

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

CELSO ANTONIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS OBTIDOS DO
FRUTO DA *Morinda citrifolia***

BAURU
2014

CELSO ANTONIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS OBTIDOS DO
FRUTO DA *Morinda citrifolia***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharelado em Biomedicina, sob orientação da Prof^ª. Ms. Márcia Clélia Leite Marcellino.

BAURU
2014

Silva, Celso Antonio da.

S5862a

Avaliação da atividade antitumoral e antibacteriana dos extratos obtidos do fruto da Morinda Citrifolia/ Celso Antonio da Silva. -- 2014.

44f. : il.

Orientadora: Profa. Ma. Márcia Clélia Leite Marcellino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
– Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Morinda Citrifolia.2. Tumor Ascítico de Erhlich.3. Atividade antibacteriana. I. Marcellino, Márcia Clélia Leite. II. Título.

CELSO ANTONIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIBACTERIANA
DOS EXTRATOS OBTIDOS DO FRUTO DA *Morinda citrifolia***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Biomedicina sob orientação da Prof^a. Ms. Márcia Clélia Leite Marcellino.

Banca examinadora:

Prof^a. Ms. Márcia Clélia Leite Marcellino
Universidade do Sagrado Coração

Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Jardim Constantino
Universidade do Sagrado Coração

Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 04 de Dezembro de 2014.

Dedico este TCC aos meus pais, que apesar de tantas batalhas, não mediram esforços para que eu pudesse concluir meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a ajuda e ter me levantado nos momentos que mais precisei e ver que Ele se tornou minha força para continuar.

Aos meus pais, por todo o esforço e por me tornarem o ser humano que sou hoje. Obrigado por cada palavra de incentivo e por não desistirem de lutar ao meu lado e ao meu irmão e sua esposa, que me auxiliaram em tudo.

Aos meus familiares, que mesmo estando longe, não cessaram de torcer por mim para que os meus sonhos pudessem ser alcançados.

Agradeço imensamente à minha Orientadora Prof^ª. Ms. Márcia Clélia Leite Marcellino, por cada segundo que pude estar contigo, por nunca esmorecer diante de tantas batalhas. Saiba Márcia, que serei eternamente grato por tudo aquilo que você pode me fazer, não apenas como orientadora, professora, mas sim, como uma eterna amiga e espero que Deus, em sua infinita bondade a cubra de bênçãos e vitórias.

À Prof^ª. Dr^ª. Dulce Helena Jardim Constantino e Prof^ª. Dr^ª. Geisiany Maria de Queiroz por toda a ajuda que puderam me proporcionar, tanto no meu projeto, quanto em toda a minha vida acadêmica. E Geisiany, obrigado por tudo, desde as palavras de incentivo até os “puxões de orelha”, saiba que me tornaram cada vez mais uma pessoa competente.

À Universidade do Sagrado Coração, onde pude conhecer diversas pessoas e aprender muito com cada um dos que aqui estavam. Em especial, agradeço a seis pessoas, que além de toda a amizade que criamos, tiveram papel fundamental para a realização deste projeto: Dayvid Monteiro, Alexandre Braz, Lígia M. Balmonte, Fabiane Bortoluci, Lajos Z. Tiszolczki e Matheus Brito.

À Yara Costa e Isabela Fanton por em cada minuto que eu estava fazendo meu projeto, vocês estarem ao meu lado, me ajudando e me fortalecendo. Agradeço muito em poder contar não apenas como duas colegas de pesquisa, e sim, como duas grandes amigas, que levarei por toda a vida.

Aos meus colegas e amigos que pude criar durante esses quatro anos de graduação, me ajudando em cada segundo, nunca me deixando desistir, e pude ver que posso contar para o resto de minha vida. Em especial, quero agradecer as pessoas que considero como anjos-da-guarda: Andressa Castelo e Letícia Gomes.

Agradeço imensamente as minhas “irmãs de coração”: Vanessa Peraçoli e Kassia Garbelote, sem vocês eu não saberia como prosseguir. Obrigado por fazerem parte de minha vida e de minha história, na qual estiveram presentes em todos os momentos, desde felizes e

até tristes. Foram capazes de me levantar e me ajudarem em tudo, auxiliando-me e não me deixando desistir. Vocês estarão sempre em minha vida e em meu coração.

Agradeço aos meus amigos Jonas Santana e Sérgio Luiz, por me ajudarem em toda a minha história e auxiliarem nos momentos felizes e tristes de minha vida. Serei eternamente grato a vocês sempre.

Agradeço a Allyadnne Barboza, Vera Almeida, Paula Freire e todo o grupo “Amigos pela fé”. Levarei vocês para sempre em minha vida e minha história. Pessoas que serei eternamente grato e estarão sempre em meu coração. Obrigado por tudo mesmo!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Neoplasias e infecções bacterianas representam graves enfermidades que afetam grande parcela da população mundial. Apesar dos tratamentos preconizados a base de quimioterápicos e antibióticos, respectivamente, novas alternativas de tratamento, em particular a base de metabólitos secundários obtidos de plantas medicinais representam opções de terapias mais acessíveis, menos agressivas e eficientes. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito antitumoral e antibacteriano dos extratos fenólico e oleoso obtidos dos frutos de *Morinda citrifolia*. Para a avaliação antitumoral foram utilizados 22 camundongos suíços machos e adultos, onde foram inoculadas 10^3 cel/mL do Tumor de Erlich na região peritoneal (tumor ascítico). Os animais foram tratados por 7 dias, pela técnica de gavagem, com os extratos da fração oleosa, fenólica e também com os veículos aquoso e aquoso com tensoativo, e após a eutanásia, foi obtido o lavado de células tumorais que foram contadas em câmara de Neubauer. Para determinação da atividade antibacteriana, foram realizadas as técnicas de CIM e CBM. Os resultados do teste antitumoral *in vivo* evidenciaram aumento significativo de células tumorais nos grupos tratados com a fração fenólica ($p=0,025$) e oleosa ($p=0,003$), no entanto, o veículo contendo o tensoativo Tween 80 reduziu de forma significativa ($p= 0,021$) as células tumorais em comparação ao grupo contendo somente água destilada. Em relação a avaliação bacteriana, os extratos etanólico (compostos fenólicos) e etéreo (óleos essenciais) do fruto de *Morinda citrifolia*, não foram efetivos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Apresentando CIM/CBM é igual a $1250\mu\text{g/mL}$ no caso do extrato fenólico e CIM igual a 1,45% e CBM igual a 2,9% no caso de óleo essencial frente a *Streptococcus pyogenes*. Notou-se ainda que os controles realizados demonstraram que os testes foram válidos. Novos estudos devem ser realizados para evidenciar os resultados aqui expostos.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia*. Tumor Ascítico de Erlich. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Cancer and bacterial infections represent serious illnesses that affect large portion of the world population. Although the basis for recommended treatment chemotherapeutics and antibiotics, respectively, new treatment options, in particular the basis of secondary metabolites derived from medicinal plants account for more options available therapies, less aggressive and efficient. Hence, the present study aimed to evaluate the possible antitumor and antibacterial effect of phenolic and oily extracts of the fruits of *Morinda citrifolia*. For antitumor evaluation were used 22 male adult Swiss mice, which were inoculated 10^3 cel / mL Erhlich tumor in the peritoneal region (ascites tumor). The animals were treated for 7 days by gavage technique, extracts the oil fraction and also with phenolic aqueous surfactant and aqueous vehicles, and after euthanasia was obtained the washing of tumor cells were counted in chamber Neubauer. To determine the antibacterial activity, the techniques of MIC and MBC were performed. The results of the in vivo antitumor test indicated a significant increase of tumor cells in groups treated with the phenolic fraction ($p = 0.025$) and oil ($p = 0.003$), however, the carrier containing the surfactant Tween 80 significantly reduced ($P = 0.021$) tumor cells compared to the group containing only distilled water. Regarding the bacterial assessment ethanolic (phenolics) and ether (essential oils) from *Morinda citrifolia* fruit, were not effective against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Introducing CIM / CBM is equal to $1250\mu\text{g} / \text{mL}$ in the case of the phenolic extract and CIM equal to 1.45% and CBM equal to 2.9% for essential oil front *Streptococcus pyogenes*. It was also noted that the controls performed showed that the tests were valid. Further studies should be conducted to highlight the results herein.

