

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGENICA DO EXTRATO ETANOLÍCO DA NONI (*Morinda citrifolia*) EM CAMUNDONGOS MACHOS**

Isnara Correia ALVES (1); Amanda Furtado LUNA(1); Ana Luísa SILVA (1); Tatiana Maria Barreto FREITAS(1); Emmanuel Wassermann Moraes e LUZ (2)

(1) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, Praça da Liberdade, 1597 – Centro – Cep: 64000-040 Teresina - Piauí, fone: (86) 32155203 fax: (86) 32155207, e-mail: [isnaracorreia@hotmail.com](mailto:isnaracorreia@hotmail.com)

(2) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí – UNED –Floriano Rua Francisco Urquiza Machado nº 462, Bairro Meladão, e-mail: [professorluz@hotmail.com](mailto:professorluz@hotmail.com)

### **RESUMO**

Noni é o fruto da árvore de nome científico *Morinda citrifolia*, planta da família Rubiaceae, composta de 80 espécies. Atribui-se ao suco de Noni propriedades para a promoção da saúde, sendo este rica fonte de carboidratos, vitaminas e minerais. O Noni contém componentes que trabalham a nível celular para aumentar a funcionalidade positiva das células no organismo. Existe em abundância no fruto Noni substâncias como a Proxeronina e a Proxeroninase que em reação produz certo alcalóide, chamado Xeronina, o qual desempenha um papel importante no desenvolvimento do corpo humano. O conhecimento empírico a respeito do suco de Noni afirma que ele teria propriedades anticancerígenas, analgésicas, antiinflamatórias e anti-sépticas. Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimutagênico do extrato etanólico do fruto da *M. citrifolia* com o teste de micronúcleo. Utilizou-se um grupo piloto de 16 camundongos machos S/R. Após a morte por deslocamento cervical retirou-se o fêmur para a coleta da medula óssea, sendo feito o esfregaço do material. Torna-se necessário então, um aumento no numero de testes para verificar a capacidade de reparo e a ação antimutagenica do *M. citrifolia* (noni), uma vez que, se evidenciou uma proteção contra os danos causados pela ciclofosfamida.

**Palavras-chave:** *Morinda citrifolia*, antimutagênico, camundongos.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Morinda citrifolia* (Noni) foi usada em remédios populares por Polinésios por mais de 2000 anos, e é relatado ter uma larga escala de efeitos terapêuticos, incluindo efeitos antibacteriano, antiviral, antifúngico, antitumorosos, analgésico, hipotensivo, anti-inflamatório, e imunes. (WANG et al, 2002). É uma planta da família das Rubiaceae e subfamília Rubioideae, nativa do sudeste asiático e Austrália (SCOT, 2006). Os produtos derivados da fruta de Noni (*Morinda citrifolia*) foram comercializados nos EUA desde os anos 90 e são distribuídos cada vez mais pelo mundo inteiro.

A mutação é uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético e como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS e BOTTINO, 1991). Entretanto, a curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e, finalmente, sintonizados, de um organismo (ALBERTS et al, 2002; NETO et al, 2005).

As mutações e a cancerização estão estreitamente associadas, porque ambas representam alterações abruptas em uma única célula, permanentes e herdadas pelas células filhas. Por isso, os testes de mutagenicidade são para a pré – seleção de agentes químicos a serem avaliados, quanto a seu potencial carcinogênico, por testes de longa duração em roedores (RABELLO-GAY et al., 1991; WEISBURGER, 1999).

Diante de todas as propriedades do Noni já conhecidas, surge o interesse pelo estudo desse vegetal. Sabendo que, alguns vegetais contêm substâncias que acarretam a ocorrência de mutações ou não. Por isso, há necessidade de estudá-las, fazendo-se testes que detectem o efeito mutagênico ou antimutagênico como o teste de micronúcleos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A descoberta da vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pelo ambiente criou uma nova área de pesquisa - a Genética Toxicológica - na qual especialistas se dedicam ao estudo das lesões e alterações induzidas por substâncias químicas e/ou agentes físicos ao DNA (RABELLO-GAY et al., 1991). Os estudos nesta área de pesquisa podem conduzir a informações precisas sobre a exposição e o risco à integridade celular e, assim, a uma efetiva prevenção dos problemas de saúde.

A maioria dos agentes mutagênicos tem, também, potencial carcinogênico, de modo que o desenvolvimento de neoplasias constitui uma das principais consequências da exposição à mutágenos. O câncer, considerado hoje uma doença genética é o problema de saúde mais preocupante associado à ação de agentes mutagênicos. A exposição a esses agentes, aliada ao aumento da expectativa média de vida proporcionada pelo avanço da medicina, contribuiu para que, a partir da segunda metade do século passado, o câncer tenha assumido importância relativa cada vez maior entre as causas de morte no Brasil (SILVA, 2005).

