



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Actividad bactericida de *Morinda citrifolia* contra micoplasmas de interés médico (*Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma fermentans*).

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

María Minerva González Tapia

ASESOR:

Dr. José Antonio Rivera Tapia



MAYO 2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al laboratorio de micoplasmas del CICM-BUAP por proporcionarme el espacio y el material necesario para llevar a cabo esta tesis y en especial a mi tutor el Dr. José Antonio Rivera Tapia por aceptar asesorarme, por su tiempo y espera.

DEDICATORIA

Con cariño a mis padres y hermanos por su esfuerzo, sacrificio y espera. Por su apoyo emocional y económico desde siempre, su insistencia constante; sin los cuales no hubiera sido posible terminar este trabajo.

A mis amistades que me alentaron a seguir y no desistir, por su tiempo, compañía y consejos.

ÍNDICE

| | Páginas |
|-----------------------------------------------------------|----------------|
| RESUMEN | I |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.- Generalidades de las bacterias..... | 1 |
| II.- Micoplasmas e importancia médica | 3 |
| III.- Productos naturales con actividad bactericida | 7 |
| ANTECEDENTES | 11 |
| JUSTIFICACIÓN | 15 |
| OBJETIVOS | 16 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| MATERIAL Y MÉTODO | 18 |
| Microorganismos..... | 18 |
| Material biológico y preparación | 18 |
| Ensayo de la actividad bactericida | 18 |
| Análisis estadístico..... | 19 |
| RESULTADOS | 22 |
| DISCUSIÓN | 30 |
| CONCLUSIÓN | 34 |
| RECOMENDACIONES | 35 |
| BIBLIOGRAFÍA | 36 |
| ANEXOS | 44 |

RESUMEN

Los micoplasmas poseen propiedades inmunoregulatorias notables y pueden establecer potencialmente infecciones crónicas latentes con signos de enfermedad. *Morinda citrifolia* (noni) es una planta ampliamente usada en la medicina tradicional. También se ha reportado que el jugo del noni es empleado para el tratamiento de infecciones cutáneas. En años recientes se han descubierto múltiples resistencias de microorganismos en humanos debido al indiscriminado uso de antibióticos comúnmente empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacterial del jugo del fruto de *M. citrifolia* contra micoplasmas de interés médico, el jugo del fruto de *M. citrifolia* fue puesto a prueba contra *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma fermentans*. La actividad antibacterial fue evaluada por la presencia o ausencia de crecimiento, el jugo del fruto de *M. citrifolia* produjo la más alta actividad antibacterial contra los micoplasmas probados. La actividad del 100% del jugo del fruto indica que los componentes activos están concentrados en esta fracción, este es el primer reporte de la actividad antibacterial del jugo del fruto de *M. citrifolia* contra micoplasmas de interés médico en comparación con otros microorganismos.

INTRODUCCIÓN

I.- Generalidades de las bacterias

Las bacterias son organismos diminutos que se encuentran en todas partes y en la mayoría de los casos se caracterizan por ser autónomos; sin embargo la célula bacteriana difiere marcadamente de las células eucariotas de plantas y animales; algunas bacterias actúan como los mayores causantes de enfermedades por lo que el control y prevención de estas depende de los efectos médicos y bacteriológicos que tengan (1).

Las bacterias pueden distinguirse de otras de acuerdo a una clasificación como el tamaño, la estructura, actividades químicas, tipos de nutrientes que necesitan, la forma de energía que emplean, las condiciones físicas bajo las cuales crecen y sus reacciones a ciertas tinciones (1).

Las bacterias difieren en cuanto a su ultraestructura y composición química. El cromosoma bacteriano es por lo general ADN que está extensamente plegado y que forma un cuerpo llamado nucleoide, este a su vez está rodeado por el citoplasma. El citoplasma contiene ribosomas, los cuales están asociados a la síntesis de proteínas y algunas veces también sirven como almacén de nutrientes (1).

En las bacterias hay una capa gruesa; la pared celular, que protege al protoplasto del daño mecánico y la lisis osmótica. La pared celular de diferentes especies difiere en grosor, estructura y composición, hay 2 principales tipos de pared celular debido a la reacción que tienen con ciertas tinciones por lo que se denominan: gram positivas y gram negativas. Esta clasificación refleja diferencias fundamentales en la estructura de la pared celular, lo que tiene implicaciones para la acción de los antibióticos (1).

La pared celular de los microorganismos gram-positivos es de 15-50 nm de grosor, está formada por un 50% de peptidoglicano, un 40-45% de polímero ácido (que hace que la superficie sea muy polar y que tenga carga negativa) y

de un 5-10% de proteínas y polisacáridos. La pared celular de las bacterias gram-negativas es más compleja, desde la membrana plasmática hacia el exterior consta de un espacio periplásmico que contiene enzimas y otros componentes, una capa de peptidoglicano de 2 nm de grosor que constituye el 5% de masa de la pared celular, una membrana externa formada por una bicapa lipídica similar a la membrana plasmática que contiene moléculas de proteína y que en su cara interna posee lipoproteínas que están unidas al peptidoglicano. Otras proteínas; porinas, a través de las cuales se pueden desplazar con libertad los antibióticos hidrófilos y por último los polisacáridos complejos que conforman componentes importantes de la superficie externa, y que son los principales determinantes de la antigenicidad de la bacteria. Los polisacáridos complejos constituyen las endotoxinas que *in vivo* desencadenan varios aspectos de la reacción inflamatoria, activan el complemento y producen fiebre (2).

Debido a la importancia de las bacterias como organismos causantes de enfermedades; desde los años cuarenta se han desarrollado fármacos eficaces y seguros para tratar infecciones bacterianas, se ha revolucionado el tratamiento médico y se ha disminuido notablemente el número y la mortalidad de las enfermedades microbianas, no obstante el desarrollo de antibacterianos eficaces también se ha acompañado de la aparición de microorganismos resistentes a los mismos. Este fenómeno impone graves restricciones a las opciones disponibles para el tratamiento médico de numerosas infecciones bacterianas. Por otro lado el uso de antibióticos tiene ciertos riesgos como reacciones tóxicas ligadas a determinados tejidos del organismo, es decir reacciones provocadas por la acción farmacológica de éstas sustancias cuando se administran a dosis elevadas, durante un tiempo prolongado. Esto obliga a buscar nuevas alternativas naturales que posean actividad bactericida; es decir un compuesto que tenga la capacidad de inhibir en su totalidad la multiplicación de microorganismos. Por lo general esa actividad la poseen antimicrobianos que alteran la síntesis de ADN, enzimas necesarias para la replicación, inhibición de la síntesis de proteínas o la función de la pared celular bacteriana (3).

II.- Micoplasmas e importancia médica

Una de las bacterias más importantes en cuanto a la causa de enfermedades son los micoplasmas que actúan como agentes patológicos para un gran número de organismos dentro de los cuales está el humano. Estos microorganismos han causado gran controversia por sus determinantes patogénicos, sus propiedades biológicas únicas las cuales son un desafío para el huésped en el momento de diferenciarlos de otras bacterias patógenas (4).

Estos microorganismos fueron descritos por primera vez por Nocard y Roux, en 1898, quienes demostraron que la pleuroneumonía en el ganado era causada por organismos diminutos (5).

Existen numerosas especies de micoplasmas que se encuentran como comensales en la flora normal de las personas sanas, por lo que la acción de estos en una enfermedad hace difícil el diagnóstico. Recientemente se ha asociado a los micoplasmas como cofactores de diferentes síndromes, como en la patogenicidad del VIH, transformaciones malignas, aberraciones cromosomales, con el síndrome de la guerra del Golfo, así como en el caso de enfermedades inexplicables como el síndrome de fatiga crónica, la enfermedad de Crohn y con varios tipos de artritis (6).

La característica distintiva de los micoplasmas es no tener pared celular, poseer una membrana celular que contiene esteroides, además de tener evidencias de que evolutivamente descienden de dos ramas de bacterias gram positivas como *Clostridium innocum* y *Clostridium ramosum*, por el tamaño de su genoma y el bajo contenido de guanina – citosina (7).

Los micoplasmas usualmente exhiben un hospedero estricto y un tejido específico, sin embargo hay numerosos experimentos de la presencia de micoplasmas en hospederos y tejidos diferentes de sus hábitats normales. Los hábitats primarios de los micoplasmas de humanos y animales son las superficies de las mucosas de los tractos respiratorios y urogenitales, los ojos, el canal alimentario, las glándulas mamarias y las articulaciones (8).

Taxonómicamente la falta de pared celular se utiliza para separar los micoplasmas de otras bacterias en una clase llamada *Mollicutes*, esta clase está compuesta por cuatro órdenes, cinco familias y ocho géneros (8).

La ausencia de la pared celular los hace insensibles a los antibióticos betalactámicos como las penicilinas, su crecimiento es inhibido por la tetraciclina y eritromicina actuando sobre la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano e inhibiendo la síntesis proteica, no se tiñen por la técnica de gram. Otra característica es su pleomorfismo derivado de la ausencia de pared celular, su sensibilidad a los detergentes, a los solventes orgánicos y a los cambios de osmolaridad del medio (9).

Los micoplasmas pueden cultivarse en medios sólidos y líquidos sofisticados, requieren de medios especiales que contengan esteroides y vitamina E, precursores de ácidos nucleicos y suero, donde se pueda observar la forma de las colonias con apariencia de "huevo frito", debido a su crecimiento central dentro del medio, la diferencias de los micoplasmas corresponden a las características metabólicas de cada uno (9).