Keywords: *Morinda citrifolia*. Erhlich ascites tumor. Antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Plantas e Frutos de Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	17
Figura 2 – Flor de Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	17
Figura 3 – Frutos Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	17
Figura 4 – Planta de Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	17
Figura 5 – Etapas da transformação dos frutos <i>in natura</i> em droga vegetal	24
Figura 6 – Etapas de extração da fração acetato de etila.....	25
Figura 7 – Etapas de obtenção do extrato etéreo do fruto Noni	26
Figura 8 – Etapas para obtenção do lavado peritoneal	28
Figura 9 – Etapas realizadas para a determinação de CIM..	31
Figura 10 – Microplaca com os controles empregados para determinação da CIM	36
Figura 11 – Método de Concentração Bactericida Mínima (CBM), representação de uma das 4 placas de Petri utilizada para a microplaca de controle de esterilidade e com ampicilina	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Comparação das médias de células tumorais comparados com os 4 grupos (Grupo H₂O+Tween 80; grupo H₂O; grupo fração fenólica Noni e grupo fração oleosa Noni)..... 32
- Gráfico 2 – Comparação das médias de células tumorais entre o grupo controle água e o grupo controle água e Tween 80..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA	Instituto Nacional de Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
EGF	Fator de crescimento epidérmico
AP-1	Fator de transcrição eucariótica
JNK	Proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular
DMBA	7,12-dimetilbenzeno-[α]-antraceno
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
q.s.p	“quantidade suficiente para”
GNCA	Grupo Neoplásico Controle Água
GNAT	Grupo Neoplásico Controle Água com Tween 80
GNFO	Grupo Neoplásico Fração Oleosa
GNFF	Grupo Neoplásico Fração Fenólico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
DMSO	dimetilsulfóxido
BHI	Brain Heart Infusion Caldo e Agar
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institutes</i>
ADN	ácido desoxirribonucléico
P-gP	glicoproteína P

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVOS GERAIS	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	24
4.1.1 Obtenção dos frutos da <i>Morinda citrifolia</i>	24
4.1.2 Obtenção da fração acetato de etila e extrato etéreo do fruto de <i>M. citrifolia</i>	24
4.2 TESTE <i>in vivo</i> : NEOPLASIA	26
4.2.1 Grupos experimentais	26
4.2.2 Manutenção do Tumor Experimental de Ehrlich	27
4.2.3 Implante Tumoral e obtenção do lavado peritoneal	27
4.2.4 Contagem das células neoplásicas	28
4.2.5 Análise estatística	28
4.3 TESTE <i>in vitro</i> : ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	28
4.3.1 Determinação da Atividade Antibacteriana	28
4.3.2 Linhagens de micro-organismos	29
4.4 DILUIÇÕES DOS EXTRATOS	29
4.4.1 Diluição da fração de acetato de etila de <i>M. citrifolia</i>	29
4.4.2 Diluição do extrato etéreo de <i>M. citrifolia</i>	29
4.5 PREPARAÇÕES DAS TÉCNICAS PARA O ESTUDO	29
4.5.1 Preparação do Inoculo	29
4.5.2 Preparação dos controles	30
4.5.3 Método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	30
4.5.4 Método de determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>M. citrifolia</i>	32
5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATO DE <i>M. citrifolia</i>	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A	44

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias ou câncer é o nome dado a um extenso conjunto de mais de 250 doenças que tem em comum o crescimento celular não organizado de forma maligna, onde essas células são capazes de invadirem os tecidos e órgãos, espalhando-se em metástase para outros locais do corpo. Essas células possuem a tendência de serem agressivas e não terem controle sobre elas, o que se determina na formação de tumores ou neoplasias malignas. Ao contrário, uma massa localizada de células, cuja multiplicação se dá vagorosamente e pode-se dizer ser parecida com o tecido de origem, é chamada de tumor benigno. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA, 2014).

Em países desenvolvidos e em desenvolvimento o câncer representa um grande problema de saúde pública, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Em média, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer e da Organização Mundial da Saúde (OMS) a incidência de o câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos. Nesses, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão, cólon e reto e entre as mulheres foi o de mama. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres. Em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população. (INCA, 2014).

A quimioterapia representa uma das principais formas de tratamento do câncer destacada pelo INCA (2014), cujo fundamento baseia-se em utilizar medicamentos que destroem as células doentes que formam o tumor. São utilizados vários tipos de medicamentos a cada vez que o paciente recebe o quimioterápico, pelo fato dos mesmos agirem de formas diferentes no corpo humano. Os fármacos são levados pelo o sangue a todas as partes do corpo, destruindo células doentes que estão formando o tumor e impede simultaneamente que o mesmo se espalhe.

A radioterapia, que é outra forma amplamente empregada para tratar o câncer, utiliza raios de alta energia para destruir células tumorais. Segundo Frasson e Zerwes (2004), existem três formas de radioterápicos: os chamados de Radioterapia externa, onde os

equipamentos, liberando energia, indo diretamente para a mama (câncer no qual era mensurado por eles), a partir de feixe externo, fazendo que não tenha contato mecânico direto; radioterapia com implante, qual mensuram que a radiação provem de um material radioativo, disposto de dentro de tubos plásticos inserindo assim diretamente na mama. Para que esse tipo de radioterapia aconteça, o paciente estará hospitalizado, pois esse implante fica por vários dias e assim que ele recebe a informação que terá alta hospitalar, o implante é retirado. Outro tipo de radioterapia mencionada é a chamada radioterapia intra-operatória, que é a fonte da radiação se direciona diretamente para o leito tumoral e após o tumor ser removido, ainda na cirurgia. Ocorre um tratamento do tecido tumoral adjacente ao tumor ressecado, e através de um colimador, o feixe de energia é direcionado. Esse colimador delimita a área a ser irradiada, pois fica em contato direto com o tecido mamário. Afastadores especiais protegem a pele do campo de irradiação. Esse procedimento é feito durante a extirpação do tumor e sua duração é de poucos minutos. Uma técnica nova que foi desenvolvida no Instituto Europeu de Oncologia em Milão, e outros países estão estudando essa técnica para implante em seus pacientes.

A cada dia surgem novas pesquisas e métodos para tentar combater o câncer de maneira menos invasiva com facilidades em manuseios, o que gera um custo/benefício para quem o utiliza. As plantas medicinais são alvos de várias pesquisas e pode-se verificar que estão cada vez mais surtindo resultados positivos, pois plantas que são consideradas medicinais, possuem princípios ativos que são responsáveis pelo efeito curativo. (JANEWAY; WALPORT; SHLOMCHIK, 2002 citado por BREHMER, 2005).

Em relação à oncologia experimental, o Tumor de Ehrlich tem sido uma opção para realização de testes e avaliação de extratos e outros componentes com possível efeito antitumoral. Este tumor foi descrito por Ehrlich e Apolant em 1905, como um adenocarcinoma mamário de camundongos. Pode-se dizer que foi um dos primeiros tumores transplantados a ser descrito em literatura. Esse tumor experimental, se mantém até os últimos tempos, como um transplante sucessivo no tecido subcutâneo ou no peritônio de camundongos, possuindo duas formas de inoculação: forma sólida e ascítica. (SIGIURA, 1965 apud BREHMER, 2005, p. 8). Esse tumor tem seu desenvolvimento de acordo com o local de inoculação. Quando inoculado na cavidade peritoneal, o seu crescimento ocorre em suspensão, ou seja, ganha o nome de ascítica. Já quando a inoculação é realizada no tecido subcutâneo, seu crescimento é efetuado na forma sólida. (GUERRA, 1983).

Num período de inoculação de aproximadamente sete dias, após um exame macroscópico, apresenta-se como forma palpável, com consistência firme, coloração

esbranquiçada, aspecto homogêneo e brilhante, pouco aderente aos planos profundo e relativamente móvel. Já para forma ascítica do tumor, após o mesmo período de inoculação, sua massa, se caracteriza pela presença de grande quantidade de fluido discretamente viscoso e de aspecto leitoso. (GUERRA, 1983). “Após o décimo dia de inoculação intraperitoneal do tumor, cerca de 90% das células peritoneais são células tumorais [...]” (GUERRA, 1983; FECCHIO *et al.*, 1990; SANTOS-BERGAMI, 2004 apud BREHMER, 2005, p. 20).

Para estudos e pesquisas, “a vantagem de utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação as demais recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo [...]” (SILVA *et al.*, 2006 apud AZEVEDO, 2007).

O efeito medicinal de plantas tem relação com o conjunto de todas as substâncias presentes nestas, com os metabólitos secundários vitaminas, sais minerais, resinas, entre outros que age juntamente com o princípio ativo melhorando o efeito. A explicação para essa melhora é que as demais substâncias podem facilitar a absorção e o aproveitamento do princípio ativo pelo organismo (RIGUEIRO, 1992 citado por ROMANI, 2013).

Dentre essas plantas com ação medicinal destaca-se a *Morinda citrifolia* popularmente conhecida por Noni, é uma pequena árvore da família das Rubiaceae, cuja origem se deu a partir do sudeste asiático, sendo levada pelo homem através da Ásia Meridional, ilhas do Oceano Pacífico, Polinésia Francesa, Porto Rico e mais recentemente a República Dominicana.

Trata-se de uma pequena árvore que mede até 8 metros de altura; folhas oblongo-ovadas de 10-30 cm de comprimento, com ápice agudo e a base arredondada; flores brancas perfumadas, dispostas em cabeças globosas ou ovais, corola tubular de aproximadamente 10 mm; fruto tipo sincarpo; isto é, conjunto de frutos soldados entre si e procedentes de flores distintas; branco-cremoso, de forma oval, medindo de 5-7 cm de comprimento. Com seu cheiro pouco agradável e um sabor muito amargo, a fruta possui relatos sobre ação antitumoral, devido a um polissacarídeo nela existente. Estudos prévios mostraram visíveis supressão de crescimento tumoral. (BREEN, 2004). Como representado nas figuras de 1 a 4:



Figura 1. Planta e Frutos do Noni (*Morinda citrifolia*)



Figura 2. Flor do Noni (*Morinda citrifolia*)



Figura 3. Frutos Noni (*Morinda citrifolia*)



Figura 4. Planta do Noni (*Morinda citrifolia*)

FONTE: MAIA (2009)

Através de investigação fitoquímica de *Morinda citrifolia*, Castro (2011) isolou cerca de 200 compostos, destacando como principais constituintes as antraquinonas, ácidos graxos e seus derivados, glicosídeos iridóides, lignanas, neolignanas, flavonóides, fenilpropanóides, sacarídeos e triterpenóides. O mesmo autor confere ao Noni e seus fitoquímicos, propriedades analgésicas, antibacterianas, antiinflamatórias, antioxidantes, antituberculosa e preventiva para doenças cardiovasculares.

O fruto é composto por 90% de água, e muitos dos seus componentes da matéria seca são de sólidos solúveis, fibras dietéticas e proteínas. A composição protéica no suco de noni corresponde a aproximadamente 11,3% da matéria seca. Enquanto os minerais correspondem

a 8,4% da matéria seca, e se constituem principalmente de potássio, cálcio, fósforo e traços de selênio (CHUNHIENG, 2003 citado por NASCIMENTO, 2012, p. 25).

