<b>% Inhibición de hemólisis eritrocitaria</b>
<b>Trolox</b>	0.4	92.37 ± 4.87 <sup>a</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	0.4	91.16 ± 8.20 <sup>a</sup>
<b>D-5*</b>	8	NI
<b>D-10*</b>	8	NI
<b>HC EMeOH</b>	100	82.91 ± 2.25 <sup>b</sup>
	25	22.12 ± 1.92 <sup>e</sup>
<b>R-5 EMeOH</b>	100	86.98 ± 3.97 <sup>ab</sup>
	25	NI
<b>R-10 EMeOH</b>	100	41.19 ± 3.93 <sup>d</sup>
	25	NI
<b>HC EHF</b>	42	85.83 ± 4.69 <sup>ab</sup>
	21	66.67 ± 3.38 <sup>c</sup>
<b>R-5 EHF</b>	42	NI
	21	NI
<b>R-10 EHF</b>	42	NI
	21	NI

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico. NI: No inhibición. \*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones ± desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

Hoja no lograron inhibir la hemólisis en este tipo de extracto. D-5 y D-10 tampoco inhibieron la hemólisis de eritrocitos. Para todos los extractos se comprobó que no indujeron por sí mismos la hemólisis cuando fueron incubados con la suspensión de eritrocitos sin contener AAPH.

Los eritrocitos son muy susceptibles al daño oxidativo debido a que contienen ácidos grasos poliinsaturados en su membrana y altas concentraciones de oxígeno y hemoglobina (Pannangpetch y col 2007). Aunado a esto, el exceso de radicales libres puede aumentar esta susceptibilidad. El dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano), AAPH, es un iniciador *in vitro* de radicales peroxilo y otros radicales que inician reacciones de oxidación sobre las proteínas y lípidos de la membrana de los eritrocitos conllevando a la lisis de la misma (Lim y col 2002).

Según los resultados observados, las decocciones probablemente no lograron proteger a la membrana de eritrocitos del daño del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por AAPH en las condiciones experimentales, pero probablemente inhibieron la peroxidación de LDL. Lim y col (2002) realizaron estudios de inhibición de hemólisis, así como la inhibición de la peroxidación lipídica en cerebro de rata con extractos de *Sargassum siliquastrum* extraídos con solventes de diferente polaridad. Los extractos acuosos no lograron inhibir la hemólisis y fueron los más débiles en inhibir la peroxidación lipídica. Lin y col (2018) también obtuvieron mejores resultados en la inhibición de hemólisis eritrocitaria en extractos de etanol que en extractos con agua caliente de hojas de *Cyclea gracillima*, probablemente atribuyendo estos resultados al mayor contenido de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en los extractos etanólicos.

A pesar de que Lim y col (2002), encontraron relación entre la inhibición de la hemólisis y la peroxidación lipídica de diferentes extractos, no encontraron correlación positiva de la actividad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos, sin embargo, la mayor actividad fue en el extracto del solvente de baja polaridad diclorometano, por lo que sugirieron que la actividad antioxidante se puede deber no sólo a compuestos fenólicos, sino a otros antioxidantes como derivados de clorofilas. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos se pueden incorporar en la parte externa (hidrofílica) de la membrana de los eritrocitos, por lo que podría ejercer su acción antioxidante en esta región, pero no ejercerían influencia en la región de cadenas de hidrocarburo (parte hidrofóbica) (Bonarska-Kujawa y col 2011). Por su parte, Meshkini (2015) sugiere que los compuestos fenólicos preservan la membrana celular a través de su inserción en ella, protegiéndola de condiciones de estrés químico y fisiológico.

Se determinó un alto contenido de compuestos no polares en HC, R-5 y R-10, clorofilas y carotenoides, que podrían ser los responsables de la actividad antioxidante en este ensayo, a diferencia de D-5 y D-10 donde se detectó la presencia de una baja cantidad de luteína.

La estructura única de la luteína que es parcialmente hidrofílica, de dobles enlaces conjugados y dos grupos hidroxilo la hacen un potente antioxidante, por lo que podría limitar el grado en que el oxígeno penetra en las membranas y evitar el estrés oxidativo (Subczynski y col 1991). Sindhu y col (2010), demostraron la capacidad de la luteína para inhibir la peroxidación lipídica y la inhibición de radicales  $\text{OH}^*$  *in vitro*, la cual resultó mayor que la del ácido ascórbico.

El mayor contenido de compuestos fenólicos se obtuvo para el EHF de HC, que fue mayor a su EMeOH, así como a R-5 y R-10; lo cual coincide con las tendencias de la actividad de inhibición de hemólisis observada para estos extractos. Esto que sugiere que la actividad anti-hemólisis en este caso puede deberse a la mezcla de compuestos, tanto hidrofílicos como parcialmente hidrofílicos que ejercen el efecto antioxidante total. Incluso podría atribuirse parte de la actividad de los extractos de HC al contenido de ácido ascórbico, aunque es bajo de acuerdo a reportes de Sudjaroen (2012), el cual determinó un valor de 3.48 µg/100 g de la hoja fresca de noni.