Algunos micoplasmas tienen un rango de pH relativamente amplio, pero otros desaparecen a un pH menor o igual a 7.0 y necesitan un pH de 7.8 a 8 para crecer. Generalmente fermentan glucosa pero el pH rara vez baja de 7, la disminución de azúcares puede inhibir el crecimiento. Las variedades saprófitas crecerán a 22° C, con un óptimo de 30° C pero las parásitas necesitan 37° C para poder crecer, también pueden conservarse por liofilización, a -70° C o a temperaturas muy bajas (9).

El papel de los micoplasmas en enfermedades humanas ha sido estudiado especialmente en el aparato respiratorio y genital, así como en enfermedades articulares, 16 especies de micoplasmas han sido aisladas de los humanos. *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma fermentans* han sido estudiadas por su gran importancia en diferentes enfermedades humanas y por su peculiar variación antigénica (8).

M. pneumoniae es el primer micoplasma que se reportó como patógeno del humano, es el más estudiado, se ha asociado con el desarrollo de neumonías en niños de edad escolar, adolescentes y adultos jóvenes (10). Usualmente se establece en la orofaringe, bronquios y otras partes del tracto respiratorio superior durante la infección aguda. El microorganismo también ha sido aislado a partir del pulmón y fluido pleural durante la enfermedad respiratoria aguda, y del fluido bronquio-alveolar de pacientes inmunodeprimidos con neumonía incluyendo aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (11).

Es una bacteria simple con respecto a la composición de su envoltura celular, su capacidad biosintética y reguladora, el tamaño de su genoma, además de poseer un organelo terminal complejo multifuncional (constituido por proteínas que actúan como adhesinas) , integrado por un nucleoide electrodenso , ligado a una estructura parecida a un citoesqueleto , con una extensión unido a la membrana celular, constituido por un par de filamentos orientados longitudinalmente con los que se adhieren a las células eucariotas (12).

El periodo de incubación de *M. pneumoniae* es de 2 a 3 semanas, esta bacteria puede persistir en el tracto respiratorio por meses, algunas veces por años posiblemente porque la bacteria se adhiere fuertemente a las células epiteliales a través de la proteína P1 que funciona como adhesina. Las adhesinas interaccionan con los receptores de las membranas celulares. La capacidad de fijación de los micoplasmas a las células ciliadas del aparato respiratorio evita el movimiento de los cilios que son de importancia vital para la defensa de las vías respiratorias (13).

Por otra parte *M. fermentans* y *M. penetrans* son especies aisladas de la orina y de la sangre de pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), están asociados como cofactores en la progresión del SIDA (14).

M. fermentans fue aislado por primera vez del tracto urogenital y posteriormente de la médula ósea de pacientes con y sin leucemia, en la orina y sangre de portadores de VIH, en la saliva de sujetos sanos y en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. La lipoproteína de *M. fermentans* es abundante en la superficie de membrana y muestra una fuerte antigenicidad e inmunogenicidad. Actúa cambiando la configuración de la membrana lipídica del hospedero activando las fosfolipasas para dañar los fosfolípidos de la membrana, así se inicia la cascada de transmisión de señales que junto a otros factores permiten el reordenamiento del citoesqueleto y la posterior internalización de la bacteria. La variación genética de esta especie es claramente demostrada por la presencia de las proteínas p150, p95, p78, p48, p43, p41, p38 y p29 que confieren diversidad antigénica (15).

M. penetrans fue descrito en 1992 y es una de las más recientes especies de *Mollicutes* aislada de humanos, sus propiedades de adherencia, hema-absorción, cito-absorción e invasión de células epiteliales mamarias han sido descritas. El análisis de *M. penetrans* aislado de la orina de sujetos homosexuales contagiados de VIH ha mostrado que puede actuar como cofactor del virus acelerando la evolución de esta enfermedad retroviral (16). La adhesión de *M. penetrans* a la célula hospedera está relacionada con las proteínas de membrana asociadas a lípidos de 35, 38, 61 y 103 Kda (17).

Los micoplasmas asociados al VIH utilizan glucosa e hidrolizan la arginina en los macrófagos infectados a través de la enzima arginina desaminasa, la cual inhibe el factor citotóxico de los macrófagos. También liberan nucleasas en el medio que degradan a los ácidos nucleicos del huésped, además de invadir las células del huésped tiene la capacidad de vivir como patógenos intracelulares (18).

Diversos estudios predicen que la incidencia de enfermedades por micoplasmas podría incrementarse, lo cual indica la necesidad de desarrollar nuevas propuestas para la prevención y terapia, proponiendo tratamientos eficaces que minimicen los riesgos que puedan causar a la salud (19).

III.- Productos naturales con actividad bactericida

Una alternativa natural contra las bacterias pueden ser los extractos naturales, muchas enfermedades infecciosas han sido tratadas con remedios herbales, productos naturales como compuestos puros o extractos de plantas que proveen oportunidades ilimitadas para nuevos fármacos debido a su diversidad química, por lo que surge la necesidad de compuestos antimicrobianos nuevos, con estructuras químicas diversas y nuevos mecanismos de acción para las enfermedades infecciosas que han surgido nuevamente(20).

Las plantas medicinales son de gran importancia para la salud de los individuos y las comunidades, el valor medicinal de las plantas está en las sustancias químicas que poseen, las cuales son llamadas fitoquímicos, estos se encuentran relativamente en cantidades pequeñas en las plantas comestibles. Debido a su importancia en la salud, contribuyen a la prevención de diversas enfermedades neurodegenerativas. Tales sustancias incluyen alcaloides saponinas, glicósidos, taninos, flavonoides, polifenoles y esteroides, iridoides, fitosteroles, carotenoides, fenoles entre otros (21).

Los flavonoides presentes en muchas frutas no sólo tienen propiedades anticancerígenas también proveen protección cardiovascular, poseen propiedades anti-inflamatorias y antivirales. Por otro lado los carotenoides son precursores la vitamina A y más de 40 carotenoides han sido identificados, la propiedad antioxidante de los carotenoides atrae a ser investigados para el tratamiento contra el cáncer (21).

Los polifenoles contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis y actúan como antioxidantes que proporcionan beneficios a la salud, juegan un papel en la prevención de enfermedades neurodegenerativas como la diabetes mellitus. Para determinar los fitoquímicos o metabolitos secundarios de una planta se emplean una serie de técnicas de extracción, separación, purificación y de determinación estructural lo que recibe el nombre de análisis fitoquímico (21).

Como producto natural *Allium sativum* (ajo) ha tenido un importante papel dietético y medicinal por siglos, es una planta anual de la familia Liliaceae la cual crece en África y Etiopía. El ajo es usado en la medicina tradicional para tratar enfermedades infecciosas, ha sido reconocido como un potente antifúngico, antiviral, antibacterial, antiséptico y antiinflamatorio (22).

El ajo incluye aceites volátiles como (allicina, alliin y ajoene) , enzimas (alliinasa, peroxidasa y miracinasa), carbohidratos (sucrosa, glucosa), minerales (germanio, selenio, zinc), aminoácidos (cisteína, glutamina, isoleucina, metionina), bioflavonoides como cianidina y alistatina I y II, vitaminas A, C, E , niacina, vitamina B₁₂ y beta carotenos (23).

Por otro lado, taxonómicamente *Morinda citrifolia* pertenece al Phylum Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden *Gentianales* y Familia Rubiaceae. Es una de las plantas tradicionales medicinales, en tahitiano fruta de queso o “noni”, es un arbusto perenne, el largo de sus hojas miden de 8-10 pulgadas, es de forma oval, de color oscuro, brillante y con venas marcadas en las hojas, los indígenas usan esta planta como tratamiento tópico para curar heridas (Figura 1) (24).

El noni es nativo del sureste de Asia (Indonesia) y Australia, se ha reportado que tiene un alto valor nutricional y terapéutico; contiene fitoquímicos como ligninas, oligosacáridos, polisacáridos, flavonoides, ácidos grasos, escopoletina, beta-sitosterol, fitosterol que reduce el colesterol en la sangre y el cáncer de seno. La fruta madura del noni actúa como un laxante suave, también es usado para aliviar la obstrucción en el sistema digestivo. El jugo de esta fruta tiene alta demanda en la medicina alternativa para diferentes tipos de enfermedades como la diabetes, artritis, hipertensión, dolor muscular, dolor menstrual, dolor de cabeza, enfermedades del corazón, cáncer, úlceras gástricas y problemas de los vasos sanguíneos (Figura 2) (25).



Figura 1. *Morinda citrifolia*



Figura 2. Fruto de *M. citrifolia*

Varios reportes han establecido los beneficios que genera en la salud humana el fruto de noni, dentro de los cuales se incluyen actividades de inmunomodulación y como antioxidante *in vivo* e *in vitro*; además de que ejerce un efecto antioxidante en atletas e incrementa la resistencia en el ejercicio (25).

Otros compuestos que se han identificado en el noni son: el ácido octanoico, potasio, vitamina C, terpenoides, alcaloides, antraquinonas tales como el nordamnacantal, morindona, rubiadina, rubiadina-1-metil éter y el glicósido de antraquinona. Entre sus compuestos también se incluyen caroteno, vitamina A, ácido linoleico, alizarina, aminoácidos, acubina, L-asperulósido, ácido caproico, ácido caprílico, ácido ursólico, rutina y una posible proxeronina (26).

En las hojas del noni se han hallado glicósidos del flavonol y un glicósido iridoide, así como un éster trisacárido de ácido graso y un ácido asperulosídico en el fruto. Se destaca además que el poco común fitoquímico iridoide, denominado citrifolinósido posee un efecto inhibitorio sobre la transactivación de la proteína AP-1 y la transformación celular en líneas de células epidérmicas JB6 en el ratón (27).

La Acubina, el L-asperulósido y la alizarina del fruto, así como antraquinonas presentes en la raíz, han mostrado actividad bactericida contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* (28).