Um dos compostos da fruta Noni, as antraquinonas são capazes de estimular o sistema digestório, a ponto de aumentar o fluxo biliar, secreções e as tão necessárias enzimas. (BREEN, 2004). Gupta e Santana (2012, p. 4), dizem que “[...] o composto 1-hidroxi-2-metoxi, 3,5-di-hidroxi antraquinona foi identificado como um potente indutor da atividade quinona redutase”.

Substâncias antioxidantes desempenham papel importante na saúde através de seus efeitos na modulação dos processos oxidativos que ocorrem no organismo. A definição de antioxidante pode ser expressa como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser, ou não, enzimático tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (HALIWELL, 2001; SOUSA et al., 2007).

Foram descritos recentemente dois glicosídeos presentes no fruto Noni que mostraram grande atividade inibitória e transformação celular induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ou Fator de crescimento epidérmico (EGF) em linhagem de camundongos, os 6-O-(β -D-glucopiranosil)-1-O-octanoil- β -D-glucopiranosose e ácido asperulosídico, A atividade estava associada com os efeitos inibidores destes compostos sobre a atividade de AP-1 (fator de transcrição eucariótica). Esses mesmos compostos foram capazes de bloquear a fosforilação de c - jun, um substrato de JNK (proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular), que também faz a atividade de AP-1 e a transformação celular. Além disso, algumas frações ricas em polissacarídeo tiveram resultados positivos contra neoplasias pulmonares, principalmente o carcinoma de pulmão de Lewis testado em ratos. Notou-se que no caso de neoplasias mamárias, o fruto Noni induziu o composto 7,12-di-metilbenz[e] [a]-antraceno (DMBA) e seu suco mostrou efeitos positivos para atividades antimutagênica induzida em ratos. (GUPTA; SANTANA, 2012).

Sabendo-se que a fruta Noni possui efeitos antioxidantes positivos, Breen, 2004 destacou que o fruto Noni tem o poder de estimular a produção de óxido nítrico, um gás que tem produção nas células do corpo e sua função é de dilatar os vasos sanguíneos, normalizando a pressão arterial, melhorando assim a circulação e oxigenação, tem capacidade de prevenir a angina pectoris e a impotência sexual, melhora a memória, ajuda no combate de radicais livres, inibe coagulação prematura do sangue, evita oxidar o “mau” colesterol (LDL), previne bloqueios nas artérias que causam infartos cardíacos e cerebrais. Outros destaques, é que melhora o sistema imunológico contra bactérias, vírus e células cancerígenas, melhorando

a eficiência da comunicação entre células cerebrais o todo o resto do corpo e outros benefícios destacados por eles.

Os relatos pelo mundo do isolamento de bactérias consideradas resistentes a antibióticos vêm se agravando, este problema surge, principalmente, devido à utilização demasiada e generalizada de antibióticos para o tratamento humano, além do emprego no cuidado com animais e também na agricultura. A falta de conhecimento agrava esse problema, pois ainda não se conhecem novos antibióticos que possam contornar essas resistências. Diante disso, a utilização de plantas e frutos pode surgir como uma opção para a descoberta de novas fontes de substâncias com atividade antimicrobiana, contribuindo para modificações nessas estatísticas. (RIVERA et al., 2011). O fruto noni recebe destaque em literatura como uma planta que possua atividade antibacteriana. Existem relatos em estudos prévios de que o fruto noni tem potencial de inibir bactérias como retirar o grifado de tudo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* e *Shigella*. (ATKINSON, 1956 citado por CHAN-BLANCO et al., 2006). Esses efeitos antibacterianos são justificados devido ao fato de essa fruta possuir compostos fenólicos, como alizarina, escopoletina e outras antraquinonas. (ATKINSON, 1956 citado por COSTA, 2011).

Foi relatado também que o extrato obtido do fruto seco noni apresentou eficácia frente a bactérias como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e mais uma descoberta, a inibição de *Streptococcus pyogenes* (LOCHER et al., 1995).

Noni recebeu destaque em outro estudo realizado com a fração etanólico, principalmente inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que muitas vezes representam os principais agentes presentes em infecções generalizadas em hospitais. (SADER et al., 2001).

De acordo com recentes estudos, noni possui princípios ativos que contribuem para sua ação antibacteriana. Segundo Ramesh et al. (2012), o fruto noni possui vários metabólitos secundários ativos, tais como alcalóides, flavonóides, saponinas e esteróides em diferentes estágios de maturação do fruto, apresentando ação frente à *Escherichia coli*, abreviar *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* entre outros, os resultados obtidos neste estudo mostraram maior relevância com o fruto em estado de maturação mais avançado.

O fruto noni também apresentou atividade antifúngica, frente à *Trichopyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Trichopyton mentagrophytes*, *Microsporium gypsiun*, *Trichopyton tonsurans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Helementho sporain*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp. Noni apresentou halo

de inibição de 7 mm frente a todos os fungos avaliados mesmo em baixas concentrações (SIDDIQUI et al., 2014).

Apesar dos inúmeros efeitos terapêuticos associados aos componentes extraídos de Noni, foram visualizados após alguns testes que a *M. citrifolia*, possui algumas reações adversas. O suco eleva as enzimas lactato desidrogenase e a transaminase que são enzimas hepáticas, pode potencializar os efeitos dos antiinflamatórios impedindo assim o crescimento de novos vasos sanguíneos. Por ter alto teor de açúcar e potássio, pode comprometer portadores de diabetes e fazer com que a função renal destes pacientes decaia. Além disso, para os pacientes que estão em tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos, os efeitos podem ser ainda mais devastadores por sua ação e efeito oxidante reagir com radiação ionizante e os quimioterápicos. (NASCIMENTO, 2012).

No entanto, em experimentos com ratas *Wistar* (linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*), tratadas com extrato seco do fruto Noni, Muller (2007), observou que ocorreu atividade antiestrogênica e ausência de efeitos adversos sobre as prenhes quando administrado no período de pré-implantação, porém afetou o desenvolvimento pré-natal promovendo aumento dos índices de absorção, fazendo com que surgissem fetos pequenos e a presença de hérnia umbilical. Outro relato deste estudo foi a ausência de alterações no desenvolvimento geral quando o extrato foi administrado durante a prenhez e ausência toxicológica. Já para as ratas que foram manipuladas com o extrato seco (aquoso) da fruta, observou-se um desenvolvimento imaturo no período gestacional e no mecanismo de parturição. Assim, Gupta e Santana (2012), destacam que “[...] Não é aconselhável à administração durante a gravidez, especialmente durante o último mês, devido à constatação de efeitos relaxantes em torno do músculo uterino.”

Para pacientes com doença renal crônica, que apresentam insuficiência renal com taxa de filtração glomerular inferior a 15 e que necessitam de hemodiálise, o consumo do suco da fruta Noni não é recomendado, pois possui um alto teor de potássio, o que pode contribuir para o desenvolvimento de hipercalcemia. (GUPTA; SANTANA, 2012). O suco apresenta cerca de 56mg/L de potássio, valor que é considerado alto para portadores de problemas renais, e aqueles que o consomem e possuem esse problema, não são capazes de eliminar essa concentração de potássio. (MUELLER *et al.*, 1999 apud NASCIMENTO; 2012, p. 23).

Mesmo com recomendações de uso e formas de manuseio desta fruta, os relatos de efeitos adversos ainda persistem devido ao consumo de *M. citrifolia*, sendo um dos principais, a hepatotoxicidade causada, inclusive pela ingestão de seu suco. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2007).

Dentre as pesquisas que ganharam destaque nos informativos da ANVISA está a descrita por Millonig *et al.* 2005, citado por ANVISA, 2007, p.5, como o relato do primeiro caso de hepatotoxicidade causado pelo suco Noni:

[...] Um homem de 45 anos foi encaminhado à Divisão Clínica de Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Médica de Insbrueque, Áustria, por apresentar níveis elevados de transaminases. A anamnese conduzida revelou que o paciente não utilizava medicamentos e bebidas alcoólicas de forma regular e os exames conduzidos descartaram as prováveis causas patológicas do aumento das transaminases. Posteriormente, o paciente admitiu que estava ingerindo diariamente, nas últimas semanas, um copo de suco de noni. O relato sugeriu uma reação de hepatotoxicidade por drogas, o que foi confirmado por uma biopsia hepática. O paciente interrompeu imediatamente o consumo do produto e em um mês os níveis de transaminases estavam normalizados.

Após este primeiro caso, pesquisadores estudaram a fundo o potencial da fruta Noni para descobrir se os casos de hepatotoxicidade teriam mesmo ligação com o consumo do suco de Noni. Com o passar do tempo, outros casos foram descobertos. Andrada *et al.*, 2007 citado por ANVISA, 2007, p.4 destacaram a influencia do suco Noni como causadores de hepatotoxicidade:

[...] “consumo de uma preparação de noni ao desenvolvimento de hepatotoxicidade grave em uma mulher de 33 anos foi identificado na Espanha. A paciente com dor abdominal foi hospitalizada e os exames conduzidos sugeriram um quadro de hepatite aguda. Após a exclusão das causas reconhecidas de hepatite aguda, a equipe médica suspeitou de hepatotoxicidade causada por fármacos. A paciente confirmou que duas semanas antes, em sua viagem ao Equador, consumiu durante vários dias um preparado conhecido como Noni. Os autores classificaram como “provável” a relação de causalidade entre o consumo da preparação de noni e a doença hepática. Em poucas semanas, as alterações bioquímicas e os sintomas desapareceram.”