A *M. citrifolia* popularmente conhecida por Noni é um fruto rico em vitaminas, proteínas, minerais e no alcalóide proxeronina. Estudos comprovam as mais de 53 propriedades da *M. citrifolia* dentre elas estão: regenerador celular, anti-séptico natural, analgésico, anti-inflamatório, anti-parasitário, anti-cancerígeno, regulador metabólico, regenerador de células danificadas, entre outros. Os antioxidantes protegem o organismo impedindo a formação de radicais livres, também reparam as lesões causadas pelos mesmos (WANG et al, 2002).

A substância mais promissora encontrada no suco de noni (*M. citrifolia*) é a proxeronina, que no organismo se converte em xeronina, composto bioquímico fundamental que intervém numa ampla série de reações bioquímicas normais do corpo humano. Nas partes inflamadas, a proxeronina escorre dos vasos capilares sanguíneos permitindo às células produzirem xeronina. A xeronina provavelmente impede que os péptidos produtores da inflamação se amalgamem às proteínas específicas. Evidentemente, isto reduz a magnitude da inflamação, inchaço e dor. Os elementos fundamentais relacionados com a biosíntese da xeronina em nosso organismo são a proxeronina, e a proxeronase – enzima necessária para a biosíntese da xeronina e a serotonina. Nosso organismo contém todas elas, mas a proxeronina existe em quantidade limitada (SOLONON, 1999).

Três casos de hepatite aguda em consumidores austríacos do suco do noni foram publicados, onde uma ligação causal é sugerida no meio à deficiência orgânica do fígado e a ingestão das antraquinonas da planta. Medidas da função de fígado em um estudo clínico humano da segurança do suco de TAHITIAN NONI®, assim como a toxicidade animal subcutânea e subcrônica. Os testes não revelaram nenhuma evidência de efeitos adversos no fígado, em doses muitas vezes mais altas do que aquelas relatadas nos estudos de caso. Adicionalmente, as antraquinonas da *M. citrifolia* ocorrem na fruta em quantidades demasiadamente pequenas para ser de todo o significado toxicológico. Mais, estes não têm as estruturas químicas capazes da diminuição aos radicais reativos do antreno, que foram implicados em casos precedentes do hepatotoxicidade erval. Os dados disponíveis não revelam nenhuma evidência da toxicidade do fígado (WEST et al, 2006). Os efeitos do suco da *M. citrifolia* (noni) no esvaziamento gástrico, no trânsito gastrintestinal, e no nível do plasma do colecistoquinina (CCK) foram estudados em ratos. Os resultados sugerem que o noni oral iniba o esvaziamento gástrico nos ratos masculinos através de um mecanismo que envolve a estimulação da secreção de CCK e da ativação do receptor CCK1 (PU et al, 2004).

Se, por um lado, encontramos na dieta uma mistura complexa de compostos que apresentam atividade mutagênica e/ou carcinogênica, por outro, a dieta também pode incluir compostos que impedem ou inibem a ocorrência destes processos. Após a observação inicial de efeitos antimutagênicos de certos vegetais, vários compostos têm sido isolados de plantas e testados quanto à ação protetora sobre lesões induzidas no DNA (KADA et al., 1978). O termo agente “antimutagênico” foi usado originalmente por Novick e Szilard em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido (ANTUNES E ARAÚJO, 2000).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos, os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem os testes *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vivo* são utilizados freqüentemente ratos e camundongos. Nos testes *in vitro* são usadas diferentes linhagens celulares, inclusive células humanas. As mais comumente utilizadas são os linfócitos humanos e as células de ovário de *hamster* chinês (CHO), como ferramenta na avaliação da antimutagenicidade de diversos agentes químicos (WATERS et al, 1996; ANTUNES E ARAÚJO, 2000).

Em qualquer um desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré- ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bio-antimutagênese e está relacionado ao processo de reparo das mutações, como acontece com a vanilina (SASAKI et al, 1987) e com o ácido tânico (SASAKI et al, 1988). Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA.

Neste trabalho foi realizado o teste de micronúcleo *in vivo* por meio de pré-tratamento com o extrato etanólico do Noni. O teste do micronúcleo é o ensaio, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi desenvolvido de início, em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos. (TAKAHASHI et al, 2004).

Nas preparações citológicas destinadas ao estudo de micronúcleos, podem ser encontradas alterações nucleares degenerativas que são, também, indicativas de genotoxicidade. Estas alterações devem ser consideradas, quando da análise de MN, e computadas separadamente, permitindo otimizar a sensibilidade e a especificidade do teste (FREITA, 2005).