La actividad de inhibición de hemólisis por antioxidantes de plantas puede deberse a diferentes mecanismos. Pannangpetch y col (2007) evaluaron la actividad anti-hemolítica de extractos alcohólicos de *Clinacanthus nutans* por diferentes métodos, observando que en la inhibición del radical DPPH (68 % de inhibición) no tuvieron tan buenos resultados como en la inhibición de hemólisis de eritrocitos de rata (98 % de inhibición), sugiriendo una mejor actividad como eliminadores de radicales libres. D-5 y D-10 mostraron buenos resultados en la actividad donadora de protones ante el radical DPPH, sin embargo no pudieron inhibir la hemólisis por radicales peroxílicos.

#### **D. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Los extractos MeOH de HC, R-5 y R-10, y las decocciones, D-5 y D-10, no presentaron inhibición del crecimiento de las bacterias *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.

El metanol es uno de los solventes de extracción más efectivos para compuestos bioactivos de plantas, y resulta mejor que otros como etanol, hexano o agua por tener una mayor constante dieléctrica (Nofouzi y col 2016). Debido a esto se eligió este tipo de extractos para probar la actividad antibacteriana de hoja cruda y residuo de hoja de decocciones. Las concentraciones usadas en los extractos para probar la actividad antibacteriana se realizaron de acuerdo a la literatura para extractos similares. Se usaron concentraciones de 40 mg/mL para los extractos metanólicos de HC, R-5 y R-10 y de 90 mg/mL para D-5 y D-10.

Existen reportes en la literatura que indican que extractos de hoja de noni con diferentes solventes presentan actividad antibacteriana contra algunas bacterias patógenas (Abou-Assi y col 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo para los extractos metanólicos no presentaron signos de actividad antibacteriana contra las bacterias *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, las cuales tienen gran relevancia en la salud ya que son bacterias comúnmente transmitidas por alimentos y provocan problemas de salud a nivel mundial y una creciente resistencia antibiótica (OMS 2017).

Varios autores han reportado actividad antimicrobiana de extractos de hoja de noni. Zhang y col (2016) reportaron actividad en extractos etanólicos contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*, además atribuyeron esta actividad principalmente a seis compuestos fenólicos identificados, 5,15-dimetilmorindol, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxicinámico, metil 4-hidroxibenzoato, metil ferulato y metil 4-hidroxicinamato. Sunder y col (2011) reportaron actividad contra diferentes cepas bacterianas, entre ellas *Salmonella* spp., de extractos de

hoja, fruto y semilla de noni siendo en general mayor para extractos de semilla. Por su parte, Serafini y col 2011 reportaron actividad antibacteriana leve en infusiones de hoja seca de noni, teniendo actividad solo en la bacteria gram-negativa *Aeromonas hydrophila* (de nueve estudiadas) con una concentración mínima inhibitoria de 0.625 mg/mL.

Sin embargo, los resultados son variables, ya que como en este estudio, Locher y col (1995) reportaron que diferentes extractos de hoja de noni no tuvieron actividad antimicrobiana contra diferentes cepas de bacterias y hongos.

Algunos autores mencionan que si bien, hay reportes de actividad antibacteriana en extractos de plantas, los resultados negativos no necesariamente deben ser un signo para descartar su actividad antimicrobiana, ya que algunos compuestos poco polares podrían difundir en el agar a una tasa muy baja, impidiendo su actividad, además los resultados podrían variar entre los diferentes autores debido a que las condiciones usadas no siempre son las mismas, pudiendo influir muchos factores como tipo de cepa usada, tamaño del inóculo, tamaño del disco, volumen de extracto, periodo de incubación, entre otros (Cushnie y Lamb 2005); por lo que no podría descartarse totalmente la actividad de los extractos de hoja de noni o los productos derivados de ésta para futuros estudios.

## IX. CONCLUSIONES

En los análisis fisicoquímicos de la hoja de noni y de sus productos derivados, se observó la afectación del proceso de decocción sobre los parámetros estudiados. Se observó que el tiempo más prolongado de decocción provocó mayor contenido de cenizas en las decocciones, y a su vez, menor en las hojas residuo. Asimismo, se obtuvo un mayor grado de los sólidos solubles totales, medidos como °Brix, en el agua de decocción a mayor tiempo de proceso.

Hubo un mayor contenido de los compuestos fenólicos totales en el agua de las decocciones con un mayor tiempo de proceso, mientras que en las hojas residuo los compuestos fenólicos fueron significativamente menores con respecto a la hoja fresca. Por el contrario, con el proceso de decocción sólo se solubilizaron trazas de luteína en el agua, pero se propició un mayor contenido de carotenoides totales, de luteína y de  $\beta$ -caroteno en los residuos de decocciones de hojas con respecto a la hoja cruda de noni. Además, el proceso térmico de decocción degradó significativamente el contenido de clorofilas en las hojas residuo de decocciones.

Los principales carotenoides encontrados en hoja cruda de noni y en los residuos de decocciones de hoja analizadas fueron  $\beta$ -caroteno y luteína. Con base en la cuantificación obtenida para estos carotenoides se estimó que 0.4 g de hoja cruda y 0.3 g de hoja residuo de decocción (para ambos tiempos) en base húmeda, satisfacen el requerimiento diario recomendado de equivalentes de retinol. Asimismo, 30.5 g de hoja cruda y 27.5 g de hoja residuo de decocción, ambos en base húmeda, satisfacen el requerimiento diario de luteína. Por lo que podrían ser consideradas como excelentes fuentes de suplementación en la alimentación.