Diante de inúmeros casos, a ANVISA (2007, p. 5), considera que com o “[...] intuito de proteger e promover a saúde da população, os produtos contendo Noni não devem ser comercializados no Brasil como alimento até que os requisitos legais que exigem a comprovação de sua segurança de uso sejam atendidos.”

Assim, a importância deste estudo está na obtenção de diferentes extratos a partir do fruto Noni e investigação de suas possíveis ações terapêuticas frente ao desenvolvimento tumoral e bacteriano.

2 JUSTIFICATIVA

O numero de casos de neoplasias, não só no Brasil, mas em todo o mundo, vem aumentando, e novas técnicas e formas para combatê-las estão surgindo para assim diminuir os índices dessa doença que afeta diversas pessoas. Com pesquisas para novos tratamentos, principalmente as de plantas consideradas medicinais, pode-se ter a chance de fazer com que esses números decaiam. Além disso, a atividade antimicrobiana de plantas medicinais vem ganhando destaque. Dentre as plantas investigadas quanto ao suposto potencial antitumoral e antimicrobiano encontra-se a *Morinda citrifolia*, no entanto, pesquisas que busquem validar estes possíveis efeitos e assegurar seu uso são fundamentais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade antitumoral dos extratos etanólico e etéreo do fruto de *M. citrifolia* frente ao tumor ascítico de Ehrlich (TAE) inoculado em camundongos suíços e avaliar a atividade antibacteriano destes.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o comportamento dos extratos etanólico (compostos fenólicos) e etéreo (óleos essenciais) obtidos dos frutos da *Morinda citrifolia* quanto ao desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), em camundongos suíços machos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos etanólico (compostos fenólicos) e etéreo (óleos essenciais) do fruto de *M. citrifolia* através da técnica de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

4.1.1 Obtenção dos frutos de *Morinda citrifolia*

Para realização desta pesquisa, obteve-se o fruto Noni, sendo que este foi encaminhado para o Herbário da Universidade Sagrado Coração – USC, onde realizou-se a identificação botânica. Em seguida, os frutos foram acondicionados em estufa com circulação de ar para secagem a 45°C. O material seco foi pulverizado em moinho de facas. As etapas da transformação dos frutos *in natura* em droga vegetal estão representadas na Figura 5.

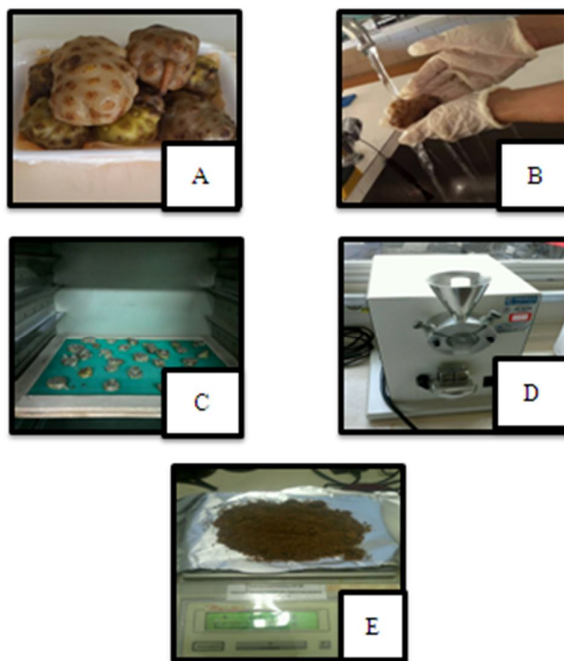


Figura 5 - Etapas da transformação dos frutos *in natura* em droga vegetal. A: Frutos *in natura*; B: Higienização dos frutos; C: Secagem em estufa com circulação de ar a 45°C; D: Moinho de facas para pulverização; E: Droga vegetal seca e pulverizada. FONTE: Arquivo próprio.

4.1.2 Obtenção da fração de acetato de etila e extrato etéreo do fruto de *M. citrifolia*

Foram pesados 15g da droga vegetal e misturados com água destilada (qsp), agitada a temperatura ambiente, até completa dissolução. A solução resultante foi filtrada e transferida para funil de separação e extraída com acetato de etila (5 x 25 mL). As fases orgânicas foram reunidas em béquer, secas com sulfato de sódio anidro, concentradas até secura em evaporador rotatório a vácuo (temperatura de 40°C). Os processos de extrações estão expostos na Figura 6.

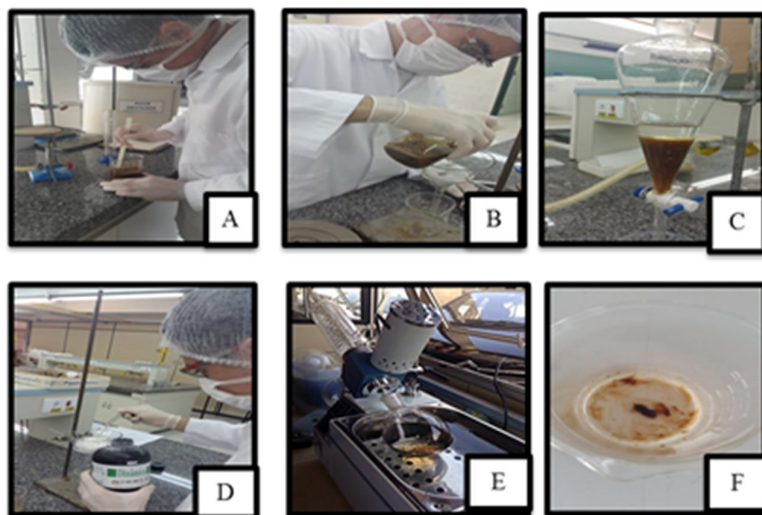


Figura 6 - Etapas de extração da fração acetato de etila: A: Mistura do extrato seco e pulverizado dos frutos com água (qsp); B: Filtração da solução; C: Adição do solvente acetato de etila; D: Filtração do extrato etanólico com sulfato de sódio anidro; E: Evaporação do solvente em evaporador rotatório a vácuo; F: Extrato da fração de acetato de etila bruto após evaporação do solvente.

FONTE: Arquivo próprio.

Segundo Simões et al. (2003), os óleos essenciais de uma planta podem ser extraídos, preferencialmente, com solventes apolares, como o éter, havendo também a extração de outros compostos lipofílicos. De acordo com este fundamento, o extrato etéreo foi obtido com a utilização do extrator de Soxhlet, sendo adicionado ao balão de fundo redondo 250 mL de éter (solvente). Foram confeccionados cartuchos contendo 15g da planta seca e pulverizada em papel manteiga que em seguida foram acoplados ao extrator. Após a padronização da temperatura de evaporação do éter (35°C) a extração foi realizada durante 4 horas. Posteriormente fez-se a evaporação do solvente em capela de exaustão para obtenção do extrato etéreo bruto. A Figura 7 ilustra essas etapas da extração.

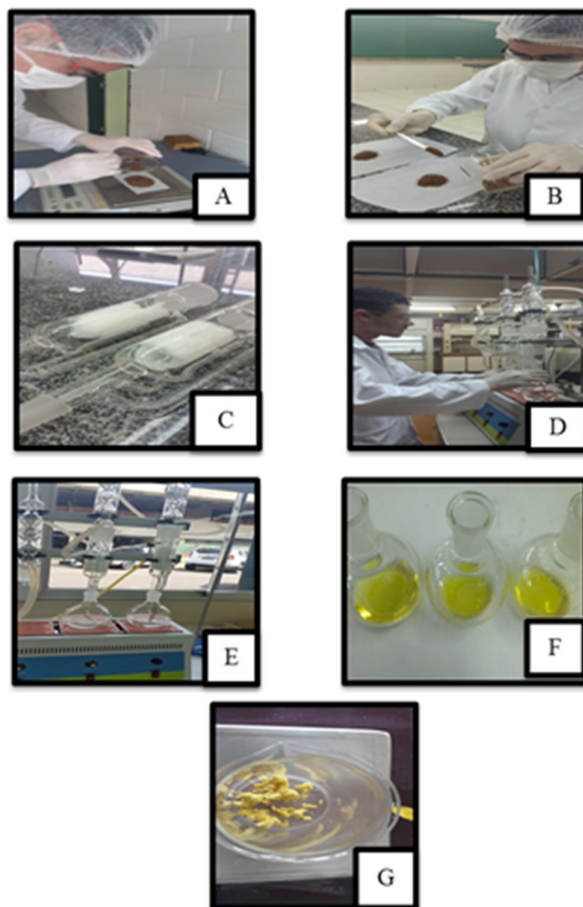


Figura 7- Etapas de obtenção do extrato etéreo do fruto Noni: A: Pesagem do extrato seco e pulverizado; B: Confeção dos cartuchos em papel manteiga; C: Acondicionamento dos cartuchos no dispositivo do Extrator de Soxhlet; D: Extração a 35°C por 4 horas com solvente éter; E: Extrato etéreo acondicionado em capela para evaporação do solvente; F: Aspectos do óleo obtido do fruto após evaporação do éter.

FONTE: Arquivo próprio.