El extracto del fruto de noni exhibe propiedades antibacteriales moderadas contra *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella montevideo*, *Shigella paradys* (29). También se ha demostrado que *Morinda citrifolia* ayuda en el tratamiento de la úlcera gástrica a través de la inhibición de *Helicobacter pylori* (30).

Hay diversos estudios de la actividad bactericida de *M. citrifolia* contra diferentes microorganismos, sin embargo no se han hallado reportes contra micoplasmas, los cuales son diferentes del resto de las bacterias por su tamaño y su falta de pared celular.

ANTECEDENTES

En comparación con *M. citrifolia*, *A. sativum* ha mostrado actividad bactericida contra bacterias gram negativas como *E. coli*, *Salmonella* sp, *Citrobacter enterobacter* y *Pseudomona klebsiella*, en gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, Grupo A *Streptococcus* y *Bacillus anthrax* (22). Hay una extensa literatura de los efectos antibacteriales del jugo de ajo fresco, de polvos liofilizados, de aceites destilados y otras preparaciones comerciales del ajo (31).

Se ha revelado que la actividad antibacterial del ajo es sensible al calor; a temperatura ambiente y refrigerado a -10°C posee actividad bactericida, sin embargo a temperatura ambiente muestra mayor efectividad. También se muestra que *Staphylococcus aureus* con una densidad de inóculos de 10^4 UFC/ml es inhibido por el ajo a una concentración de 15.00-60.00 mg/ml (22). El efecto bactericida del ajo podría deberse a las características estructurales de los organismos, los cuales juegan un papel en la susceptibilidad bactericida a los componentes del ajo. En particular *S. aureus* contiene sólo 2% de lípidos, por lo que el contenido de lípidos de la membrana tendrá un efecto sobre la permeabilidad de la alicina y otros compuestos del ajo, por lo tanto estos fenómenos pueden favorecer la destrucción de la pared celular y el material genético de *S. aureus* (32).

Independiente a lo anterior se ha mostrado que el ajo puede inhibir completamente el crecimiento de *S. aureus* a una concentración de más de 7.50mg/ml. Esto podría ser debido a la acción del ingrediente biológico activo, es decir la alicina, que exhibe actividad antimicrobiana principalmente inhibiendo inmediatamente y totalmente la síntesis de ARN, aunque la síntesis de ADN y proteínas también es parcialmente inhibida, se sugiere que el ARN es la principal vía de acción de la alicina (33).

En un estudio se determinó la actividad bactericida de 19 productos naturales para la salud (PNS) que contenían ajo, los cuales fueron puestos a prueba contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*

faecalis. La concentración mínima bactericida y la concentración mínima inhibitoria fueron determinadas por el método de microdilución. Un 47% del extracto de ajo de los PNS exhibió actividad contra *N. gonorrhoeae*, sólo 16% del extracto de ajo de los PNS inhibió a *S. aureus* y *E. faecalis*. Generalmente los productos con alta actividad antimicrobiana contienen altos niveles de ajo con actividad comparable a la de los extractos de ajo fresco. Mientras que los productos con baja actividad bactericida a menudo contienen bajas concentraciones de ajo de lo que sus etiquetas indican, lo cual concierne a los estándares de preparación y control de calidad de estos productos (34).

La alicina (Alil 2- propenetiolsulfonato) es el principio antibacterial del ajo el cual ha llamado mucho la atención por su potente actividad antimicrobiana contra una variedad de organismos incluido *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Hay reportes de las actividades antimicrobianas de la alicina pero no hay una comparación cuantitativa de las actividades antibacteriales entre el preparado de extracto de ajo fresco y el uso de antibióticos. Para verificar el efecto antibacterial del extracto de ajo, se comparó éste con la alicina y el uso de varios antibióticos usando 2 bacterias representativas que se encuentran en el humano, *S. aureus* y *E. coli*. El extracto de ajo tuvo más actividad anti – *Staphylococcus*. Mientras que la capacidad de inhibición de los antibióticos con alicina en las bacterias fue: estreptomina-alicina de 1-2% de inhibición contra *S. aureus*, vancomicina-alicina 8% de inhibición contra *S. aureus* y por último colistina-alicina tuvo 0.2% de inhibición contra *E.coli*. La actividad bactericida de la alicina fue completamente abolida por cisteína, glutatona y coenzima A, es decir compuestos sulfidrilos. El elemento oxígeno en la estructura (S (=O)-S-) de la alicina tiene como función liberar S-Alil el cual puede ser una herramienta ofensiva contra la bacteria (35).

El ajo a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 g por 100g de alimento que se le administró por 14 días a la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) la cual se infectó experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*, mostró los siguientes datos a dosis de 0.5 y 1.0 g de ajo por 100g de alimento, hubo una reducción en la mortalidad de *O. mykiss* (Walbaum) del 4%. Además se presentó un incremento significativo en su crecimiento, conversión de

alimento y eficiencia proteica. Hubo una estimulación en el número de eritrocitos y leucocitos, un aumento en la actividad fagocítica, respiratoria, anti-proteasa y actividades bactericidas seguidas de la alimentación con ajo (36).

Por su parte *Morinda citrifolia* también ha mostrado actividad bactericida y antifúngica. En un estudio se empleó extracto de jugo de *M. citrifolia* el cual fue liofilizado y usado para pruebas antifúngicas por lo que la actividad de *M. citrifolia* contra *Candida albicans* fue probada *in vitro* a varias concentraciones y a diferentes tiempos, el efecto inhibitorio de *M. citrifolia* sobre *C. albicans* fue determinado por el método caldo-dilución. El crecimiento de *C. albicans* no fue detectado con 50 mg/ml de extracto de *M. citrifolia* a 30 minutos del tiempo inicial o con 60 mg/ml de extracto a 15 minutos del tiempo inicial. Para la prueba de dilución en cultivo, la concentración mínima fungicida del extracto contra *C. albicans* fue 40 mg/ml a los 90 minutos del tiempo inicial y con 50 mg/ml a 15 minutos del tiempo inicial (37).

En un estudio reciente se ha reportado que las propiedades antimicrobiales del extracto metanólico del fruto maduro del noni exhibe inhibición sobre bacterias gastroentéricas aisladas de peces marinos, tales bacterias son *E. coli*, *Streptococcus* sp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* sp, y *Vibrio cholerae*. Además se encontró que el extracto acuoso inhibe a *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* a una concentración de 5 mg/disco (5000 µg/disco) (38).

También el extracto metanólico del fruto de *M. citrifolia* muestra actividad inhibitoria sobre *Salmonella paratyphi* y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión a una concentración de 100 mg/ml (1000 µg/ml) (39).

En un estudio la actividad bactericida del extracto de las hojas del noni fue eficaz a una concentración de 1000 µg/ml para *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (25).

Morinda citrifolia es reconocida como un producto natural que posee un extenso rango de efectos inmunomodulatorios, se realizaron estudios sobre el aumento de la actividad bactericida contra *E. coli* presente en terneros, los cuales fueron alimentados con puré de *M. citrifolia*. Los terneros fueron divididos en 2 grupos: grupo 1 terneros control y grupo 2 terneros alimentados con puré de noni, los cuales recibieron 30 ml dos veces al día reemplazando la leche que consumían, las pruebas de sangre obtenidas fueron presentadas para estimar el porcentaje de inhibición de *E. coli* y *Staphylococcus epidermis*. Las muestras de sangre de los terneros alimentados con puré de noni fueron más significativas en la inhibición de *E. coli* que en los controles en el día 14, sin embargo los días 3 y 7 no hubo diferencia significativa entre los 2 grupos para la inhibición de *S. epidermis* (41).

Dos experimentos consecuentes condujeron a un estudio en general, en el experimento 1 se obtuvo leche de vaca con mastitis para identificar los tipos de bacterias que la causan, la leche presentaba *Staphylococcus* sp (76.92%), *Streptococcus* sp (15.38%) y *E. coli* (7.69%), Se empleó en conjunto *Morinda citrifolia* y *Allium sativum* para reducir el número de bacterias identificadas. En el experimento 2 se emplearon antibióticos como la penicilina para el tratamiento de la mastitis. Se observó que la mezcla de *M. citrifolia* y *A. sativum* pueden eliminar la mastitis e inhibir mucho mejor la carga bacteriana en comparación a la penicilina (42).

JUSTIFICACIÓN

Un gran número de enfermedades causadas por bacterias son controladas con medicamentos, sin embargo algunos padecimientos ya no son controlados tan fácilmente debido a que dichos microorganismos establecen resistencia a ciertos antibióticos por la evolución de cepas mutantes, que por cambio de su estructura o bioquímica consiguen bloquear la acción de antibióticos y no se muestran sensibles a estos. Los antibióticos han mostrado ser eficaces contra un gran número de microorganismos sin embargo el uso continuo y prolongado de éstos al ser sustancias químicas sintéticas provocan reacciones nocivas a la salud como complicaciones en la flora bacteriana, acciones nocivas específicas de cada antibiótico, alergias a las que es susceptible cada individuo. Debido a esto se ha optado por la búsqueda de nuevas alternativas que eviten dañar el organismo y que presenten actividad antimicrobiana para el control de padecimientos, una opción al tratamiento de enfermedades es el noni (*Morinda citrifolia*) del cual aunque su acción antimicrobiana no es tan conocida ha mostrado actividad bactericida principalmente contra *Staphylococcus aureus*. Ahora bien, sí es conocida la acción de este compuesto natural contra diversas bacterias, aunque no se han desarrollado trabajos de *M. citrifolia* contra micoplasmas probablemente por la dificultad de crecimiento de estas bacterias *in vitro*, sin embargo los micoplasmas juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades graves tanto del tracto respiratorio y urogenital. La finalidad del presente trabajo es probar *in vitro* si el jugo fresco de *M. citrifolia* presenta actividad bactericida contra micoplasmas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad bactericida del jugo fresco de *Morinda citrifolia* contra micoplasmas de interés médico como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma fermentans*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la colecta de *Morinda citrifolia* y su identificación taxonómica.
2. Obtener jugo fresco de *Morinda citrifolia*.
3. Identificar los componentes del jugo fresco de *Morinda citrifolia* por medio de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM)

HIPÓTESIS

La composición de *Morinda citrifolia* ha mostrado actividad antimicrobial en diferentes microorganismos, por lo tanto, de acuerdo a las características morfológicas de los micoplasmas estos también resultarán susceptibles.