Mais recentemente, o teste de micronúcleo emergiu como um dos métodos recomendados para avaliar os danos do cromossomo, uma vez que este método permite a avaliação confiável tanto da perda quanto da ruptura do cromossomo, (FENECH, 2005). Este teste é capaz de revelar a ação de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MAC GREGOR et al, 1987). Conseqüentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear, pós o dano ao DNA, fosse idêntica (FENECH, et al., 1997; MARON et al, 2006).

Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídas nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (FAGUNDES, 2005). O ensaio serve como um primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Preparação do extrato

O extrato etanólico de *M. citrifolia* foi obtido a partir de 203,1g de polpa e cascas maceradas em almofariz com pistilo, após maceração foi colocado em sistema Soxhlet durante 8 horas, e evaporação de solvente por evaporador rotatório, obtendo-se 22,5717 g de extrato etanólico.

#### 3.2. Grupos Experimentais

Foram utilizados, 16 camundongos machos, S/R, cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, onde ao Grupo 1 foi administrado 0,2mL do extrato etanólico do Noni por 3 dias consecutivos. Ao Grupo 2 foi administrado 0,2 mL do extrato também por 3 dias e uma dose de 0,2 mL de ciclofosfamida no 4º dia. No Grupo 3 foi administrado 0,2 mL de salina por 3 dias e uma dose de 0,2 mL de ciclofosfamida no 4º dia, este sendo o controle positivo. E por fim o Grupo 4, foi administrado apenas salina por 3 dias, como controle negativo. A concentração da ciclofosfamida administrada foi de 20 mg/Kg. A administração do extrato foi intraperitoneal. Os animais foram mortos por deslocamento cervical e retirado o fêmur para retirada da medula e preparação do esfregaço. As lâminas foram preparadas em duplicata, sendo observadas as células normocromáticas e policromáticas nas primeiras 500, e em seguida, somente as células policromáticas para finalizar a contagem de mil células por lâmina.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os estudos com os agentes antimutagênicos foram iniciados nos anos cinqüentas, porém recentemente é que o interesse de diversos grupos de pesquisa, distribuídos por todo o mundo, têm se concentrado na identificação de agentes antimutagênicos, principalmente os de origem natural. A identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos em alimentos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção do câncer, por meio de modificações do hábito alimentar (WARGOVICH, 1997). O extrato de *M. citrifolia* (noni), mostrou não ter significância estatística frente aos grupos controle negativo e do noni associado à ciclofosfamida. No entanto houve significância quando comparado ao Controle Positivo (CP), quando usado o teste de Dunnetts. Isto sugere uma ação antioxidante, pois, reduziu os efeitos danosos gerados pela ciclofosfamida, mostrado no teste de micronúcleos. Isto caracterizado possivelmente pelas propriedades do noni descritas anteriormente, dentre elas, regenerador celular, deixando bem evidenciado a proteção celular causada pelo uso do extrato do noni antes de uma dose de ciclofosfamida, mantendo a integridade das células. De acordo com alguns autores citados anteriormente não há tendência mutagênica no extrato do noni. Os micronúcleos são contados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expelem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (RNA-positivos), isto é, coram-se em azul e não em vermelho. Se forem contados os micronúcleos apenas neste tipo de célula, haverá a segurança de que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático (EP) é de 8 a 12 horas, é obvio que só se vai encontrar micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro dos quais os micronúcleos podem ser detectados, corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 a 24 horas (NETO et al, 2005).

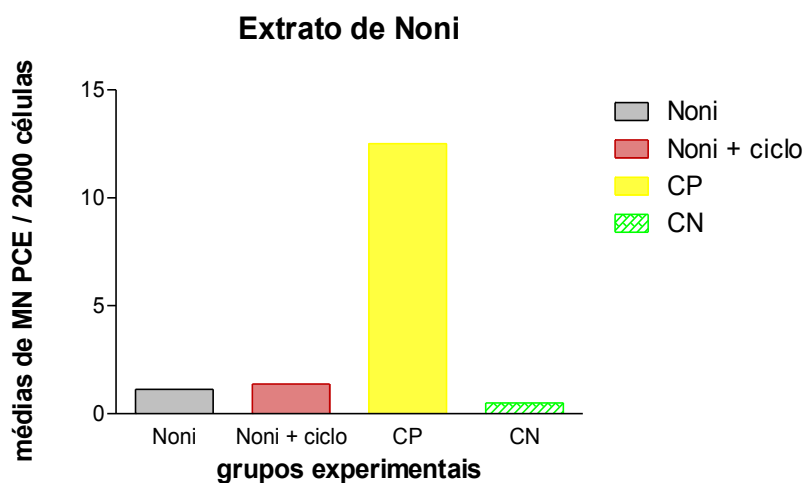


Gráfico 1.  
Grupos comparados com controle positivo pelo teste de Dunnetts, \*p < 0,05.