Se asoció la capacidad antioxidante de la hoja de noni y sus productos derivados principalmente con el contenido de fenólicos totales, sin embargo esta capacidad varió según la técnica utilizada. En el ensayo de DPPH se observó una tendencia similar con el contenido de CFT. Los ensayos de degradación de 2-desoxi-D-ribosa y de oxidación de LDL tuvieron resultados con tendencias similares, pero resultando mejor para el segundo, y mostraron evidencia de que la hoja de noni y sus productos derivados lograron inhibir en algún grado la oxidación de estas moléculas ante el ataque de radicales libres. En el ensayo de inhibición de hemólisis de eritrocitos, la hoja fresca de noni fue la mejor inhibidora de la hemólisis, mientras que los residuos de decocciones de hoja sólo inhibieron cuando fueron empleadas como extractos metanólicos. Por su parte, las decocciones no tuvieron actividad anti-hemólisis a las concentraciones analizadas.

No se observó inhibición del crecimiento de las bacterias *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* de los extractos de hoja de noni y productos derivados a las condiciones analizadas.

Como perspectivas de investigación se recomienda determinar el perfil de compuestos fenólicos que permita relacionar de una manera más específica los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de capacidad antioxidante. Asimismo, se recomienda continuar el estudio de actividad antimicrobiana con diferentes condiciones de los extractos.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Aalbersberg WGL, Hussein S, Sotheeswaran S, Parkinson S. 1993. Carotenoids in the leaves of *Morinda citrifolia*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 1(2):51-54.
- Abou-Assi R, Darwis Y, Abdulbaqi IM, Khan A, Vuanghao L, Laghari MH. 2017. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arabian Journal of Chemistry* 10:691-707.
- Agostini-Costa TS, Pêsoa GKA, Silva DB, Gomes IS, Silva JP. 2014. Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactaceae-*Pereskia* sp. *Journal of Functional Foods* 11:178-184.
- Aman A, Moin S, Owais M, Sissiqui MU. 2013. Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 2:55-60.
- Andarwulan N, Kurniasih D, Apriady RA, Rahman H, Roto AV, Bolling BW. 2012. Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods* 4:339-347.
- Anesini C, Perez C. 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 39:119-128.
- Anitha T, Mohandass S. 2006. Anti-oxidant activity of *Morinda citrifolia* on lymphoma-bearing mice. *Ancient Science of Life* 26:85-88.

- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18a ed. United States of America: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington, D.C.:Association of Official Analytical Chemist.
- Aruoma OI. 1994. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology* 233:57-66.
- Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research* 196:44-68.
- Bernhardt S, Schilch E. 2006. Impact of different cooking methods on food quality: retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering* 77:327-333.
- Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmianski J, Sarapuk J, Kleszczynska H. 2011. Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophysics* 6:58-67.
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 22:25-30.
- Burns J, Fraser PD, Bramley PM. 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62:939-947.

- Bushnell OA, Fukuda M, Makinodan T. 1950. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. *Pacific Science* 1:167-183.
- Cadet J, Davies KJA, Medeiros MHG, Di-Mascio P. 2017. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 107:13-34.
- Calmarza-Calmarza P. 2008. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. *Revista Electrónica de Biomedicina* 3:52-60.
- Carrillo-López A, Yahia EM. 2014. Changes in color-related compounds in tomato fruit exocarp and mesocarp during ripening using HPLC-APCl<sup>+</sup>-mass Spectrometry. *Journal of Food Science and Technology* 51(10):2720-2726.
- Carrillo-López A, Yahia EM. 2011. Noni (*Morinda citrifolia* L.). En: Yahia EM, editor. *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. p 51-62.
- Carvajal-Carvajal C. 2015. LDL oxidada y la aterosclerosis. *Medicina Legal de Costa Rica* 32(1):161-169.
- Cervantes-Paz B, Yahia EM, Ornelas-Paz JJ, Gardea-Béjar AA, Ibarra-Junquera V, Pérez-Martínez JD. 2012. Effect of heat processing on the profile of pigments and antioxidant capacity of green and red jalapeño peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:10822-10833.
- Chan-Blanco Y, Vaillant F, Perez AM, Reynes M, Brillouet JM, Brat P. 2006. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:645-654.

- Chandrasekara A, Daugelaite J, Shahidi F. 2018. DNA scission and LDL cholesterol oxidation inhibition and antioxidant activities of Bael (*Aegle marmelos*) flower extracts. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 8(3):428-435.
- Chaniad P, Morales NP, Rojsitthisak P, Luechapudiporn R. 2018. Effects of turmeric extract on hemin-induced low-density lipoprotein oxidation. *Food Biochemistry* 42(3):1-9.
- Cheng Z, Moore J, Yu L. 2006. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7429-7436.
- Cheng Z, Li Y, Chang W. 2003. Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta* 478:129-137.
- Chobot V. 2010. Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:2088-2094.
- Chrpova D, Kourimska L, Gordon MH, Hermanova V, Roubicova I, Panek J. 2010. Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech Journal of Food Sciences* 28(4):317-325.
- Cirico TL, Omaye ST. 2006. Additive or synergetic effects of phenolics compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chemical Toxicology* 44:510-516.

- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 11th Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. 2006. Phenols, Polyphenols and Tanins: An Overview. En: Crozier A, Clifford MN y Ashihara H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd. p 1-24.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 26:343-356.
- Da Silveira TFF, Dillenburg-Meinhardt A, Augusto-Ballus C, Texeira-Godoy H. 2014. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. Food Research International 60:241-245.
- Dawidowicz AL, Wianowska D, Olszowy M. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by method (Problems in estimation of antioxidant activity. Food Chemistry 131:1037-1043.
- De Carvalho LMJ, Sarmet-Moreira Smiderle LA, Gomes-Ribeiro EM, Dellamora-Ortiz G, Barros-Gomes P, De Carvalho JLV. 2013. Food sources: Production and health benefits of carotenoids. En Yamaguchi M, editor. Carotenoids. Food sources, production and health benefits. Nueva York. Nova Science Publihers. p 35-48.

- Delgado-Vargas F, Paredes-López O. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. United States of America: CRC Press. p 221-223.
- Deng S, West BJ, Jensen J. 2011. Thermal degradation of flavonol glycosides in noni leaves during roasting. *Advanced Journal of Food Science and Technology* 3(2):155-159.
- Deng S, West BJ, Jensen CJ. 2010. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chemistry* 122:267-270.
- Diop Ndiaye N, Dhuique-Mayer C, Cisse M, Dornier M. 2011. Identification and thermal degradation kinetics of chlorophyll pigments and ascorbic acid from *Ditax nectar* (*Ditarium senegalense* J.F. Gmel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:12018-12027.
- Dittmar A. 1993. *Morinda citrifolia* L. Use in Indigenous Samoan Medicine. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 1:77-92.
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R y Tikkanen MJ. 2003. Characterization of the antioxidants properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* 83:255-262.
- Durán M, Montero P, Marrugo Y. 2013. Extractos metanólicos de corteza de guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Manguifera indica* L.): efecto citotóxico, antihemolítico y en la morfología de membrana de eritrocitos. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica* 16(2):327-334.

- Ebrahimzadeh MA, Hosseinimehr SJ, Hamidinia A, Jafari M. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of feijoa *Sellowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline* 1:7-14.
- Erturk Y, Ercisli S, Sengul M, Eser Z, Haznedar A, Turan M. 2010. Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity and minerals in fresh tea shoots (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(1):69-74.
- European Commission. 2008. Commission decision of 15 December 2008 authorizing the placing in the market of leaves of *Morinda citrifolia* as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the council. In *Official Journal of the European Union*, 2008.
- European Commission. 2003. Commission decision of 5 June 2003 authorizing the placing in the market of noni juice (juice of the fruit of *Morinda citrifolia*) as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the council. In *Official Journal of the European Union*, 2003: 001.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2009. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Foro de expertos de alto nivel - Cómo alimentar al mundo en 2050. Roma, Italia. Disponible de: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/Issues\\_papers\\_SP/La\\_agricultura\\_mundial.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf). Consultado el 1 de marzo de 2017.

- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition. Bangkok, Thailand. 341 p.
- Farzaneh V, Carvalho IS. 2015. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products* 65:247-258.
- Ferracane R, Pellegrini N, Visconti A, Graziani G, Chiavaro E, Miglio C, Fogliano V. 2008. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8601-8608.
- Fotakis C, Tsigrimani D, Tsiaka T, Lantzouraki DZ, Strati IF, Makris C, Tagkouli D, Proestos C, Sinanoglou V, Zoumpoulakis P. 2016. Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry* 211:963-971.
- Foyer CH. 2018. Reactive oxygen species, oxidative signaling and regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany* 154:134-142.
- Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifactorial food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1925-1941.
- Gamboa-Gómez CI, Simental-Mendía LE, González-Laredo RF, Alcantar-Orozco EJ, Monserrat-Juarez VH, Ramírez-España JC, Gallegos-Infante JA, Moreno-Jiménez MR, Rocha-Guzmán NE. 2017. *In vitro* and *in vivo* assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of Oak leaves (*Quercus convallata*

and *Quercus arizonica*) infusions and fermented beverages. Food Research International 102:690-699.

Garay Z, López A, Acha De la Cruz O, Souza A, Collantes I, Olivera P, Santiago J. 2011. Caracterización microestructural de cenizas de *Morinda citrifolia* Linneo NONI. Revista de la Sociedad Química del Perú 77(2):109-116.

Garrido G, Ortiz M, Pozo P. 2013. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research 1(1):30-38.

Gayosso-García Sancho LE, Yahia EM y González-Aguilar GA 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. Food Research International 44(5):1284-1291.

Ghani MA, Barril C, Bedgood Jr DR, Prenzler PD. 2017. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay Food Chemistry. 230:195-207.

Gómez-Romero M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2010. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. Phytochemistry 71:1848-1864.

González-Laredo RF, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA. 2012. Fitoquímicos antioxidantes en alimentos. En: Álvarez-Parrilla E, Gonzáles-Aguilar GA, De la Rosa LA, Ayala-Zavala JF. Antioxidantes en alimentos y salud. 1ª ed. México, D.F.: Clave Editorial. p 133-154.

