



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA/ANTIGENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Morinda citrifolia*

Débora Kuck Mausolff Papke¹
Jaqueline Nascimento Picada²

Resumo

Morinda citrifolia que pertence à família Rubiaceae, é uma planta originária das ilhas do Pacífico, Sudeste Asiático, a mesma sendo conhecida popularmente como o noni. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades genotóxicas/antigenotóxicas e mutagênicas do extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* (noni) *in vivo*. Para a avaliação genotóxica/antigenotóxica utilizou-se o teste cometa na versão alcalina em tecidos sanguíneo, cerebral, renal e hepático. Para a avaliação da mutagênicidade utilizou-se o teste de micronúcleos em medula óssea. Os resultados obtidos pelo teste cometa demonstraram que não houve danos recentes ao DNA após dose única do extrato etanólico dos frutos de noni e após doses repetidas no sangue periférico. No tecido renal os resultados também não indicaram efeitos genotóxicos. Para as células de fígado foi observado aumento de índice e frequência de danos ao DNA, sugerindo efeito genotóxico. Houve aumento no índice de dano para as células de tecido cerebral, demonstrando que o extrato etanólico dos frutos de noni foi genotóxico para este tecido também. Por outro lado, o extrato produziu efeitos antigenotóxicos em sangue periférico, que foi coletado 24 h após três dias de tratamento. Não houve aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea dos grupos tratados com o extrato de noni, indicando que o extrato não apresentou atividade mutagênica. Através deste estudo é possível concluir que o extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* pode aumentar danos ao DNA em tecidos específicos, apesar de não apresentar efeito mutagênico.

Palavras chave: *Morinda citrifolia*, genotoxicidade, antigenotoxicidade, mutagênicidade.

INTRODUÇÃO

Morinda citrifolia que pertence à família Rubiaceae, é uma planta originária das ilhas do Pacífico, Sudeste Asiático e outras áreas tropicais e subtropicais, utilizada pelos polinésios na medicina popular a mais de 2000 anos (LI et al., 2008), a mesma sendo conhecida popularmente como o noni (MUTO et al., 2010).

Essa planta é um arbusto que pode medir de 3 a 10 metros de altura. As folhas são grandes e perenes, elípticas e verde-escuras e suas flores são pequenas e brancas (MCCLATCHEY, 2002). Noni também é conhecida, por outros nomes vulgares, como: Ba Ji Tian, Nonu, IndianMulberry, Canarywood e Cheesefruit (COSTA, 2011).

Os frutos são verdes, ovais, contém muitas sementes e podem pesar até 800 gramas e podem mudar rapidamente para um amarelo claro e em seguida, ao branco translúcido (SOUSA et al., 2009). O aroma da fruta varia, com algumas variedades sendo praticamente inodoras, porém as mais comuns crescem vigorosas e que têm um cheiro forte de ácido butírico quando maduras (MCCLATCHEY, 2002).

1 Ex-aluna do curso Farmácia – Bolsista PROBIC/Fapergs – debora.papke@ymail.com

2 Professor do PPGBIOSAÚDE – jnpicada@gmail.com

Praticamente todas as partes da planta de noni são utilizadas e para cada uma delas a medicina popular atribui propriedades medicinais diferentes (SOUSA et al., 2009). O fruto de *M. citrifolia* é a parte da planta de mais ampla utilização, usado para preparar um suco medicinal comercializado em mercados públicos e feiras, especialmente no nordeste do Brasil, sendo popularmente consumido para tratar doenças como diabetes, hipertensão e câncer (RYBAK, RUZIK, 2013). São atribuídos ao suco da fruta ações antibactericida, analgésica, anticongestiva, antioxidante, expectorante, anti-inflamatória, adstringente, emoliente, laxativa, hipotensora, imunoestimulante e tônica, também pode ser atribuída ao fruto à ação anticancerígena (BUI, BACIC, PETTOLINO, 2006; SOUSA et al., 2009). O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades genotóxicas/antigenotóxicas e mutagênicas do extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* (noni) *in vivo*.