4.2 TESTE *in vivo*: NEOPLASIA

4.2.1 Grupos experimentais

Para o presente estudo utilizou-se 22 camundongos suíços, machos adultos, concedidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC – Bauru/SP. Segue abaixo, informações relevantes deste grupo para estudo. Neste projeto foi padronizado um número de 4 a 6 camundongos para cada grupo. Estes foram divididos em:

- ✓ **Grupo Controle com Água (GNCA, n – 5):** Foi padronizada a administração de 0,2 mL por dia, administrada por gavagem;

- ✓ **Grupo Controle Água com Tween 80 (GNAT, n – 4):** O veículo aquoso foi manipulado com 2 mL de água destilada associada a 1 gota de Tween 80. Cada animal recebeu 0,2 mL deste veículo por gavagem;
- ✓ **Grupo Dosagem com extrato etéreo (GNFO, n – 6):** o extrato etéreo foi preparado na concentração de 500mg por dia. A dose foi convertida para o peso médio dos animais e concentrada em 0,2 mL de água com Tween 80, administrado por gavagem;
- ✓ **Grupo Dosagem com fração de acetato de etila (GNFF, n – 6):** a fração acetato de etila foi preparado na concentração de 500mg por dia. A dose foi convertida para o peso médio dos animais e concentrada em 0,2 mL de água, administrado por gavagem.

Durante a fase experimental, os camundongos ficaram no Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC – Bauru/SP, onde receberam ração balanceada e água *Ad libitum*.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno (4 a 6 animais por gaiola), sendo mantidos em recinto com controle de temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Para a administração, os animais foram manuseados cuidadosamente, num ambiente isento de barulho para reduzir o *stress* dos grupos tratados.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/USC, registrado com o protocolo nº 21/14 (Anexo A).

4.2.2 Manutenção do Tumor Experimental de Ehrlich

Para o estudo, utilizou-se o tumor de Ehrlich, neoplasia transplantável originária de carcinoma mamário de camundongos machos. Apresentando na forma ascítica, mantido no Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC – BAURU/SP. As células neoplásicas foram mantidas *in vivo*, através do implante de 10^3 células tumorais por via intraperitoneal.

4.2.3 Implante tumoral e Obtenção do lavado Peritoneal

Após a obtenção das células tumorais, estabeleceu-se a concentração de $10^3/\text{mL}$ e cada animal foi inoculado por via intraperitoneal com volume de 0,1 mL da suspensão. Após sete dias de administração dos 4 diferentes grupos de tratamento, os animais do experimento foram eutanasiados, sendo submetidos ao uso do anestésico inalatório Isoflurano 100 mL. Previamente em seguida, com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3mL de solução fisiológica estéril na cavidade peritoneal. O abdômen do animal foi massageado e

posteriormente realizado uma incisão no abdômen com o objetivo de se introduzir uma pipeta e recolher o lavado peritoneal. As etapas da obtenção do lavado peritoneal estão representados na figura 8.

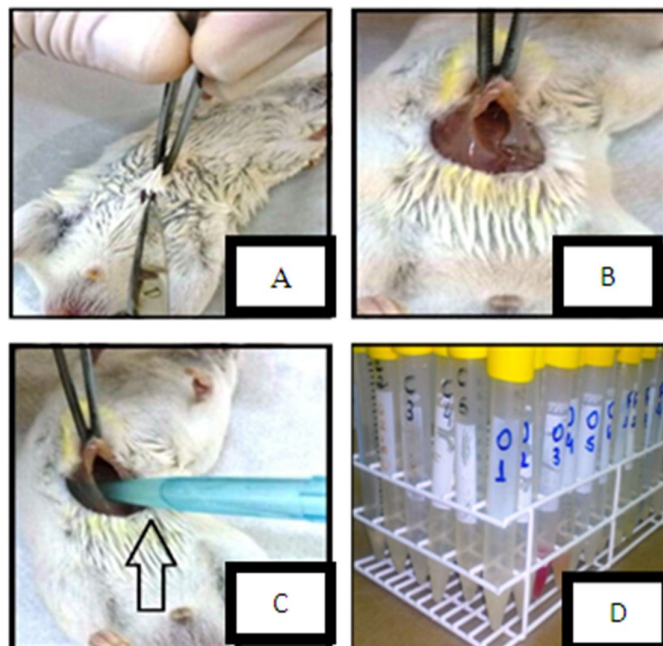


Figura 8 - Etapas para obtenção do lavado peritoneal – A: Incisão abdominal; B: Localização da região peritoneal; C: Obtenção do lavado de células tumorais; D: Armazenado em tubos de fundo cônico para contagem das células tumorais. FONTE: Arquivo próprio.

4.2.4 Contagem das células neoplásicas

Após a remoção do lavado peritoneal, realizou-se diluição da suspensão de células na proporção de 1:100, sendo separada uma alíquota das células tumorais que foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico e contador de células manual. Previamente à contagem adicionou-se o corante Azul de Trypan, para melhor visualizar as células tumorais vivas e mortas.

4.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Empregou-se o teste *t-Student*, com valor de significância de $p < 0,05$.

4.3 TESTE *in vitro*: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.3.1 Determinação da atividade antibacteriana

As técnicas descritas na análise microbiológica foram realizadas segundo QUEIROZ et al. (2014), com modificações.

4.3.2 Linhagens de micro-organismos

Foram utilizados micro-organismos fornecidos pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): *Escherichia coli* (INCQS 00182), *Pseudomonas aeruginosa* (INCQS 00026), *Staphylococcus aureus* (INCQS 00015), *Streptococcus pyogenes* (INCQS 00079). Todos estão armazenados no Laboratório de Biociências da Universidade do Sagrado Coração.

4.4 DILUIÇÕES DOS EXTRATOS

4.4.1 Diluição da fração de acetato de etila de *Morinda citrifolia*

Pesou-se 50mg da fração de acetato de etila com o auxílio de uma balança analítica digital e diluiu-se em 1000 µL de DMSO, previamente esterilizado. Em seguida, realizou-se diluição 1:10 em meio de cultura caldo BHI (Brain Heart Infusion), sendo que a faixa de concentração avaliada do extrato foi entre 1250-1,20 µg/mL.

4.4.2 Diluição do extrato etéreo de *Morinda citrifolia*

Pesou-se 35µg do óleo com o auxílio de uma balança analítica digital e em seguida realizou-se diluição em 300µL de Tween 80 a 1%, previamente esterilizado. Em seguida, realizou-se diluição 1:10 em meio de cultura caldo BHI, sendo que a faixa de concentração avaliada do óleo foi entre 11,6-0,005%.

4.5 PREPARAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA O ESTUDO

4.5.1 Preparo do inóculo

A escala de 0,5 de McFarland foi previamente confeccionada adicionando-se 0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 99,5 ml de ácido sulfúrico a 1%. Em seguida transferiu-se 2 mL dessa suspensão para uma cubeta espectrofotométrica. A absorbância foi calibrada a 100% em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 625 nm, utilizando água destilada. Em seguida colocou-se a suspensão do tubo 0,5 de McFarland, esperando-se obter uma absorbância de 0,08 a 0,1. Esta suspensão foi utilizada para padronização da suspensão de bactérias em número de células por mL. Obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland significa que há $1,5 \times 10^8$ cel/mL.

As bactérias foram cultivadas por 24 h a 35 ± 2 °C, em seguida foram suspensas em 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada na escala 0,5 de McFarland. Após, realizou-se diluição 1:300 em caldo BHI, desta aplicou-se 100 µL em todos os poços da microplaca, obtendo-se um inóculo final de $2,5\times 10^5$ cel/mL.

4.5.2 Preparo dos controles

Utilizou-se o antibiótico ampicilina como substância controle, uma vez que as cepas bacterianas utilizadas são sensíveis à sua ação. Procedeu-se a dissolução de 500 mg de ampicilina em 100 mL de água destilada esterilizada, em seguida, diluiu-se 1:10 em solução salina esterilizada, a concentração da solução estoque foi de 500 µg/mL, em seguida diluiu-se esta solução 1:10 em caldo BHI e aplicou-se 100 µL no primeiro poço da microplaca, realizou-se então diluição seriada sendo a faixa de concentração avaliada para este controle foi de 125-0,06 µg/mL. Também foram realizados os controles de esterilidade dos meios de cultura utilizados, controle de esterilidade da fração acetato de etila e extrato etéreo de *Morinda citrifolia* e controle do solvente (DMSO) a partir da diluição 1:5 (v/v) em meio de cultura.

4.5.3 Método de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a bactérias seguiu a Norma M7-A9 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012). Realizou-se o método de determinação da CIM por diluição em caldo em microplaca de 96 orifícios onde foram depositados 100 µL de caldo BHI, em seguida acrescentou-se 100 µL das soluções dos compostos avaliados e foram feitas diluições seriadas. Após diluição foram acrescentados 100 µL das suspensões dos micro-organismos. As microplaca foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Seguindo o período de incubação, observou-se o desenvolvimento do micro-organismo em relação ao controle negativo, isto é, controle de esterilidade do meio de cultura. Foi considerada como CIM a menor concentração da fração acetato de etila e extrato etéreo de *Morinda citrifolia* onde não ocorreu o desenvolvimento dos micro-organismos. Os testes foram realizados em duplicata.

4.5.4 Método de determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação destas concentrações empregaram-se as séries utilizadas para a determinação da CIM. Após o período de incubação e análise dos resultados obtidos para a

CIM, com o auxílio de uma pipeta multicanal plaqueou-se cada poço da microplaca. Utilizou-se o meio Ágar BHI em placa de Petri de 12 mm de diâmetro que foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. As CBMs foram então observadas pela ausência ou presença de crescimento dos micro-organismos (QUEIROZ et al., 2014). Algumas etapas deste procedimento estão representadas na Figura 9.