- González-Moreno S, Perales-Varela H, Salcedo-Alvarez MO. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica* 4:119-129.
- Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, Miyashita K, van Camp J, Alasalvar C, Ismail AB, Elmore S, Birch GG, Charalampopoulos D, Astley SB, Pegg R, Zhou P, Finglas P. 2018. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods?. *Food Chemistry* 264:471-475.
- Gutiérrez-Castillo AC, Paasch-Martínez LH, Calderón-Apodaca NL. 2008. Salmonellosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet. Méx* 39:81-90.
- Hedrén E, Diaz V, Svanberg U. 2002. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition* 56:425-430.
- Inácio-Alves A, Mota-Ramos A, Stringheta PC, Lago-Vanzela ES. 2013. Carotenoids as bioactive compounds. En Yamaguchi M, editor. *Carotenoids. Food sources, production and health benefits*. Nueva York. Nova Science Publishers. p 1-34.
- Jabeen SS, Alam A, Saleem M, Ahmad W, Bibi R, Hamid FS, Shah HU. 2015. Withering timings affect the total free amino acids and mineral contents of tea

leaves during black tea manufacturing. *Arabian Journal of Chemistry*.  
Manuscrito aceptado.

Jacobo-Valenzuela N. 2011. Caracterización química, funcional y nutrimental de harinas de calabaza cehualca (*Curcúbita moschata* Duchense) precocidas por extrusión. [Tesis de doctorado]. Durango, Durango: Instituto Tecnológico de Durango, México.

Jayaraman SK, Manoharan MS, Illanchezian S. 2008. Antibacterial, antifungal and antitumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *International Journal of Integrative Biology* 3:44-49.

Kamiya K, Tanaka Y, Endang H, Umar M, Satake T. 2004. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5843-5848.

Kang YR, Park J, Jung SK, Chang YH. 2018. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food Chemistry* 245:943-950.

Kao FJ, Chiu YS, Chiang WD. 2014. Effect of water cooking on antioxidant capacity of carotenoid-rich vegetables in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* 22:202-209.

Kim D, Lee K, Lee J, Lee C. 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 50:3713-3717.

- Krinsky NI, Johnson EJ. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 26:459-516.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology* 25:726-732.
- Lanfer-Marquez UM, Barros RMC, Sinnecker P. 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International* 38:885-891.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-Vis spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* F.4.3.1-F4.3.8.
- Lim SL, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO. 2002. Evaluation of antioxidant activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3862-3866.
- Lin JT, Liu SC, Kuo LC, Yang DJ. 2018. Composition of phenolic compounds and antioxidant attributes of *Cyclea gracillima* Diels extracts. *Journal of Food and Drug Analysis* 26:193-200.
- Liu Y, Perera CO, Suresh V. 2007. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chemistry* 101:1533-1539.
- Locher CP, Burch MT, Mower HF, Berestecky J, Davis H, Van Poel B, Lasure A, Vanden Berghe, Vlietinck AJ. 1995. Anti-microbial activity and anti-

complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 49:23-32.

Loranty A, Rembalkowska E, Rosa EAS, Bennett RN. 2010. Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. *Journal of Food Composition and Analysis* 23:432-441.

Lourenco J, Leclercq A, Lecuit M, Charlier C. 2018. Listeriosis. *EMC-Tratado de Medicina*. 22(3):1-9.

Loy S, Simón R y Delgado R. 2002. Vimang, un potencial protector de la peroxidación lipídica en proteínas de baja densidad. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 21(3):167-170.

Lu Q, Peng Y, Zhu C, Pan S. 2018. Effect of thermal treatment on carotenoids, flavonoids and ascorbic acid in juice of orange cv. Cara Cara. *Food Chemistry* 265:39-48.

Lutz M, Henríquez C, Escobar M. 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:49-54.

Mandukhail SR, Aziz N, Gilani AH. 2010. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (noni) fruit, leaves and root extracts. *Lipids in Health and Disease* 9(88):1-6.

Meléndez-Martínez A, Vicario IM, Heredia FJ. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Publicación Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición [serie en

línea]. 54. Disponible de [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/26409/Estabilidad%20de%20los%20pigmentos%20carotenoides%20en%20los%20alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y].

Consultado el 15 de marzo de 2017.

Meng HC, Gao J, Zheng HC, Damirin A, Ma CM. 2015. Diacetylated and acetone-conjugated flavan-3-ols as potent antioxidants with cell penetration ability. *Journal of Functional Foods* 12:256-261.

Meshkini A. 2015. Acetone extract of almond hulls provides protection against oxidative damage and membrane protein degradation. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 9(3):134-142.

Milde J, Elstner EF, Graßmann. 2007. Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation. *Molecular Nutrition Food Research* 51:956-961.

Misra MK, Misra K, Brar SK, Verma M. 2013. Carotenoids in Herbal Medicines. En Yamaguchi M, editor. *Carotenoids. Food sources, production and health benefits*. Nueva York. Nova Science Publihers. p 127-142.

Motshakeri M, y Ghazali HM. 2015. Nutritional, phytochemical and commercial quality of Noni fruit: a multi-beneficial gift from nature. *Trends in Food Science & Technology* 45:118-129.

Mou B. 2005. Genetic variation of beta-carotene and lutein contents in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(6):870-876.