## 5. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados encontrados aqui, torna-se necessário um aumento no numero de testes para verificar a capacidade de reparo e a ação antimutagenica do *M. citrifolia* (noni), uma vez que, se evidenciou uma proteção contra os danos causados pela ciclofosfamida.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. Editora Artmed. Edição Universitária, 2ª reimpressão. Porto Alegre (RS): 2002.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; **Mutagenicidade E Antimutagenicidade Dos Principais Corantes Para Alimentos**. Rev. Nutr., Campinas, 13(2): 81-88, maio/ago., 2000

BURNS, G. W., e BOTTINO, P. J. **Genética**. Editora Guanabara Koogan. 6ª edição. Rio de Janeiro (RJ): 1991.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. **Annona Coriacea Induz Efeito Genotóxico Em Camundongos**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. 2 (1), 24-29, 2005.

FENECH, M. **In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity**. *Methods Mol Med.*;111: 3-32, 2005.

FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method**. *Mutation Research*, 392: 11-18, 1997.

FREITA, V. S.; LOPES, M. A.; MEIRELES, J. R. C.; CERQUEIRA, E. M. M. **Efeitos Genotóxicos De Fatores Considerados De Risco Para O Câncer Bucal**. Revista Bahiana de Saúde Pública. Vol.29, n. 2, p. 189-199, 2005.

KADA, T., MORITA, K., INOUE, T. **Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate.** *Mutation Research*, Amsterdam, v.53, n.3, p.351-353, 1978.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. **Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes.** *Mutation Research*, .189, 103–112, 1987.

MARON, S. E.; POLEZ, V. L. P.; ARTINI, R. F.; RIBA, J. L. C.; TAKAHASHI, H. K.. **Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina.** *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, n. 1, 27-30, 2006.

NETO, J. X. A.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C.; DANTAS, J. P. **Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) IN VIVO.**

REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA. Volume 5 - Número 2 - 2º Semestre 2005.

POTTERAT Olivier, HAMBURGER Matthias. ***Morinda citrifolia* (Noni) Fruit - Phytochemistry, Pharmacology, Safety.** *Planta Med* 2007; 73: 191-199.

PU Hsiao-Fung, HUANG Wei-Ju, TSENG Wen-Min, WANG Shyi-Wu, LIU Yu-Wen, DOONG Ming-Long, WANG Paulus S. **Effects of Juice from *Morinda citrifolia* (Noni) on Gastric Emptying in Male Rats.** *Chinese Journal of Physiology* 47(4): 169-174, 2004.

RABELLO-GAY, M.N.; CARVALHO, M.I.O; OTTO, P.A. and TARGA, H.J. (1985). **The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow.** *Mutation Res.* 158: 181–188.

SASAKI, Y.F., IMANISHI, H., OHTA, T., SHIRASU, Y. **Effects of vanillin on sister chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells.** *Mutation Research*, Amsterdam, v.191, n.3/4, p.193-200, 1987.

SASAKI, Y.F., IMANISHI, H., OHTA, T., SHIRASU, Y., WATANABE, M., MATSUMOTO, K., SHIRASU, Y. **Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells.** *Agricultural and Biological Chemistry*, v.52, p.2423-2428, 1988.

SILVA, J. S.; **Efeitos Genotóxicos Em Tétrades De *Tradescantia Pallida* (Rose) D.R. Hunt Var. *Purpurea* Induzidos Por Poluentes Atmosféricos Na Cidade Do Salvador-Ba.** Feira de Santana, 2005.

SOLOMON, Neil. **O fruto tropical de 101 aplicações medicinais: suco de noni (*Morinda Citrifolia*) fruto insular.** Direct Source Publishing. Vineyard, Utah, 1999.

SCOT, C. N. *Morinda citrifolia* (noni) Rubiaceae (coffee family). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry April 2006.

TAKAHASHI, C.S. Cytogenetic evaluation of the effect of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia nutans* Rosc (Zingiberaceae) and *Pogostemon heyneanus* Benth (labiateae) on Wistar rats and *Allium cepa* Linn. (Liliaceae) root tip cells. *Brazil. J. Genetics*, 17(2): 175-180., 2004.

WANG Mian-Ying, WEST Brett J, JENSEN C Jarakae, NOWICKI Diane, SU Chen, PALU Afa K, ANDERSON Gary, ***Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research.** Acta Pharmacol Sin 2002 Dec; 23 (12): 1127-1141.

WARGOVICH, M.J. **Experimental evidence for cancer preventive elements in foods.** *Cancer Letters*, Limerick, v.114, n.1, p.11-17, 1997.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A., BROCKMAN, H.E., DE FLORA S. **Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data.** *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, n.1, p.109-129, 1996.

WEISBURGER, J.H. (1999). **Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now.** Mut. Res. 437: 105-112.

WEST BJ, JENSEN CJ, WESTENDORF J. **Noni juice is not hepatotoxic.** World J Gastroenterol 2006; 12(22):3616-3619.