MATERIAL Y MÉTODO

Microorganismos

Cepas de micoplasmas: *Mycoplasma fermentans* ATCC 19989 y los aislamientos clínicos de: *Mycoplasma fermentans* P-140, *Mycoplasma pneumoniae* Eaton y *Mycoplasma penetrans* HF del Hospital Universitario de Puebla y del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los cultivos bacterianos se mantuvieron en medio SP-4 incubándolos a 37° C durante 24 horas.

Material biológico y preparación

Morinda citrifolia (noni) fue colectado en Minatitlán-Veracruz, México, identificado y depositado su voucher (número de espécimen 20253) en el Herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Mil quinientos gramos del fruto se lavaron con agua estéril, se cortaron en pequeños trozos y se licuaron utilizando una licuadora eléctrica. El jugo de noni se analizó por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM). El análisis fue llevado a cabo en un equipo Agilent 5973 Network System (CA, USA) el cual cuenta con una columna HP6890 DB-5 (30 m de largo x 0.25 mm de ancho, 0.25 µm del grosor de la capa). La temperatura del horno en el tiempo inicial fue de 56° C/1 min, aumentó hasta 194° C con incrementos de 12° C/1 min, seguidos por una temperatura baja de 10° C/1 min hasta alcanzar 280° C/15 min. La temperatura de entrada fue de 250° C y la temperatura de la fila transferida fue de 280° C. El portador del gas fue helio 1.0 ml/1 min. La comparación de los datos espectrales fue mediante la base de datos NIST02 CG-EM.

Ensayo de la actividad bactericida

La actividad bactericida del jugo de *Morinda citrifolia* fue realizada por microdiluciones en placas de 96 pozos, el inóculo inicial de cada uno de los cultivos bacterianos fue de 1×10^6 UFC/ml. Los ensayos realizados fueron los siguientes: Ensayo (1) 800 µl de cultivo de *Mycoplasma fermentans*, 100 µl de caldo SP-4 y 100 µl del jugo de noni. Ensayo (2) 700 µl de cultivo de *M. fermentans*, 100 µl de caldo SP-4 y 200 µl del jugo de noni. Ensayo (3) 600 µl de cultivo de *M. fermentans*, 100 µl de caldo SP-4 y 300 µl del jugo de noni.

Ensayo (4) 500 µl de cultivo de *M. fermentans*, 100 µl de caldo SP-4 y 400 µl del jugo de noni. Ensayo (5) 400 µl de cultivo de *M. fermentans*, 100 µl de caldo SP-4 y 500 µl del jugo de noni.

Ensayo control del jugo: 500 µl de caldo SP-4 y 500 µl del jugo de noni.

Ensayo control de cepa: 500 µl de caldo SP-4 y 500 µl de *M. fermentans*.

Los ensayos se hicieron por triplicado; para cada una de las especies de micoplasmas se realizaron los esquemas mencionados (Tabla 1).

También se evaluó la actividad bactericida del jugo de *Morinda citrifolia*, realizando la neutralización del pH adicionando 4, 8, 12, 16 y 20 µl de NaOH 1N a la combinación del caldo SP-4 y el jugo de *M. citrifolia*, en seguida se adicionó el volumen del cultivo bacteriano, en cada uno de los cinco ensayos, respectivamente (Tabla 2).

Los ensayos se incubaron a 37°C durante 72 horas, a partir del tiempo inicial, cada 24 horas se resembraron 5 µl de cada uno de los ensayos en agar SP-4 y se incubaron a 37°C, cuantificando por medio de microscopía estereoscópica el número de UFC/ml.

Análisis estadístico

La comparación de los valores cuantificados de UFC/ml entre los grupos experimentales y control fue realizada con la prueba T Student (software INSTAT 2.0), la comparación fue considerada estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.05$.

Tabla 1. Ensayos para evaluar la actividad bactericida del jugo de *Morinda citrifolia*.

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ensayo 1 | 800 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 100 µl caldo SP-4 100 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |
| Ensayo 2 | 700 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 100 µl caldo SP-4 200 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |
| Ensayo 3 | 600 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 100 µl caldo SP-4 300 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |
| Ensayo 4 | 500 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 100 µl caldo SP-4 400 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |
| Ensayo 5 | 400 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 100 µl caldo SP-4 500 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |
| Control | 500 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 500 µl caldo SP-4 |
| Control | 500 µl caldo SP-4 500 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |

Los ensayos se realizaron con *M. fermentans* ATCC 19989, *M. fermentans* P-140, *M. pneumoniae* Eaton y *M. penetrans* HF.

Tabla 2. Ensayos para evaluar la actividad bactericida del jugo de *Morinda citrifolia*, neutralizando el pH.

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ensayo 1 | 100 µl caldo SP-4 100 µl jugo o extracto de <i>M.citrifolia</i> 4 µl NaOH 1N 800 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml |
| Ensayo 2 | 100 µl caldo SP-4 200 µl jugo o extracto de <i>M.citrifolia</i> 8 µl NaOH 1N 700 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml |
| Ensayo 3 | 100 µl caldo SP-4 300 µl jugo o extracto de <i>M.citrifolia</i> 12 µl NaOH 1N 600 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml |
| Ensayo 4 | 100 µl caldo SP-4 400 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> 16 µl NaOH 1N 500 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml |
| Ensayo 5 | 100 µl caldo SP-4 500 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> 20 µl NaOH 1N 400 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml |
| Control | 500 µl cultivo de micoplasma 1x10 ⁶ UFC/ml 500 µl caldo SP-4 |
| Control | 500 µl caldo SP-4 500 µl jugo o extracto de <i>M. citrifolia</i> |

Los ensayos se realizaron con *M. fermentans* ATCC 19989, *M. fermentans* P-140, *M. pneumoniae* Eaton y *M. penetrans* HF.

RESULTADOS

Los cultivos de las especies de micoplasma se obtuvieron a las 72 horas de incubación a una temperatura de 37°C. Con respecto a la preparación del jugo de *Morinda citrifolia*, por cada 1.5 kg de fruto se obtuvieron 500 ml (100% jugo de noni) con pH 3.5

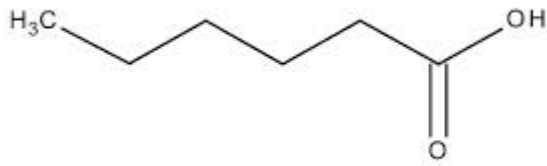
El análisis cromatográfico del jugo del fruto de *Morinda citrifolia* muestra la presencia de diversos compuestos como es el caso de: manitol, vitamina D3, alantoína, ácido hexadecanoico, ácido caproico, ácido octanoico, entre otros (Tabla 3, figura 3).

El jugo de *M. citrifolia* en los ensayos experimentales contra: *M. fermentans* P-140, *M. pneumoniae* y *M. penetrans* HF, muestra alta actividad bactericida a las 24 horas del tiempo inicial con 1×10^3 UFC/ml. Sin embargo la cepa de referencia *M. fermentans* ATCC 19989 muestra ser más sensible durante ese tiempo a la actividad del jugo de *M. citrifolia* con 1×10^2 UFC/ml. Se observa que a las 48 y 72 horas del tiempo inicial el jugo de *M. citrifolia* inhibe totalmente la carga bacteriana de todas las cepas de micoplasmas como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3 Compuestos identificados en el jugo del fruto de *Morinda citrifolia* por CG-EM

| # | RT | ÁREA % | Library /ID | Ref # | CAS # | Qual |
|----|-------|--------|--------------------------|--------|-------------|------|
| 1 | 4.56 | 3.53 | Ácido hexanoico | 7851 | 000142-62-1 | 90 |
| 2 | 5.82 | 1.40 | Ciclopropil carbinol | 674 | 002516-33-8 | 39 |
| 3 | 6.80 | 6.82 | Ácido octanoico | 19985 | 000124-07-2 | 90 |
| 4 | 7.44 | 3.25 | 2- Furancarboxaldehido | 10771 | 000067-47-0 | 76 |
| 5 | 8.83 | 0.14 | n- Ácido decanoico | 37132 | 000334-48-5 | 91 |
| 6 | 10.01 | 0.32 | d- Manitol | 32132 | 007726-97-8 | 40 |
| 7 | 10.37 | 0.21 | 2- Carbamil | 114507 | 121358-21-2 | 47 |
| 8 | 11.84 | 0.34 | Vitamina d3 | 152557 | 001406-16-2 | 30 |
| 9 | 12.94 | 0.04 | Alantoina | 28385 | 000097-59-6 | 25 |
| 10 | 14.61 | 0.07 | Ácido pentadecanoico | 100724 | 005129-60-2 | 95 |
| 11 | 15.15 | 1.24 | n- Ácido hexadecanoico | 92228 | 000057-10-3 | 97 |
| 12 | 17.01 | 14.11 | 9,12 Ácido octadecanoico | 106289 | 000060-33-3 | 96 |
| 13 | 19.56 | 1.44 | Cyclododecyne | 31957 | 001129-90-4 | 93 |
| 14 | 27.51 | 28.79 | 1,5 Ciclododecadieno | 15192 | 001124-78-3 | 86 |
| 15 | 30.41 | 6.75 | 5 α - androstan | 122230 | 000564-29-4 | 46 |

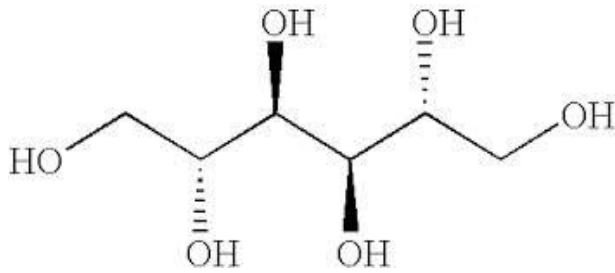
Donde # corresponde a la posición en el que fue encontrado el fitoquímico, RT (Tiempo de retención, cantidad del compuesto que se mantiene en una duración determinada), Área (superficie del fitoquímico en el jugo), Library/ID (nombre de la sustancia química de acuerdo a la base de datos del programa con el que se comparó), Ref. (número de referencia de acuerdo a la base de datos), CAS # (identificación numérica única del compuesto químico) y Qual (el grado de pureza de la sustancia química).