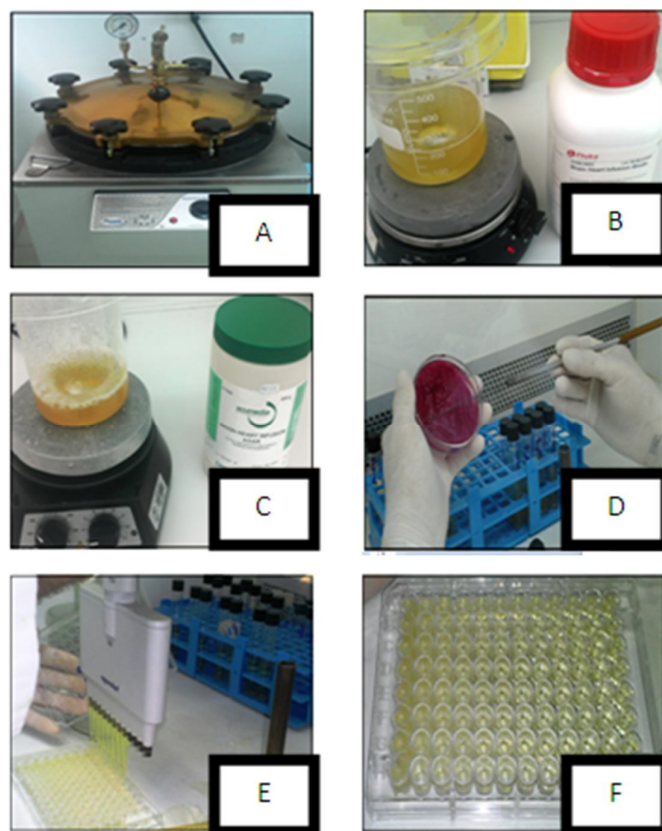


Figura 9 – Etapas realizadas para a determinação de CIM – A: Autoclave utilizada para esterilização dos materiais; B: Preparação do caldo Brain-Heart Infusion Broth (BHI) utilizado na microdiluição e diluição do inóculo; C: Preparação do Agar Brain-Heart Infusion (BHI) para cultivo das bactérias; D: Semeadura das linhagens bacterianas em Agar BHI, que foram incubadas por 24h, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa; E: Realização do método CIM; F: Microplaca pronta para incubação. FONTE: Arquivo próprio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *M. citrifolia*

A comparação da média de células tumorais entre os grupos controle e tratados estão expostas no Gráfico 1. Nota-se que entre o grupo controle água e o grupo fração fenólica ocorreu um aumento de células tumorais estatisticamente significativo ($p= 0,025$) no grupo tratado com a fração acetato de etila. O mesmo foi observado, entre o grupo controle água com Tween 80 e fração oleosa, onde esta fração da fruta também aumentou a média de células tumorais de maneira significativa ($p= 0,003$).

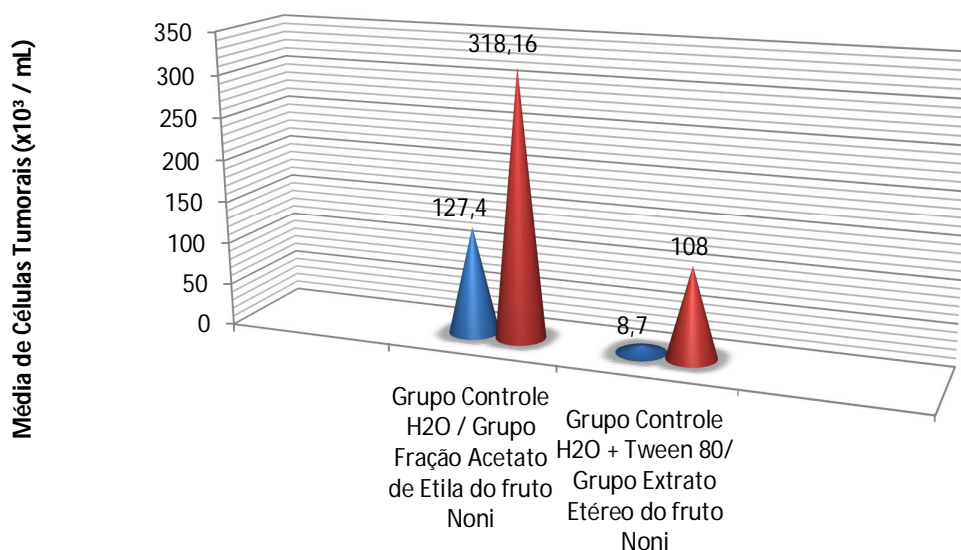


Gráfico 1: Comparação das médias de células tumorais entre o grupo controle água ($\pm 78,83$) e grupo fração acetato de etila ($\pm 140,42$) mostrando um aumento significativo nas células tumorais do grupo fenólico ($p=0,025$); entre grupo controle água e Tween 80 ($\pm 5,24$) e grupo extrato etéreo ($\pm 54,83$) mostrando aumento estatisticamente significativo na fração oleosa ($p= 0,003$). Test *t-student* ($p < 0,05$).

FONTE: Dados obtidos através da pesquisa realizada.

Através dos resultados obtidos, foi evidenciado que as médias de células tumorais aumentaram em comparação aos respectivos grupos controle. Segundo Wang et al.(2002), o potencial antitumoral dos frutos de *M. citrifolia* ou Noni foi avaliado frente a diferentes tipos de tumores. Através de vários testes com o suco de Noni e seus componentes, houve redução na formação de ductos de ácido desoxirribonucléico com 7,12-dimetilbenzeno [α] antraceno (ADN-DMBA) em 90% dos tumores renais, 70% hepáticos, 60% cardíacos e 50 % pulmonares. Diante disso, uma possível justificativa para falha no efeito antitumoral

evidenciada no presente estudo seja o tipo de tumor experimental adotado, ou seja, os componentes oleosos e fenólicos dos frutos de Noni não foram eficientes no combate do tumor ascítico de Ehrlich.

Em relação aos veículos adotados para incorporação dos extratos fenólico e oleoso, a adição do Tween 80 foi um diferencial necessário quanto à dissolução da fração oleosa ao seu veículo aquoso. O Tween 80, também conhecido como polisorbato 80 é tradicionalmente utilizado como agente tensoativo ou dispersante de medicamentos autorizado para uso interno. Este tensoativo é muito solúvel em água, solventes orgânicos como tolueno e álcool. (IRWIN, 2006), sendo empregado em formulações farmacêuticas como co-solvente, auxiliando na solubilização de fármacos lipofílicos e/ou pouco solúveis (PACKER e DA LUZ, 2007, p. 381 a 388). Na comparação das médias de células tumorais entre o grupo controle com água destilada e o grupo controle com água destilada e Tween 80 foi evidenciada redução significativa ($p=0,021$) de células tumorais no grupo com tensoativo, conforme ilustra o Gráfico 2.

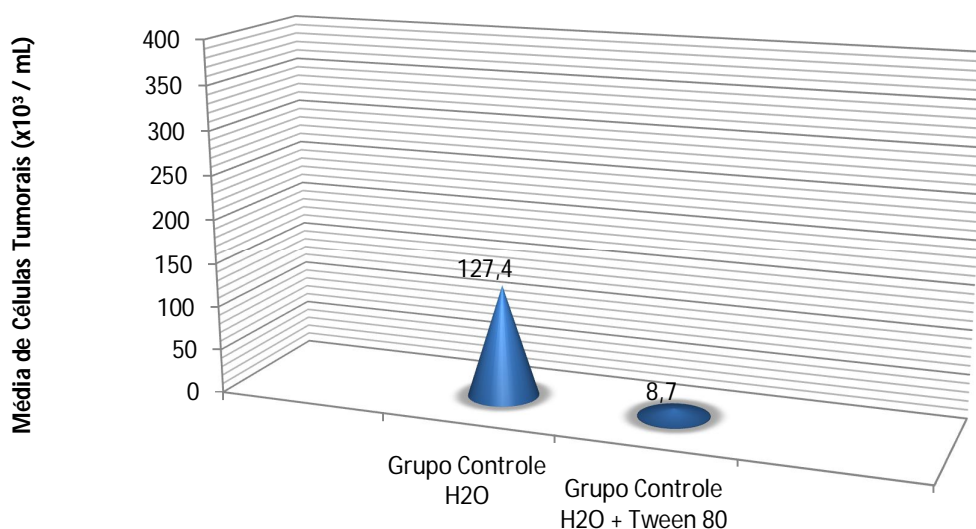


Gráfico 2 -Comparação das médias de células tumorais entre o grupo controle água ($\pm 78,83$) e o grupo controle água e Tween 80 ($\pm 5,24$), $p=0,021$. Teste *t-Student* ($p<0,05$).
FONTE: Dados obtidos através da pesquisa realizada.

Perante supostos mecanismos sugeridos na literatura consultada, o mais pertinente envolve uma proteína de membrana chamada glicoproteína P (P-gP), que é expressa em células normais do fígado, rins, cérebro e trato gastrointestinal (HEBERT, 1997). Nas células normais, ela participa de processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos, no entanto, também está presente na membrana de células tumorais, onde

participa de um mecanismo associado à resistência destas células a alguns quimioterápicos. Esta glicoproteína tem a capacidade de “expulsar” quimioterápicos e no caso de células tumorais resistentes, sua expressão na membrana aumenta a ponto de reduzir a eficácia do quimioterápico no tratamento da neoplasia. (KING et al., 2001, p.268 e LIU e LIU, 2001).

Segundo Woodcock et al.,(1992, p 62-68) o polisorbato 80 ou Tween 80 foi capaz de inibir a atividade da glicoproteína P em testes realizados *in vitro*, aumentando a concentração celular da daunorubicina, um conhecido substrato desta proteína, em culturas celulares. Sabendo-se disso, no presente estudo, o grupo controle tratado com água destilada e Tween 80, supostamente pode ter desencadeado um acúmulo de água destilada dentro das células tumorais. A água destilada apresenta quantidade menor de solutos removidos pelo processo de destilação quando comparada as soluções isotônicas. Diante disto, sendo a água destilada um veículo hipotônico, este, supostamente pode ter alterado a osmolaridade das células tumorais, favorecendo sua destruição. Apesar disto, novos estudos precisam elucidar este mecanismo, uma vez que este resultado foi inesperado, mas que segundo a literatura, é plausível.