Nelson SC, Elevitch CR. 2006. Noni: The complete guide for consumers and growers. Holualua, Hawaii:Permanent Agricultural Resources 47-59 p.

Nerurkar PV, Hwang PW, Saksa E. 2015. Anti-diabetic potential of noni: the ying and the yang. *Molecules* 20:17684-17719.

Nofouzi K, Mahmudi R, Tahapour K, Amini E, Yousefi K. 2016. *Verbascum speciosum* methanolic extract: Phytochemical Components and antibacterial properties. *TEOP*. 19:499-505.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2018. Listeriosis. Nota descriptiva. Disponible de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/> Consultado el 01 de diciembre de 2018.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Disponible de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>. Consultado el 01 de Marzo de 2017.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2013. Salmonella (no tifoidea). Nota descriptiva N°139. Disponible de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. Consultado el 31 de marzo de 2017.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Disponible de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2002.1\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf). Consultado el 15 de Mayo de 2017.

- Ornelas-Paz JJ, Yahia EM, Gardea-Bejar A. 2007. Identification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of seven Mexican mango cultivars by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry [LC-(APCI<sup>+</sup>)-MS]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:6628-6635.
- Pak-Dek MS, Abdul-Hamid A, Osman A, Soh CS. 2008. Inhibitory effect of *Morinda citrifolia* L. on lipoprotein lipase activity. *Journal of Food Science* 78(8):595-598.
- Pamplona JD. 2006. *Salud por las plantas medicinales*. 1ra ed. Madrid, España:Editorial Sfeliz, S.L. 36 p.
- Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Kongyinyoes B, Aromdee C. 2007. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 29(Suppl.1):1-9.
- Pareek S, Sagar NA, Sharma S, Kumar V, Agarwal T, Gonzalez-Aguilar GA, Yahia EM. 2017. Chlorophylls: Chemistry and Biological functions. En Yahia EM, editor. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health*. Second Edition. John Wiley & Sons. p 269-284.
- Pasaporte MS, Rabaya FJR, Toleco MM, Flores DM. 2014. Xanthophyll content of selected vegetables commonly consumed in the Philippines and the effect of boiling. *Food Chemistry* 158:35-40.

- Pawlus AD, Kinghorn AD. 2007. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59:1587-1609.
- Pérez-Guerra Y. 2007. Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. *Revista CECIC Ciencias Biológicas* 38(1):3-11.
- Pistón M, Machado I, Branco CS, Cesio V, Heinzen H, Ribeiro D, Fernandes E, Campos-Chisté R, Freitas M. 2014. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. *Food Research International* 64:150-156.
- Quito LS, Torres GS. 2007. Estudio de prefactibilidad técnico-económico de una planta para elaborar una bebida a base de noni (*Morinda citrifolia*) y borojó (*Borojoa patinoi*) [Tesis de Licenciatura]. Quito, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional.
- Raju M, Varakumar S, Lakshminarayana R, Krishnakantha TP, Baskaran V. 2007. Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry* 101:1598-1605.
- Rocha-Guzmán NE, Medina-Medrano JR, Gallegos-Infante JA, Gonzalez-Laredo RF, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho R, Guzmán-Maldonado H, González-Herrera SM. 2012. Chemical evaluation, antioxidant capacity, and consumer acceptance of several oak infusions. *Journal of Food Science* 77(2):162-166.

- Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfan J. 2008. Updated brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:445-463.
- Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría AI. 2017. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología* 49(2):174-177.
- Saini RK, Nile SH, Park SW. 2015. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International* 76:735-750.
- [SAGARPA]. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2015. Disponible de [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp). Consultado el 13 de marzo de 2017.
- Salleh MN, Runnie I, Roach PD, Mohamed S, Abeywardena Y. 2002. Inhibition of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3693-3697.
- Sánchez C, Baranda AB, Martínez de Marañón I. 2014. The effect of High Pressure and High Temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. *Food Chemistry* 163:37-45.
- Sangeetha RK, Baskaran V. 2010. Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance: Efficacy of  $\beta$ -carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats. *Food Chemistry* 119:1584-1590.

- Sáyago-Ayerdi SG, Velázquez-López C, Montalvo-González E, Goño I. 2014. By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94:898-904.
- Selvam P, Raj K, Vimisha V, Harikrishnan R, Sarija R, Umalekshmi R. 2009. Antimicrobial activity of fruit extracts of *Morinda citrifolia*. *Journal of Applied Chemical Research* 10:61-63.
- Sen-Gupta S, Ghosh M. 2013. *In vitro* antioxidative evaluation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, isolated from crude palm oil. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 351671.
- Serafini MR, Santos RC, Guimaraes AG, Dos Santos JPA, Santos ADC, Alves IA, Gelain DP, Nogueira PCL, Quintans-Júnior LJ, Bonjardim LR, Araújo AAS. 2011. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. *Journal of Medicinal Food* 14(10):1159-1166.
- Sharma MC, Sharma S. 2010. Phytochemical screening of methanolic extracts and antibacterial activity of *Eclipta alba* and *Morinda citrifolia* L. *Middle-East Journal of Scientific Research* 6(5):445-449.
- Shukla S, Mehta A, Mehta P, Bajpai VK. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Phatology* 64:807-811.