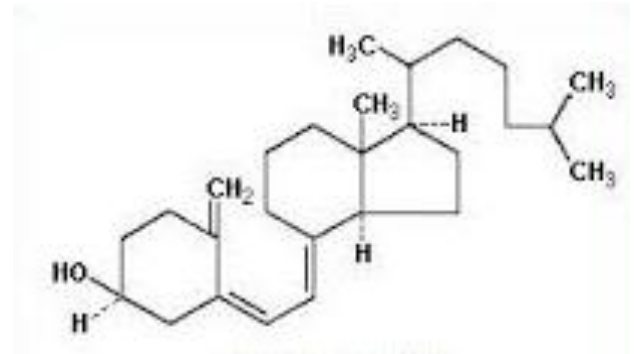
Ácido hexanoico



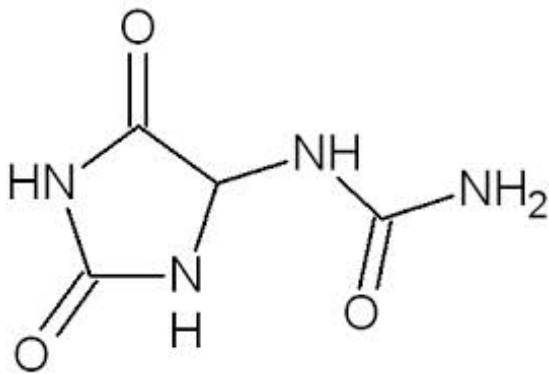
Ácido octanoico



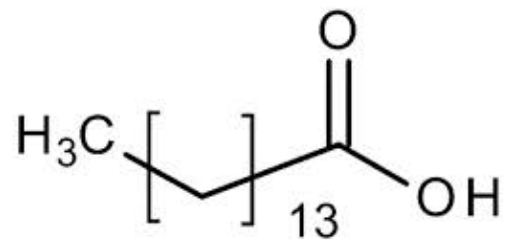
D-Manitol



Vitamina D3



Alantoína



Ácido pentadecanoico

Figura 3. Estructuras químicas de algunos compuestos identificados en el jugo del fruto de *M. citrifolia*.

Tabla 4. Datos comparativos entre los ensayos, evaluando la actividad bactericida del jugo de *M. citrifolia*.

| Tiempo (hrs) | <i>M. fermentans</i> ATCC 19989 | <i>M. fermentans</i> P-140 | <i>M. pneumoniae</i> Eaton | <i>M. penetrans</i> HF |
|---------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 0 Exp | 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁶ |
| 24 Exp | 1 x 10 ² | 1 x 10 ³ | 1 x 10 ³ | 1 x 10 ³ |
| 48 Exp | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 72 Exp | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 Control | 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁶ |
| 24 Control | 1 x 10 ⁵ - 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁴ - 1 x 10 ⁵ | 1 x 10 ⁵ - 1 x 10 ⁶ | 1 x 10 ⁵ - 1 x 10 ⁶ |
| 48 Control | 1 x 10 ⁴ - 1 x 10 ⁵ | 1 x 10 ⁴ | 1 x 10 ⁴ - 1 x 10 ⁵ | 1 x 10 ⁴ - 1 x 10 ⁵ |
| 72 Control | 1 x 10 ⁴ | 1 x 10 ⁴ | 1 x 10 ⁴ | 1 x 10 ⁴ |

Cada uno de los datos es el promedio de los ensayos por triplicado, en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

En la Tabla 5 se muestra que *M. fermentans* ATCC 19989 es más sensible que las otras cepas de micoplasmas. A las 24 horas del tiempo inicial *M. pneumoniae* es más sensible que las demás especies, presentando 1×10^4 UFC/ml. A las 48 horas del tiempo inicial *M. fermentans* ATCC 19989 y *M. pneumoniae* son más sensibles respecto a *M. fermentans* P-140 y *M. penetrans* HF. A las 72 horas del tiempo cero se muestra total inhibición de todas las cepas de micoplasmas examinados (Figura 4). Sin embargo al neutralizar el pH de *M. citrifolia* revierte un tanto su actividad microbiana, por lo que claramente la actividad bactericida es más óptima con pH ácido (Figura 5). La comparación estadística mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de los grupos control y experimental a las 72 horas.

Tabla 5 Datos comparativos entre los ensayos, evaluando la actividad bactericida del jugo de *M. citrifolia* (con pH neutralizado)

| Tiempo (hrs) | <i>M. fermentans</i> ATCC 19989 | <i>M. fermentans</i> P-140 | <i>M.pneumoniae</i> Eaton | <i>M. penetrans</i> HF |
|---------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 Exp. | 1×10^6 | 1×10^6 | 1×10^6 | 1×10^6 |
| 24 Exp. | 1×10^5 | 1×10^5 | 1×10^4 | 1×10^5 |
| 48 Exp. | 1×10^3 | 1×10^4 | 1×10^3 | 1×10^4 |
| 72 Exp. | 0 | 1×10^3 | 1×10^2 | 1×10^3 |
| 0 Control | 1×10^6 | 1×10^6 | 1×10^6 | 1×10^6 |
| 24 Control | 1×10^5 - 1×10^6 | 1×10^5 - 1×10^6 | 1×10^5 - 1×10^6 | 1×10^5 - 1×10^6 |
| 48 Control | 1×10^5 | 1×10^5 | 1×10^5 | 1×10^5 |
| 72 Control | 1×10^4 | 1×10^4 | 1×10^4 | 1×10^4 |

Cada uno de los datos es el promedio de los ensayos por triplicado, en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

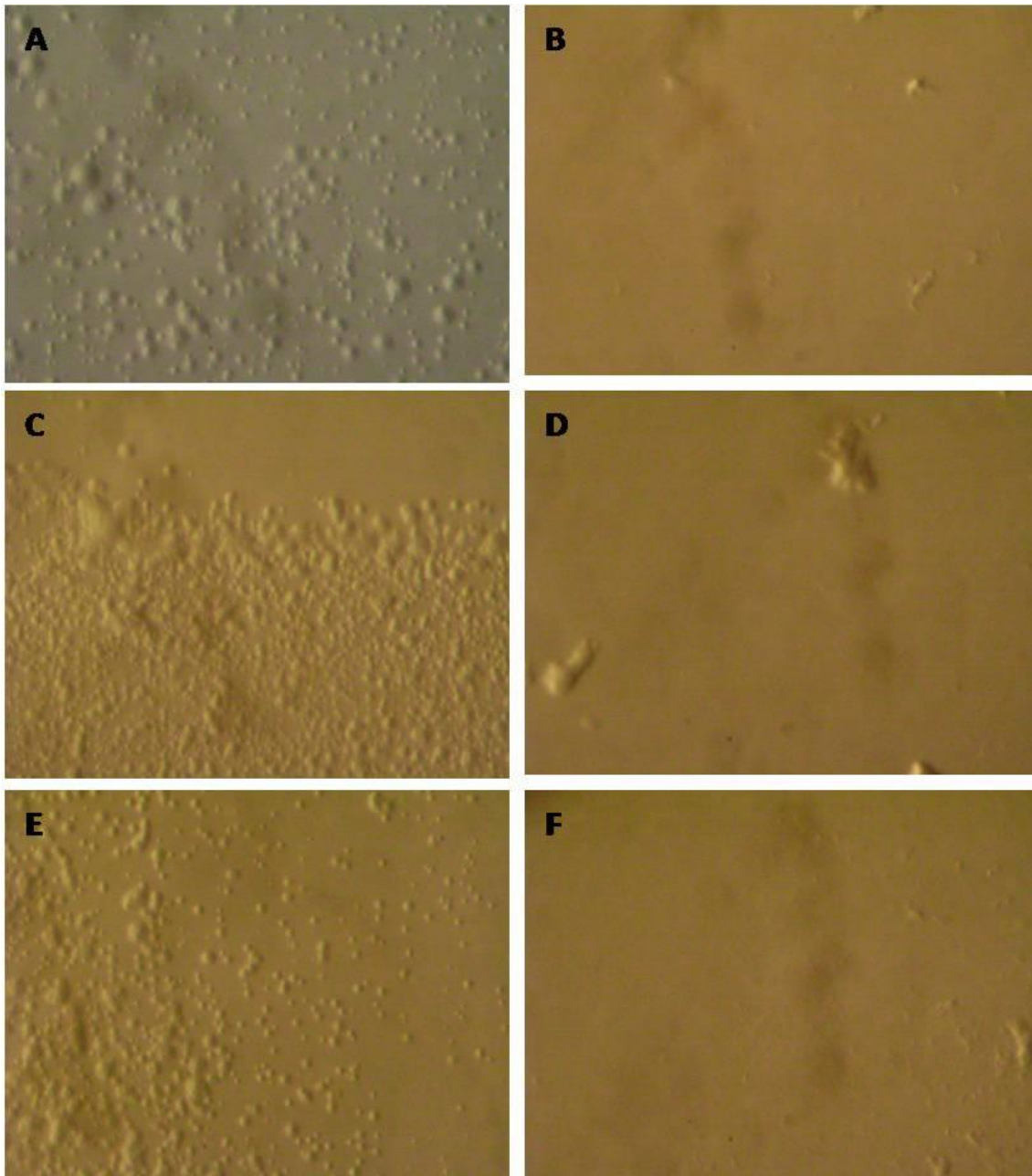


Figura 4. Micoplasmas con extracto de *Morinda citrifolia*. (A) *M. fermentans* inicial (control). (B) *M. fermentans* a las 72 horas con noni (experimental). (C) *M. penetrans* inicial (control). (D) *M. penetrans* a las 72 horas con noni (experimental). (E) *M. pneumoniae* inicial (control). (F) *M. pneumoniae* a las 72 horas con noni (experimental). Se observa buena actividad bactericida de *Morinda citrifolia* sin el pH neutralizado. Hay inhibición de todas las cepas de micoplasmas.