5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *M. citrifolia*

Os resultados obtidos evidenciaram que a fração acetato de etila apresentou CIM e CBM frente a *S. pyogenes* na concentração de 1250 µg/mL e que o extrato etéreo apresentou CIM na concentração de 1,45% e CBM uma concentração acima a 2,9% frente a esta mesma linhagem bacteriana, porém notou-se que tanto a fração acetato de etila como o extrato etéreo de *M. citrifolia* não apresentou CIM e CBM frente às outras linhagens bacterianas nas máximas concentrações avaliadas como representado na Tabela 1.

Tabela 1: Atividade antibacteriana da fração acetato de etila e do extrato etéreo de *M. citrifolia*

Micro-organismos	Fração acetato de etila ($\mu\text{g/mL}$)		Extrato etéreo (%)		Controle Ampicilina ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	<i>E. coli</i>	>1250	>1250	>11,6	>11,6	1,9
<i>P. aeruginosa</i>	>1250	>1250	>11,6	>11,6	7,8	>125
<i>S. aureus</i>	>1250	>1250	>11,6	>11,6	0,24	>125
<i>S. pyogenes</i>	1250	1250	1,45	2,9	0,97	0,97

FONTE: Dados obtidos através da pesquisa realizada.

Destaca-se que os ensaios foram corretamente realizados, uma vez que os controles mostraram-se válidos. Observa-se na Figura 10 a microplaca com os controles empregados na técnica de microdiluição em caldo para a determinação da CIM. Nas fileiras de A-D encontram-se os controles utilizando o antibiótico ampicilina. Na fileira E encontra-se o controle de esterilidade da fração acetato de etila que, apesar de apresentar turvação, verificou-se após a semeadura em Agar BHI, que esta se tratava da turvação do próprio extrato. Na fileira F está o controle de esterilidade do extrato etéreo que também não apresentou crescimento microbiano, sendo mais uma vez a turvação observada devido à própria cor desse extrativo. Na fileira G encontram-se os controles de esterilidade do caldo BHI empregado nos ensaios, na fileira H encontram-se os controles de DMSO, mostrando que este solvente não influenciou na ação apresentada pela fração e extrato obtidos neste estudo em relação à inibição observada, uma vez que mesmo na presença deste houve crescimento bacteriano.

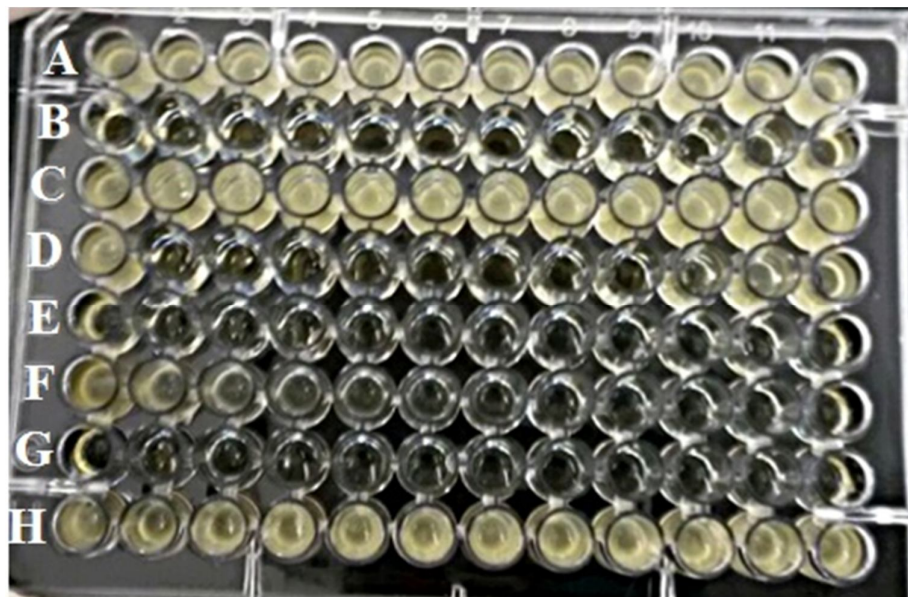


Figura 10 – Microplaca com os controles empregados para determinação da CIM; Fileira A-D: controle com ampicilina frente aos micro-organismos avaliados nesse estudo; Fileira E: controle de esterilidade do extrato fenólico do fruto de *M. citrifolia*; F: controle de esterilidade do óleo essencial do fruto de *M. citrifolia*; Fileira G: controle de esterilidade do meio de cultura utilizado (BH); Fileira H: controle da ação do solvente DMSO.

FONTE: Dados obtidos através da pesquisa realizada.

Após a realização da leitura da CIM realizou-se a determinação da CBM, que é a menor concentração da substância avaliada capaz de inativar completamente os micro-organismos. Esta é observada quando se retira o micro-organismo da condição de tratamento e o coloca novamente em condições de crescimento, como observado na Figura 11.

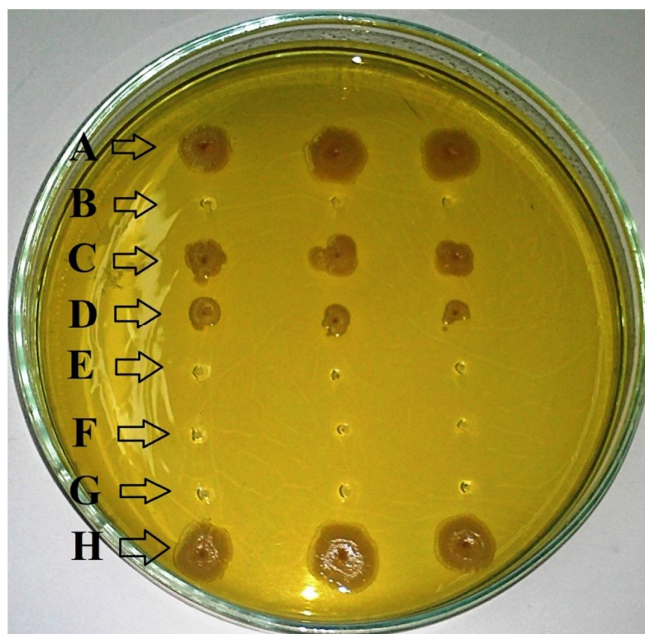


Figura 11: Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), representação de uma das 4 placas de Petri utilizada para a microplaca de controle de esterilidade e com ampicilina. Fileira A: *P. aeruginosa* com ampicilina, houve crescimento; Fileira B: *S. pyogenes* com ampicilina, não houve crescimento; Fileira C: *E. coli* com ampicilina, houve crescimento; Fileira D: *S. aureus* com ampicilina, houve crescimento; Fileira E e F: controle de esterilidade da fração acetato de etila e extrato etéreo do fruto de *M. citrifolia*, não houve crescimento microbiano; Fileira G: controle de esterilidade do meio de cultura utilizado BHI, não houve crescimento microbiano; Fileira H: controle do solvente DMSO com crescimento normal de um dos micro-organismos avaliados (*P. aeruginosa*), demonstrando que os resultados de atividade antibacteriana observado neste estudo não tem relação com o emprego deste solvente.
 FONTE: Dado obtido através da pesquisa realizada.

A partir da observação dos resultados encontrados neste estudo, nota-se que a fração acetato de etila e extrato etéreo de *M. citrifolia* não apresentaram resultados extremamente significativos, uma vez que atuaram somente frente a *S. pyogenes*. Porém, há que se considerar que o uso de acetato de etila e do éter pode ter gerado extratos que não possuíam substâncias capazes de inativar micro-organismos. Silveira et al. (2011), ao fazer a preparação dos extratos para seu estudo, utilizou a metodologia de maceração utilizando álcool etílico 92° GL como o solvente principal das extrações, obtendo portanto um extrato etanólico com propriedade fotoquímicas diferentes das possivelmente encontrados neste trabalho, realizou a determinação de CIM, encontrando resultados positivos frente ao micro-organismo testado, que inclui uma cepa de *Staphylococcus aureus*.

Usha et al. 2010, avaliou a atividade antibacteriana de 6 extratos diferentes de Noni, sendo estes extrato: etéreo petróleo, clorofórmio, benzeno, acetato de etila, etanólico e aquoso, na concentração de 2-10mg/mL, frente a 4 micro-organismos (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger*), com discos impregnados com os diferentes extratos da planta. Os resultados sugeriram que houve um efeito crescente da zona de inibição quando se aumentava

a concentração do extrato da planta e que todos os extratos foram efetivos, onde frente a *E. coli* a máxima zona de inibição foi observada com o extrato etér de petróleo (halo de 20 mm na concentração 10mg/mL), porém, para as outras bactérias testadas com o éter de petróleo, benzeno e acetato de etila não houve a mesma relevância.

O extrato metanólico de Noni mostrou atividade antibacteriana. Natheer et al. (2012), realizou estudos com extrato metanólico, etanólico e de acetato de etila obtidos da fruta, folhas e caule de Noni avaliado nas concentrações de 12,5-100mg/mL para determinação de CIM frente a seis micro-organismos e ainda pela técnica de disco difusão com discos contendo 100µg do extrato da fruta frente a 12 micro-organismos diferentes. Como resultados, estes autores observaram que o extrato metanólico foi o único que conseguiu inibir todos os micro-organismos pela técnica de disco difusão e que pela técnica de microdiluições em caldo para a determinação da CIM foram necessárias altas concentrações dos extratos para inibir *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas diminuta*, *enterobacter cloacae* e *S. aureus* ATCC6538 que foram testadas.