- Sindhu ER, Preethi KC, Kuttan R. 2010. Antioxidant activity of carotenoid lutein *in vitro* and *in vivo*. *Indian Journal of Experimental Biology* 48:843-848.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Reventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology* 299:152-178.
- Sojka TV, Gironés-Vilaplana A, Djilas S, Mena P, Cetkovic G, Moreno DA, Canadanovic-Brunet J, Vulic J, Stajcic S, Vincic M. 2015. Chemical composition and potencial bioactivity of strawberry pomace . *RSC Advances* 5:5397-5405.
- Subczynski WK, Markowska e, Siewiesiuk J. 1991. Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion-concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1068:68-72.
- Sudjaroen Y. 2012. Evaluation of ethnobotanical vegetables and herbs in Samut Songkram province. *Procedia Engineering* 32:160-165.
- Sunder J, Jeyakumar S, Kundu A, Kumar De A. 2011. Antibacterial activity in solvent extract of different parts of *Morinda citrifolia* plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 3(8):1404-1407.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. 3<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates. 690 p.
- Turpín-Saorín J. 2010. Valoración de la actividad antioxidante en sopas deshidratadas mediante los ensayos de la desoxirribosa y de la peroxidación lipídica. [Tesis de Maestría]. Maestría en Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia. 53 p.

- Vargas-Murga L, De Rosso VV, Mercadante AZ, Olmedilla-Alonso B. 2016. Fruits and vegetables in the brazilian household budget survey (2008-2009): carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. *Journal of Food Composition and Analysis* 50:88-96.
- Visht S, Chaturvedi S. 2012. Isolation of natural products. *Current Pharma Research*. 2(3):584-599.
- West BJ, Deng S, y Palu AK. 2009. Antioxidant and toxicity tests of roasted noni (*Morinda citrifolia*) leaf infusion. *International Journal of Food Science & Technology* 2142-2146.
- West BJ, Tani H, Palu AK, Tolson CB, y Jensen CJ. 2007. Safety tests and antinutrient analyses of noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:2583-2588.
- Wolfe KE, Liu RH. 2003. Apple peels as value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:1676-1683.
- Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Beecher G, Prior RL. 2004. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Food Composition and Analysis* 17:407-422.
- Yahia EM, Ornelas-Paz JJ, Emanuelli T, Jacob-Lopes E, Queiroz-Zepka L, Cervantes-Paz B. 2018. Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. En: Yahia EM, editor. *Fruit and Vegetables Phytochemicals*. Cheichester, UK: Wiley Blackwell. p 285-346.

- Yashaswini S, Venugopal CK, Hedge RV, Mokashi AN. 2014. Noni: A medicinal plant for the tropics. *African Journal of Plant Science* 8:243-247.
- Zhang W-M, Wang W, Zhang J-J, Wang Z-R, Wang Y, Hao W-J, Huang W-Y. 2016. Antibacterial Constituents of Hainan *Morinda citrifolia* (Noni) leaves. *Journal of Food Science* 81:1192-1196.
- Zhao M, Yang Q, Lin L, Sun B, Wang Y. 2017. Intracellular antioxidant activities of selected cereal phenolic extracts and mechanisms underlying the protective effects of adlay phenolic extracts on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Journal of Functional Foods* 31:160-171.
- Zhou SH, Fang ZX, Lü Y, Chen JC, Liu DH, Ye XQ. 2009. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc) pomace. *Food Chemistry* 112:394-399.
- Zin ZM, Abdul-Hamid A, Osman A, Saari N. 2006. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from roots, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry* 94:169-178.
- Zin ZM, Abdul-Hamid A, Osman A. 2002. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*. 78:227-231.
- Znidarcic D, Ban D, Šircelj H. 2011. Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries. *Food Chemistry* 129:1164-1168.

## ABREVIATURAS

bh	Base húmeda
bs	Base seca
Col	Colaboradores
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EHF	Extracto hidrofílico
ELF	Extracto lipofílico
EMeOH	Extracto metanólico
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (del inglés, Food and Agriculture Organization of United Nations)
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (del inglés High-Performance Liquid Chromatography)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés Low-Density Lipoprotein)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

## ANEXOS

El contenido de clorofilas en productos derivados de la hoja de noni.

	<b>Clorofila a</b>		<b>Clorofila b</b>		<b>Clorofilas totales</b>	
	(mg/g bs)	(mg/100 g bh)	(mg/g bs)	(mg/100 g bh)	(mg/g bs)	(mg/100 g bh)
<b>HC</b>	3.97 ± 0.25 <sup>a</sup>	76.72 ± 4.77	1.57 ± 0.11 <sup>a</sup>	30.29 ± 2.17	5.53 ± 0.36 <sup>a</sup>	107.02 ± 6.93
<b>D-5</b>		ND		ND		ND
<b>D-10</b>		ND		ND		ND
<b>R-5</b>	2.30 ± 0.10 <sup>b</sup>	42.34 ± 1.91	1.18 ± 0.02 <sup>b</sup>	21.70 ± 0.30	3.48 ± 0.10 <sup>b</sup>	67.34 ± 1.92
<b>R-10</b>	1.53 ± 0.10 <sup>c</sup>	28.32 ± 1.99	0.66 ± 0.10 <sup>c</sup>	12.24 ± 1.86	2.18 ± 0.15 <sup>c</sup>	42.26 ± 3.04

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de 5 min y R-10: Residuo de 10 min. ND: No detectado. El valor de clorofilas totales representa la suma de las clorofilas (*a* y *b*) individuales. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones ± desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

Compuestos fenólicos totales de productos derivados de hoja de noni.