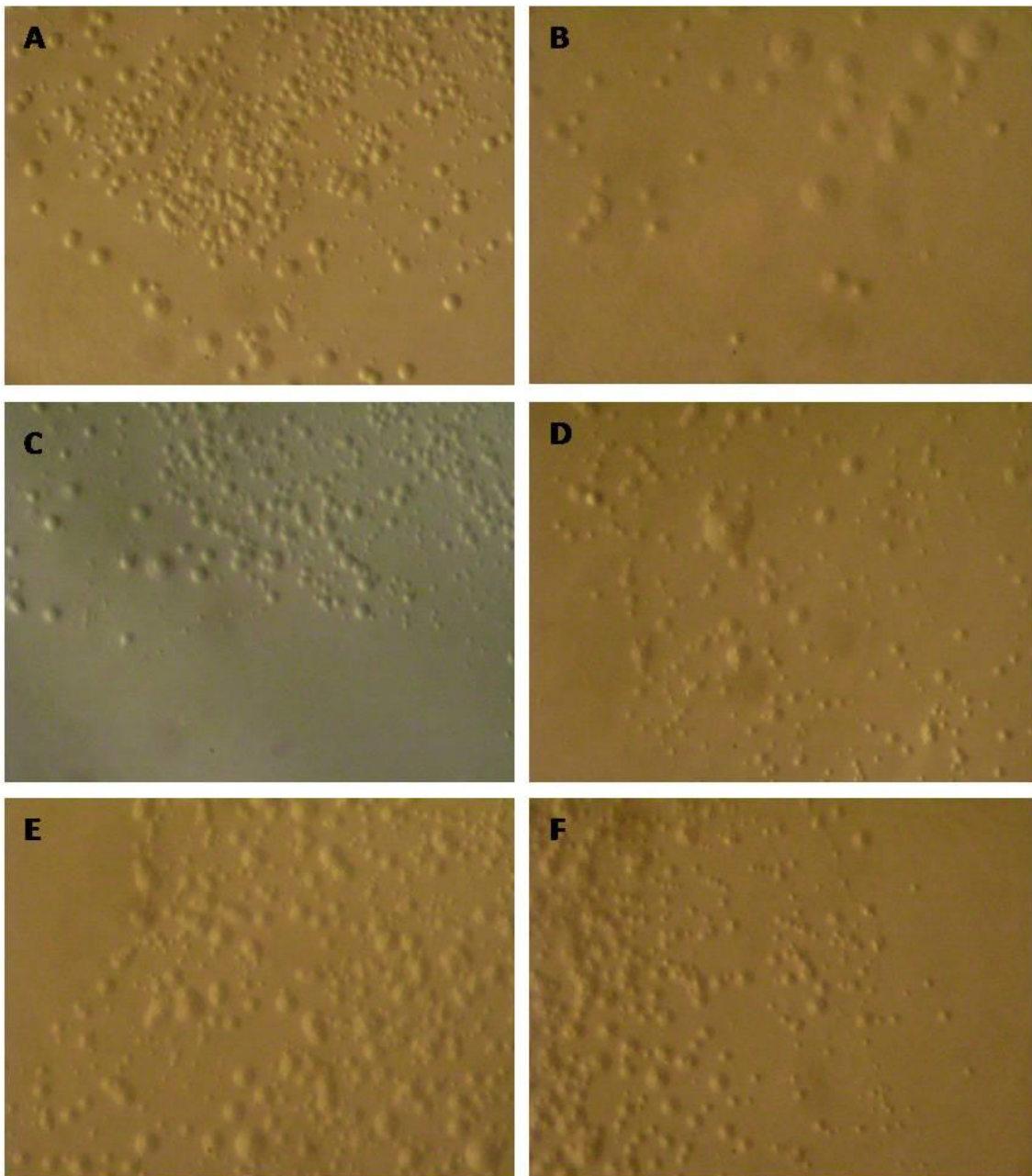


Figura 5. Micoplasmas con el extracto de *Morinda citrifolia* con pH neutralizado. (A) *M. pneumoniae* inicial (control). (B) *M. pneumoniae* a las 72 horas con noni (pH neutralizado, experimental), (C) *M. penetrans* grupo control. (D) *M. penetrans* a las 72 horas con noni (pH neutralizado, experimental). (E) *M. fermentans* grupo control. (F) *M. fermentans* a las 72 horas (pH neutralizado, experimental). Se observa que al neutralizar el pH de *M. citrifolia* disminuye su actividad bactericida por lo que el número de UFC/ml no disminuye en demasía con respecto al tiempo inicial.

DISCUSIÓN

Las propiedades medicinales atribuidas a *Morinda citrifolia* son diversas, se ha probado su actividad antimicrobiana en un gran número de organismos sin embargo no hay estudios contra micoplasmas, siendo este el primer reporte de la evaluación del jugo de *Morinda citrifolia* contra micoplasmas (43), los cuales son importantes por ser causantes de diversas enfermedades y principalmente por carecer de pared celular y ser resistentes a diversos antibióticos. Debido a la falta de pared celular los micoplasmas son resistentes a todos los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas) (44).

Los micoplasmas son principalmente conocidos como patógenos de las mucosas que residen extracelularmente en las superficies epiteliales. Algunas especies de micoplasmas tienen el potencial de fusionarse e ingresar a células que no fagocitan, no debería ser inesperado para microorganismos con escasez de pared que por lo general están relacionados con las superficies de una célula huésped. La facilidad de los micoplasmas de atravesar las barreras de las mucosas y el aumento de acceso a los tejidos internos reducen la eficacia de los fármacos en la erradicación de estos organismos en condiciones clínicas (45).

La fusión de la membrana celular del micoplasma con la del hospedero, resulta en la liberación de varias enzimas hidrolíticas por el micoplasma así como la inserción de componentes de la membrana micoplasmática en la membrana de la célula hospedera lo cual es un proceso que podría alterar potencialmente los sitios de reconocimiento a receptores y afectar la expresión e inducción de citoquinas.(46).

El presente estudio mostró claramente la presencia de 15 compuestos en el fruto de *Morinda citrifolia* entre los que destacan por su importancia médica: ácido octanoico, ácido hexadecanoico, alantoina, manitol y ácido n- decanoico (43). La toxicidad del ácido hexanoico a la bacteria *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e insectos ha sido reportada (47).

Por otro lado se ha demostrado la actividad inhibitoria de los ácidos grasos en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. El ácido graso palmitoleico mostró potente inhibición de crecimiento contra *S. aureus*, las células que se trataron con este ácido exhibieron una rápida despolarización de membrana, la ruptura de los principales enlaces de síntesis macromolecular y la liberación de solutos y proteínas de bajo peso molecular dentro del medio. Otros lípidos citotóxicos como el glicerol, éteres, esfingosina y acilaminas bloquean el crecimiento mediante los mismos mecanismos. El metabolismo del ácido palmitoleico usa inhibidores para prevenir la formación de la proteína transportadora acil-acil o la actividad de la acetiltransferasa glicerol-fosfato (48).

Debido a la actividad bactericida que presentan también otras especies de la familia Rubiaceae hace suponer que *Morinda citrifolia* perteneciente a la misma familia actúa de forma similar (49). El compuesto (1,8 dihidroxi-2-metil-3,7 dimetoxiantraquinona) en *Morinda angustifolia* demostró significativa actividad antimicrobial contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina lutea*, *Candida albicans* y *Saccharomyces sake* (50).

Koffi et al, 2010. demostraron actividad bactericida *in vitro* de *Morinda morindoides* contra el crecimiento de *Vibrio cholerae* O:1 a una concentración mínima bactericida de 5 mg/ml. Las propiedades antibacteriales de esta planta medicinal pueden ser de gran beneficio para el manejo del cólera (51).

Se ha comprobado que el propóleo junto con *Morinda citrifolia* han sido efectivos contra *Enterococcus faecalis* que infecta el conducto de la raíz de la dentina de los dientes extraídos (52).

Por otro lado la raíz de *Terminalia glaucescens*, la raíz de *Morinda lucida* y el fruto de *Cnestis ferruginea* mostraron apreciable actividad *in vitro* contra *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Peptostreptococcus prevotii* (53).