Serafini et al. (2011) destacou em seus estudos, a baixa efetividade do extrato aquoso obtido da *M. citrifolia* em testes antibacterianos. Sua avaliação foi realizada com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e os critérios para verificação da atividade antibacteriana foram classificados e observados como CIM até 100 µg/mL como boa atividade antibacteriana; CIM de 100 a 500 µg/mL como moderada atividade e CIM acima de 1.000 µg/mL como inatividade. O extrato passou por um processo de triagem fotoquímica onde foram analisados quantitativamente a presença de fenóis, alcalóides, taninos, cumarinas, triterpenos, flavonóides e saponinas. Como resultados, observaram que não houve relevância em relação aos extratos e as bactérias testadas (*Salmonella typhi*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophyla*, *Micrococcus species*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*), com CIM nas concentrações de 0,625 a >10. Estes autores sugeriram que a ausência de antraquinonas, um metabólito importante para ação antibacteriana desta fruta pode ter levado a estes resultados. Diante disso, é evidente a necessidade de estudos futuros com o intuito de se esclarecer a constituição fitoquímica dos extrativos obtidos neste estudo e elucidar as melhores ações biológicas apresentadas por estes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- ✓ A fração acetato de etila e o extrato etéreo obtidos dos frutos da *M. citrifolia* contribuíram para o aumento de células do tumor ascítico de Ehrlich;
- ✓ O veículo contendo água destilada com tensoativo Tween 80 apresentou capacidade significativa em reduzir as células do Tumor de Ehrlich em comparação ao veículo contendo somente água destilada;
- ✓ A fração acetato de etila (composto fenólico) e extrato etéreo (composto oleoso) do fruto de *M. citrifolia* não foram efetivos frente as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, porém foram efetivos frente ao *S. pyogenes*.

REFERÊNCIAS

Andrada, J.M.L.-C.; Castilla, S.L.; Olvera, M.D.F.; Vidal, A.A. Hepatotoxicidad grave asociada al consumo de Noni (*Morinda citrifolia*). **Revista Española de Enfermedades Digestivas**; vol. 99, nº. 3, pp. 179-181, 2007.

AZEVEDO, M. C. A. de. **Avaliação da Participação das Células B-1 no Crescimento do Carcinoma de Ehrlich**. 2007. 49f. Dissertação (Obtenção do Título de Mestrado na Área de Imunopatologia Veterinária) – Universidade Paulista – UNIP – São Paulo – 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe técnico sobre Noni**. Brasília, DF, 2008.

BREHMER, J. S. **Estudo de Extratos de Plantas Medicinais no Desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí – Itajaí – 2005.

CASTRO, R. de. C. B. de. Quais são as propriedades da *Morinda citrifolia* (Noni)? **Nutritotal.com**, c2011. Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/perguntas/?acao=bu&categoria=1&id=609>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

CHAN-BLANCO, Y. et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Composition and Analysis**, v. 19, p. 645-654, 2006.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard; document M7-A9, Wayne, PA, USA, 2012.

COSTA, A. B. **Atividade Antioxidante *in vitro* e Antifúngica do Noni (*Morinda Citrifolia* L.)**. 2011. 89f. Dissertação (Obtenção do Grau de Mestre pelo curso de Pós –Graduação em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Piauí – Teresina – 2011.

FRASSON, A.; ZERWES, F. Câncer de Mama. In: AZEVEDO, D. R.; BARROS, M. C. M. de.; MULLER, M. C. (Org.). **Psicooncologia e Interdisciplinaridade: Uma experiência na Educação a Distância**. Porto Alegre: Edipucrs, 2004. p. 95-108.

GUERRA, J. L.; **Aspectos do Processo Inflamatório em Camundongos Portadores do Tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. 79f. Tese (Doutorado Em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

GUPTA, M. P.; SANTANA, A. I. El fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.). **Revista de Fitoterapia**, Panamá, v. 12, n. 1, p. 45-52, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, p. 1-7.2001.

Hebert, M.F. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 27, p. 201-214, 1997.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (2014). O que é câncer? Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> . Acesso em: 20 jun. 2014.

JUNIOR, J. C. S.; SOARES, L. F. M. Câncer de mama. In: VIEIRA, S. C. et al. **ONCOLOGIA BÁSICA**, 1. ed. Teresina, PI: Fundação Quixote, 1992, p. 41-61.

KING, M. et al. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 268-274, mar. 2001.

LANDIM, L. A. S. R. et al. Determinação de Compostos Fenólicos no Fruto do Noni (*Morinda citrifolia* Linn) in natura e pré-seco. In: CONGRESSO NACIONAL DA SBAN, 12., 2013. Foz do Iguaçu. *Anais...Foz do Iguaçu*: [s.n.]. p. 206.

LEWIS, S. L. et al. Conduas de enfermagem: Distúrbios Mamários. In:_____. **Tratado de enfermagem Médic-Cirurgica**. 8 ed. Rio de Janeiro, 2013, cap. 52.

LIU, X. D.; LIU, G. Q. P-glicoprotein regulated transport of glutamate at blood brain barrier. **Acta Pharmacologica Sinica: APS**, v. 22, n. 2, p. 111-116, feb. 2001.

LOCHER, C. P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 23-32, nov. 1995.

MAIA, L. D. M. et al. Descrição Morfológica e Caracterização Química do Noni (*Morinda citrifolia*). In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DE REDE NORTE E NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 15., 2009. Belém. *Anais... Belem-Pará*,[s.n.], 2009. p. 1-7.

MARQUES, N. F. Q. **Avaliação teratológica da exposição da *Morinda citrifolia* Linn em ratas Wistar**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MILLOING, G.; STADLMANN, S.; WOLFGANG, V. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology & Hepatology** 17 (4): 445-447, 2005.

MÜLLER, J. C. **Toxicidade Reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn**. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NASCIMENTO, L. C. S. **Caracterização Centesimal, Composição Química e Atividade Antioxidante do Noni (*Morinda citrifolia* L.) Cultivado no Município de Zé Doca-MA**. 2012. 69f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Serapédica, 2012.

NATHEER, S. E. et al. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 11, p. 783-788, mar. 2012.

PACKER, J. F., da LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 381-388, 2007.

QUEIROZ, G. M.; POLITI, F. A. S.; RODRIGUES, E. R.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARDOSO, C. R. P.; SANTOS, L. C.; PIETRO, R.C.L.R. Phytochemical characterization, antimicrobial activity and antioxidant potential of *Equisetum hyemale* L. (*Equisetaceae*) extracts. *Journal of Medicinal Food* in press

RAMESH, S. et al. Physicochemical, Phytochemical and Antimicrobial studies on *Morinda citrifolia* L. fruits at different maturity stages. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5. p. 473-476, 2012.

RIVERA, A. et al. Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. **Annals of Biological Research**, v. 2, n. 3, p. 491-497, 2011.

ROMANI, C. D. **Avaliação da ação antitumoral do extrato obtido do aveloz (*Euphorbia ticunalli*) no tumor ascítico de Ehrlich**. 2013. 22f. Projeto de Pesquisa (Graduação na Área Farmacêutica) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2013.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program., **Brazilian Journal of infectious Diseases**, Salvador, v. 5, n. 4, p. 200-214, aug. 2001.

SERAFINI, M. R. et al. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.

SIDDIQUI, B. S. et al. A Note on Anti-leishmanial, Spasmolytic and Spasmogenic, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Fruits, Leaves and Stem of *Morinda citrifolia* Linn – an Important Medicinal and Food Supplement Plant. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 159, 2014.

SILVEIRA, L. M. da S. et al. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AMOSTRAS DE FRUTO DO NONI (*Morinda citrifolia* L. - Rubiaceae) VENDIDAS EM FEIRAS LIVRES DE SÃO LUÍS, MARANHÃO. **Revista Saúde & Ciência**, v. 2, n. 1, p. 31-37, 2011.

SIMÕES, C. M. O, et.al. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 5ª Edição, Porto Alegre: editora da UFSC, 2003, p.476.

SOUZA, V. S. B. et al. Análise do Efeito Antioxidante do Extrato Aquoso do Noni (*Morinda citrifolia* L.). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFNR, 9, 2013, Rio Grande do Norte. *Anais...* Rio Grande do Norte: Editora do Instituto Federal do Rio Grande do Norte, 2007, p. 525-532.

USHA, R. et al. Antimicrobial Activity of a Rarely Known Species, *Morinda citrifolia* L. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 14, p. 306-311, mar. 2010.

WANG, M. Y. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica: APS**, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, dec. 2002.

WOODCOCK, D. M. et al. Reversal of multidrug resistance by surfactants. **British Journal of Cancer**, v. 66, n. 1, p. 62-68, jun. 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 Nov;12(5):366-70. Disponível em: < http://www.eteavare.com.br/arquivos/81_392.pdf > Acesso em: 25 de nov. 2014.

ANEXO A



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC**

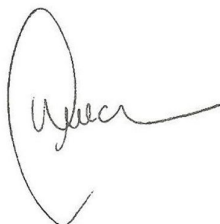
CERTIFICADO

PROTOCOLO Nº21/14

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA analisou o projeto “Avaliação antitumoral e toxicológica do extrato obtido dos frutos da morinda citrifolia em camundongos expostos ao tumor de ehrlich”, sob a responsabilidade da pesquisadora Prof.^a MS. Marcia Clélia Leite Marcelino e o considerou **APROVADO** com a seguinte recomendação:

- 1- Eutanásia por exsanguinação só pode ser realizada após anestesia geral do animal (CONCEA, 2013)

Bauru, 12 de Agosto de 2014.



Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA - USC



Francine Souza
Secretária CEUA - USC