<b>Compuestos fenólicos totales</b>		
	(mgEAG/g bs)	(mgEAG/100 g bh)
D-5	*1.12 ± 0.09 <sup>f</sup>	0.90 ± 0.07
D-10	*1.58 ± 0.12 <sup>e</sup>	1.27 ± 0.10
HC EMeOH	5.24 ± 0.15 <sup>b</sup>	101.21 ± 2.93
R-5 EMeOH	4.42 ± 0.21 <sup>c</sup>	81.16 ± 3.95
R-10 EMeOH	4.35 ± 0.37 <sup>c</sup>	80.74 ± 6.76
HC EHF	6.82 ± 0.21 <sup>a</sup>	131.81 ± 4.18
R-5 EHF	2.49 ± 0.18 <sup>d</sup>	44.64 ± 1.73
R-10 EHF	1.90 ± 0.09 <sup>e</sup>	35.34 ± 1.65

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min.  
EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones ± desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

\*Representa el contenido por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Capacidad de inhibición del radical DPPH de productos derivados de la hoja de noni.

<b>Capacidad de inhibición de DPPH</b>		
	( $\mu\text{molET/g bs}$ )	( $\mu\text{molET}/100 \text{ g bh}$ )
D-5	*2.75 $\pm$ 0.26 <sup>g</sup>	2.10 $\pm$ 0.21
D-10	*2.57 $\pm$ 0.22 <sup>g</sup>	2.06 $\pm$ 0.18
HC EMeOH	8.65 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	167.25 $\pm$ 7.46
R-5 EMeOH	7.15 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	131.54 $\pm$ 4.87
R-10 EMeOH	7.09 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	131.56 $\pm$ 2.30
HC ELF	4.54 $\pm$ 0.23 <sup>f</sup>	87.73 $\pm$ 4.37
R-5 ELF	5.77 $\pm$ 0.62 <sup>de</sup>	106.16 $\pm$ 11.49
R-10 ELF	5.92 $\pm$ 0.55 <sup>de</sup>	109.88 $\pm$ 10.19
HC EHF	13.97 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	270.15 $\pm$ 25.80
R-5 EHF	5.54 $\pm$ 0.48 <sup>e</sup>	101.87 $\pm$ 8.79
R-10 EHF	6.54 $\pm$ 0.41 <sup>cd</sup>	121.33 $\pm$ 7.56

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min.  
EMeOH: Extracto metanólico, ELF: Extracto lipofílico, EHF: Extracto hidrofílico.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

\*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Capacidad de inhibición de radicales OH<sup>\*</sup> en el ensayo de degradación de 2-desoxi-D-ribosa de productos derivados de la hoja de noni.

<b>Capacidad de inhibición de radicales OH<sup>*</sup></b>		
	(mgEC/g bs)	(mgEC/100 g bh)
D-5	*3.36 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.03
D-10	*3.34 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.67 ± 0.03
HC EMeOH	2.44 ± 0.07 <sup>b</sup>	47.09 ± 1.26
R-5 EMeOH	0.61 ± 0.02 <sup>e</sup>	11.13 ± 0.29
R-10 EMeOH	1.24 ± 0.05 <sup>d</sup>	23.07 ± 0.87
HC EHF	1.23 ± 0.09 <sup>d</sup>	23.79 ± 1.85
R-5 EHF	1.60 ± 0.14 <sup>c</sup>	29.45 ± 2.48
R-10 EHF	1.33 ± 0.01 <sup>d</sup>	24.76 ± 0.21

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min.  
EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones ± desviación estándar (Fisher, α=0.05).

\*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.

Capacidad de inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de productos derivados de la hoja de noni.

<b>Capacidad de inhibición de oxidación de LDL</b>		
	( $\mu\text{molET/g bs}$ )	( $\mu\text{molET}/100 \text{ g bh}$ )
D-5	* $8.66 \pm 0.08^b$	$6.93 \pm 0.07$
D-10	* $9.39 \pm 0.09^a$	$7.51 \pm 0.06$
HC EMeOH	$9.68 \pm 0.36^a$	$187.10 \pm 6.99$
R-5 EMeOH	$7.29 \pm 0.23^c$	$134.09 \pm 4.30$
R-10 EMeOH	$4.61 \pm 0.15^d$	$85.50 \pm 2.81$
HC EHF	$8.53 \pm 0.64^b$	$164.89 \pm 12.46$
R-5 EHF	$1.43 \pm 0.11^e$	$26.36 \pm 2.03$
R-10 EHF	$1.59 \pm 0.07^e$	$29.57 \pm 1.32$

HC: Hoja cruda, D-5: Decocción de 5 min, D-10: Decocción de 10 min, R-5: Residuo de decocción de hoja de 5 min y R-10: Residuo de decocción de hoja de 10 min. EMeOH: Extracto metanólico, EHF: Extracto hidrofílico.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias. Media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar (Fisher,  $\alpha=0.05$ ).

\*Representa la capacidad antioxidante por gramo de muestra de HC liofilizada utilizada para elaborar la decocción.