Las antraquinonas 1 – hidroxil-2-metil-antraquinona, nordamnacantal, damnacantal, lucidin-metil-éter, rubiadin-1-metil éter, soranjidiol, morindona morindona-5-metil éter, alizarina-1-metil éter y 2-formil-1-hidroxiantraquinona,

fueron extraídas de las raíces de *Morinda elliptica* para probar actividad anti-VIH , citotóxica y antimicrobial. El damnacantal mostró moderada actividad contra el VIH , fue citotóxico en las líneas celulares de carcinoma de pecho y leucemia linfoblástica ; junto con nordamnacantal y morindona los tres mostraron fuerte actividad antimicrobial (54).

Siete antraquinonas fueron extraídas *in vitro* de las raíces de *Morinda royoc L.*, éstas fueron probadas por su actividad antimicrobial contra siete cepas de bacterias y levaduras. El extracto mostró actividad a una concentración mínima inhibitoria de 16.5 microg/ml contra todas las especies de *Candida* e inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (55).

Banerjee et al, 2006. Demostraron que el extracto de *Morinda citrifolia* interfiere con el suero que induce la formación de las estructuras filamentosas de *Candida albicans* e inhibe la germinación de *Aspergillus nidulans*. *M. citrifolia* puede ser un potencial terapéutico contra candidiasis y aspergilosis (56).

Los extractos acuosos de *Morinda lucida* y *Ocimum gratissimum* han mostrado actividad contra *Salmonella tiphy* a una concentración mínima inhibitoria de 9.60 mcg/ml para *M. lucida* y de 40 mcg/ml para *O. Grastissimum*, respectivamente. Las plantas mostraron reacciones positivas a alcaloides, taninos, flavonoides y antraquinonas en grados variables (57).

Noventa extractos obtenidos de las hojas, corteza y tallo de trece plantas de la familia Rubiaceae y dos plantas de la familia Meliaceae fueron exploradas por sus actividades antibacteriales y antifúngicas *Morinda tinctoria*, *Mussaenda frondosa*, *Psychotria gardneri* y *Psychotria stenophylla* mostraron el más amplio espectro de actividad bactericida (58).

Por otro lado un estudio reciente indica que el extracto hidroalcohólico del fruto de *Morinda citrifolia* es tan efectivo como la gentamicina un antibiótico estándar usado comúnmente para el tratamiento de la sepsis provocado por *E. coli*. *In vivo* se revela la capacidad del extracto para prevenir alteraciones fisiológicas en el comienzo del padecimiento como el pulso, la respiración, la

temperatura corporal. Hay una probable correlación entre la actividad inmunoestimulante y el potencial anti-infectivo (59).

Se ha investigado que *M. citrifolia* está involucrado en procesos inmunomoduladores en estudios *in vitro* e *in vivo* en el ratón. A una concentración de 1.5 mg/ml activa el receptor canabinoide 2 (CB2) pero inhibe el receptor canabinoide 1 (CB1). Estos resultados sugieren que el noni modula el sistema inmune activando los receptores CB2 y suprimiendo el IL-4 pero incrementando la producción de IFN-gamma citoquinas. Podría emplearse para efectos benéficos de inmunomodulación en condiciones que involucran una respuesta inmune inadecuada (60).

Skrivanová et al, 2007. Demostraron la influencia del pH en la actividad antimicrobial de los ácidos orgánicos contra la cepa enteropatógena *Escherichia coli*, en el conejo. Cerca del pH neutro los ácidos caproicos y caprilicos reducen la concentración de células viables. La actividad bactericida del ácido caproico fue baja a un pH de 6.5 pero fue incrementada a un pH de 5.3, lo que muestra que un ambiente en acidez tiene la capacidad de ser bactericida (61).

El presente trabajo muestra la actividad bactericida de *Morinda citrifolia* contra diferentes cepas de micoplasmas. Se desconocen los mecanismos moleculares sobre los cuales actúa *M. citrifolia* sin embargo; el pH, sus compuestos y la actividad inmunomoduladora que ejerce sobre los microorganismos son los posibles mecanismos sobre los que actúa para dicha inhibición. La acidez de *M. citrifolia* es un factor importante para la inhibición de la síntesis de la membrana celular de los micoplasmas evitando así su proliferación.

CONCLUSIÓN

1. El jugo de *M. citrifolia* manifestó *in vitro* actividad bactericida contra los micoplasmas aislados examinados. Mostró total inhibición contra *M. fermentans*, *M. pneumoniae* y *M. penetrans* a las 48 y 72 horas respecto del tiempo inicial sin el pH neutralizado.
2. El análisis del jugo del fruto de *M. citrifolia* por cromatografía de gases y espectrometría de masas evidenció la presencia de al menos quince compuestos; algunos de los que se encontraron son: ácido hexanoico, ciclopropil-carbinol, ácido octanoico, manitol, vitamina D3, alantoina y N-ácido hexadecanoico.
3. La cromatografía de gases resultó una técnica útil para la separación de compuestos orgánicos del jugo de noni que en conjunto con la espectrometría de masas permitió una identificación más precisa de los componentes separados mediante la ionización de moléculas de dichas sustancias encontradas en el jugo de *M. citrifolia* . De esta forma se pudo elucidar y comparar de acuerdo a la base de datos la estructura y propiedades químicas de las moléculas encontradas.

RECOMENDACIONES

Se requieren hacer más experimentos *in vitro* e *in vivo* del jugo del fruto contra micoplasmas de importancia médica los cuales son necesarios para proveer información más detallada sobre el potencial de este producto natural como posible antibiótico, ya que cada persona puede reaccionar de forma distinta a los compuestos de la planta, si es usado de forma adecuada este producto natural puede ser un potencial fármaco antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Singlenton Paul. Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. 4^{ta} edición. Editorial Wiley. New York, USA.2004. Pp 1, 2, 8-10.
- 2 Rang HP, Dale MM. Farmacología de Rang y Dale. 6^{ta} edición.Editorial Elsevier. Barcelona, España.2008. Pp 661.
- 3 Planelles J, Jaritónova A. Efectos Nocivos consecutivos al empleo de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Editorial Progreso. Moscú.1967. Pp 23.
- 4 Blanchard A, Browning G. Mycoplasmas: Molecular biology pathogenicity and strategies for control. Horizon Bioscience.Melbourne, Australia. 2005. Pp 289-354.
- 5 Mandell GL, Bennet J, Dolin R. Enfermedades infecciosas: principios y práctica. 4^{ta} edición.Editorial Médico - Panamericana. Buenos aires, Argentina. 1997. Pp 682-685.
- 6 Taylor-Robinson D. Infections due to species of mycoplasmas and ureaplasmas: an update. Clinical Infectious Diseases 1996; 23(4): 671-682.
- 7 Waites KB, Talkington DF, Bébéar CM. Manual of commercial Methods in Clinical Microbiology. Allan L. Truant American Society for Microbiology. Washington, D.C.2002. Pp256.
- 8 Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998; 62: 1094-1156.

- 9 Béaber C, Berbeyrac B, Bébéar M, Renaudin H. New developments in diagnostic and treatment alternatives of *Mycoplasmas* infections in humans. *Wien Klin Wochenschr* 1997; 15: 5494-5499.
- 10 Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, van der Nat H, Bartelds AI, Heijnen ML. Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 183: 675-678.
- 11 Loo VG, Richardson S, Quinn P. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from pleural fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1991; 14: 443-445.
- 12 Stevens MK, Krause DC. Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytodherence accessory proteins HMW1 and HMW4 in the cytoskeleton like triton shell. *The Journal of Bacteriology* 1991; 173: 1041-1050.
- 13 Biscardi S, Larrot M, Marc E, Moulin F, Boutonnat-Faucher B. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 8: 1341-1346.
- 14 Katseni VL, Gilroy CB, Ryaik BK, Ariyoshi K, Bieniaz PD, Weber JN, Taylor-Robson D. *Mycoplasma fermentans* in individuals seropositive and seronegative for HIV-1. *Lancet* 1993; 341: 271-273.
- 15 Johnson S, Sidebottom D, Bruckner F, Collins D. Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 90-93.
- 16 Lo SC, Hayes MM, Tully JG, Wang RY-H, Kotani H. *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1992; 42: 375-364.

- 17 Brenner C, Neyrolles O, Blanchard A. Mycoplasmas and HIV infection: from epidemiology to their interaction with immune cells. *Frontiers in Bioscience* 1996; 1: 42-54.
- 18 Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17: 697-728.
- 19 Rosengarten R, Citti C, Glew M, Lischewski A, Drosesse M, Much P. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *Journal of Medical Microbiology* 2000; 290:15-25.
- 20 Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L (Papaveraceae). *Pharmacological Research* 1996; 33: 127-134.
- 21 Ayandele A, Adebisi AO. Antimicrobial screening of extracts of *Olex* Subscorpiodes. *African Journal Biotechnology* 1997; 7: 868-870.
- 22 Deresse D. Antibacterial Effect of Garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study. *Asian Journal of Medical Sciences* 2010; 2(2): 62-65.
- 23 Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of Garlic (*Allium Sativum*) and Traditional Medicine. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010; 9(1):1-4.
- 24 Elkins R. Hawaiian Noni (*Morinda citrifolia*):Priza Herb of Hawaii and the South Pacific. Woodland Publishing Inc. United States.1998. Pp 15.
- 25 Wang MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Chen SU, Palu AK, Anderson G. *Morinda citrifolia* (Noni) A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica* 2002; 23(12):1127-1141.

- 26** Levand O, Lar Son HO. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica* 1979; 36(2):186-187.
- 27** Wang M, Kikuzaki H, Jin Y, Nakatani N, Zhu N, Csiszar K. Novel glycosides from noni (*Morinda citrifolia*). *Journal of Natural Products* 2000; 63: 1182-1183.
- 28** Atkinson N. Antibacterial activity of dried Australian plants by a rapid direct plate test. *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science* 1956; 34: 17-26.
- 29** Farine JP, Legal L, Moreteau B, Le Quere JL. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry* 1996; 41: 433-438.
- 30** Duncan SH, Flint HJ, Stewart CS. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* 0157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiology Letters* 1998; 164: 283- 288.
- 31** Fenwick GP, Hanley AB. The genus *Allium*-part 3. Medicinal effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1985;23(1) 1-74.
- 32** Tyneka Z, Gos Z. The fungistatic activity of garlic (*Allium sativum*) *in vitro*. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina* 1975; 30: 5-13.
- 33** Feldberg RS. In vitro mechanism of inhibition of bacterial growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1988; 32:1763-1768.
- 34** Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Phytotherapy Research* 2005; 19(4):327-334.

- 35** Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, Origuchi K, Matsufuji Seki T, Ariga T. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2009; 73(9):1948-1955.
- 36** Nya EJ, Austin B. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2009; 32(11):963-70.
- 37** Jainkittivong A, Butsarakamruha T, Anglia's R. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 2009; 108(3):394-398.
- 38** Lee S, Najiah M, Chuah T, Wee W. Antimicrobial properties of tropical plants against 12 pathogenic bacteria isolated from aquatic organisms. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7(13): 2275-2278.
- 39** Kumar S, Mathu J. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *International Journal of Integrative Biology* 2008; 3: 44-49.
- 40** Cos P, Arnold J, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* proof of concept. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 106(3): 290-302.
- 41** Schäfer M, Sharp P, Brooks VJ, Xu J, Cai J, Keuler NS, Peek SF, Godbee RG, Schultz RD, Darien BJ. Enhanced bactericidal activity against *Escherichia coli* in calves fed *Morinda citrifolia* (Noni) puree. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22(2):499-502.1.

- 42** Mohandas S. *In vitro in vivo* Test of extract of *Morinda citrifolia* and *Allium sativum* on subclinical mastitis cows. Journal of Animal Production 2005; 7(2):101-105.
- 43** Rivera A, Gionos S, González M, Rodríguez N, Cedillo L. Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. Annals of Biological Research 2011; 2(3): 491-497.
- 44** Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalbapristin, dirithromycin, evernimicin, levofloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbapristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001; 45:2604-2608.
- 45** Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. Clinical Infectious Diseases 2000; 30: 454-460.
- 46** Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. Physiological Review 2003, 83:417-432.
- 47** Nair MK, Juy J, Vasudevan P, Hinckley L, Hoaland TA, Venkitanarayanan KS. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin major bacterial mastitis pathogens. Journal of Dairy Science 2005; 88(10): 3488-3495.
- 48** Parsons JB, Yoo J, Frank MW, Jackson P, Rock CO. Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology 2012; 194(19): 5294-5304.

- 49** Simplicie DK, Tchadjobo T, Denise P, Jacques S. Sub-Saharan Rubiaceae: A review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2011; 14(3): 149-169.
- 50** Xiang W, Song QS, Zhang HJ, Guo SP. Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. *Fitoterapia* 2008; 79(7-8): 501-504.
- 51** Koffi AE, Yapi HF, Bahi C, Guessend KN, Djaman JA, Guede-Guind F. Antimicrobial activity of *Morinda morindoides* on *in vitro* growth of *Vibrio cholerae* in Côte d'Ivoire. *Medecine Tropicale: Revue du Corps de Sante Colonial* 2010; (1) :53-56.
- 52** Bhardwaj A, Ballal S, Velmurugan N. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citrifolia*, papain and aloe vera (all in gel formulations), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *Journal of Conservative Dentistry* 2012; 15(3): 293-297.
- 53** Ndukwe KC, Okeke IN, Lamikanra A, Adesina SK, Aboderin O. Antibacterial activity of aqueous extracts of selected chewing sticks. *Journal of Contemporary Dental Practice* 2005; 6(3): 86-94.
- 54** Ali AM, Ismail NH, Mackeen MM, Yazan LS, Mohamed SM, Ho AS, Lajis NH. Antiviral cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica*. *Pharmaceutical Biology* 2000; 38(4): 298-301.
- 55** Borroto J, Salazar R, Pérez A, Quiros Y, Hernández M, Waksman N, Trujillo R. Antimicrobial activity of the dichloromethane extract from *in vitro* cultured roots of *Morinda royoc* and its main constituents. *Natural Products Communications* 2010; 5(5): 809-810.

- 56** Banerjee S, Johnson AD, Csiszar K, Wansley DL, McGeady P. An extract of *Morinda citrifolia* interferes with the serum induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* and inhibits germination of *Aspergillus nidulans*. The American Journal of Chinese Medicine 2006; 34(3): 503-509.
- 57** Akinyemi KO, Mendie UE, Smith ST, Oyefolu AO, Coker AO. Screening of some medicinal plants used in South-West Nigerian traditional medicine for anti- *Salmonella typhi* activity. Journal of Herbal Pharmacotherapy 2005; 5(1): 45-60.
- 58** Jayasingue UL, Jayasooriya CP, Bandara BM, Ekanayake SP, Merlini L, Assante G. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. Fitoterapia 2002; 73(5) :424-427.
- 59** Nayak S, Chintamaneni M, Mengi S. Anti-infective potential of *Morinda citrifolia* fruit extract. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2011; 3(5): 81-83.
- 60** Palu AK, Kim AH, West BJ, Dengs S, Jensen J, White L. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. Journal of Ethnopharmacology 2008; 115(3): 502-506.
- 61** Skrivanová E, Marounek M. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. Folia Microbiológica, International Journal for General, Environmental, Applied Microbiology and Immunology 2007; 52(1): 70-72.

ANEXOS

CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

La cromatografía de gases (CG) es una técnica que tiene la cualidad de separar muestras muy complejas. La muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente Helio). En esta fase los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura.

La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria (Figura 6).

Por otra parte la espectrometría de masas (EM) es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (*electron ionization EI*), algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el *espectro de masas*. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como se “huella química” para caracterizar el analito (Figura 7).

La EM puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la previa complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto la asociación de las dos técnicas

CG (Cromatografía de Gases) y EM (Espectrometría de Masas) da lugar a una técnica combinada CG-EM que permite la separación e identificación de muestras complejas.

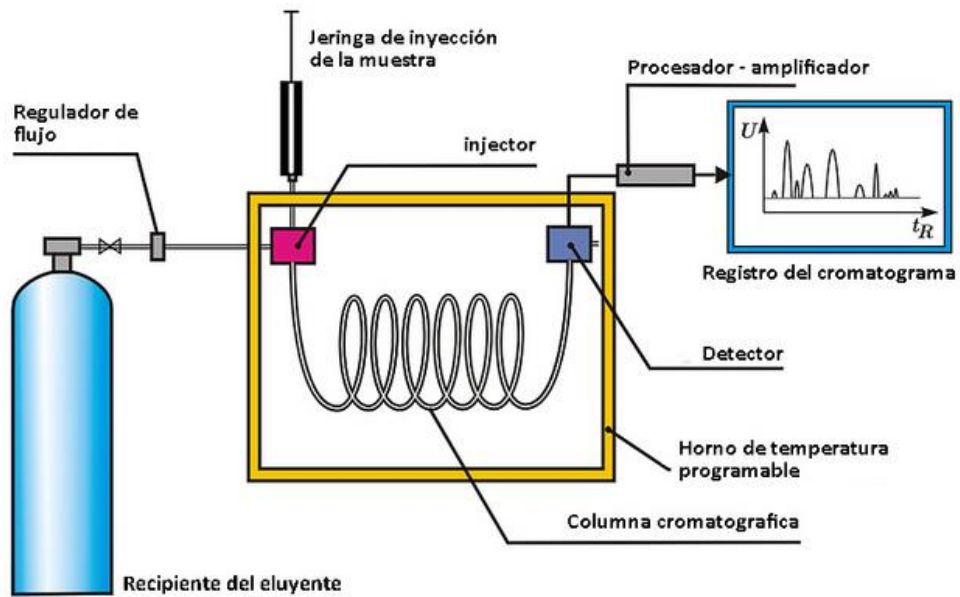


Figura 6. Cromatografía de gases (CG).

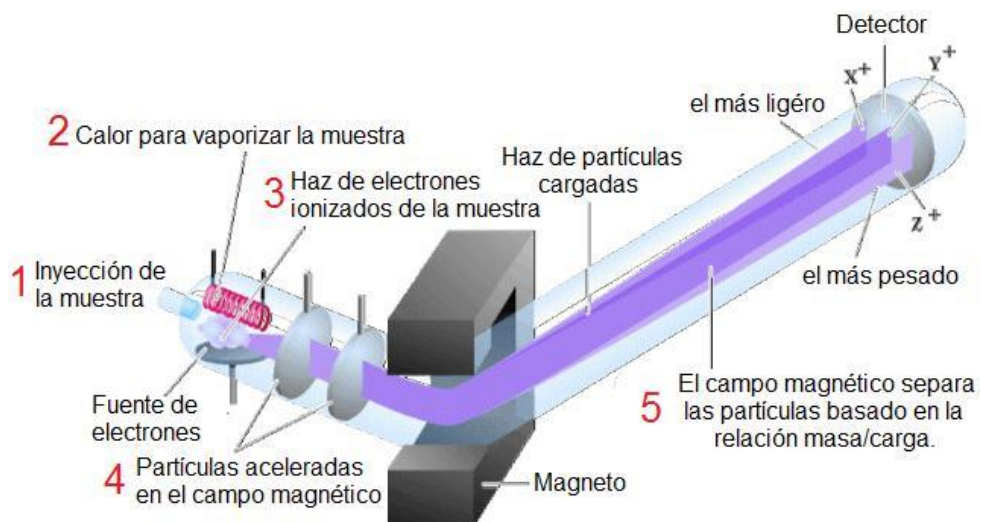


Figura 7. Espectrometría de masas (EM).