METODOLOGIA

Utilizou-se 35 camundongos machos, oriundos do Biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Canoas. Os animais foram mantidos a 22°C ±3, com ciclo claro 12h escuro 12h, durante todo o período experimental, os animais pesavam em torno de 38,8 ± 1,53. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), ULBRA, Canoas, sob o protocolo número 2013-22P.

O tratamento dos animais realizou-se em uma sala de procedimentos do biotério da Ulbra. Os animais foram divididos em cinco grupos constituídos de seis a oito camundongos por grupo. Os animais dos grupos tratados receberam por via oral (gavagem) doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg do extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* por três dias consecutivos. O grupo controle negativo recebeu solução salina (NaCl 0,9%). O grupo controle positivo recebeu ciclofosfamida (50 mg/kg, dose única, intraperitoneal (i. p.) 24 h antes da eutanásia. As doses foram ajustadas conforme o peso de cada animal, sendo de 0,1 mL/ 10g de peso corporal.

Coletaram-se amostras de sangue periférico nos tempos zero, 6 h, 24 h após a primeira gavagem, e no final do período experimental completando 72 h. Os animais foram eutanasiados por decapitação. Além de sangue, foram coletadas amostras de tecidos cerebral, hepático e renal para o teste cometa e medula óssea dos fêmures para o teste de micronúcleos. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos tipo Eppendorf contendo 15 µL de heparina (12.000 U.I.) e os tecidos foram colocados em Eppendorf contendo 500 µL de solução salina tamponada pH 7,4 (PBS) a 4°C para obtenção de suspensão celular (DA SILVA et al., 2000).

Utilizou-se a versão alcalina do teste cometa, descrito em TICE *et al.* (2000). Alíquotas de 10 µL das amostras foram misturados com uma fina camada de agarose “low melting” 0,75% (95 µl) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por no mínimo 1 hora até no máximo 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. Para avaliação da atividade antigenotóxica utilizou-se peróxido de hidrogênio (0,25mM) em tratamento *ex vivo*: as lâminas de sangue periférico 6, 24 e 72 horas, foram mergulhadas por 5 min na solução de peróxido de hidrogênio, antes de serem mergulhadas em solução de lise. A lise celular permitiu a migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos às células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de danos (de 0 –

4), para a expressão do dano geral sofrido por uma população de células (50 células por lâmina em duplicata). A FD será calculada baseada no número de células com cauda versus aquelas sem cauda. Os resultados foram submetidos à análise da variância de uma via (ANOVA) e complementados com o teste de Dunnett. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No tecido cerebral, houve aumento significativo do ID na dose de 1000mg/kg quando comparado com o controle negativo, mas para a FD não houve diferença significativa. Um estudo realizado por Pandey e colaboradores (2012) fornece evidências de que o tratamento agudo com o extrato metanólico de *Morinda citrifolia* nas doses (1, 3, 5, 10 g / kg) atenuou o comportamento estereotipado induzido por apomorfina e metanfetamina em ratos albinos Wistar.

Já para o tecido renal, não foi possível observar nenhum aumento significativo tanto para ID e FD, para os grupos tratados com o extrato etanólico dos frutos de noni em relação ao grupo controle negativo, indicando que o extrato não causou dano ao DNA do tecido renal.

Os dados obtidos para o tecido hepático indicaram aumento significativo do ID em todas as doses e aumento significativo da FD na dose de 1000 mg/kg, quando comparados com o controle negativo, indicando atividade genotóxica (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Westendorf et al. (2007), que estudaram o efeito genotóxico do suco de noni, utilizando células do fígado de rato *in vitro* ou células de hepatócitos primário de ratos, utilizando as doses de 0,001 à 0,3 % do extrato de acetato de etila dos frutos, sendo que a dose que apresentou a genotoxicidade foi a dose de 0,2%. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os do estudo realizado por Westendorf et al. (2007), apesar das diferenças técnicas entre os estudos.

Tabela 1. Avaliação da atividade genotóxica pelo teste cometa em tecidos cerebral, hepático e renal de camundongos tratados com salina ou extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* (500, 1000, 2000 mg/Kg).

Tempo de Exposição	Grupo	ID Média ± DP	FD Média ± DP
Cérebro	Salina	78,4 ± 22,3	44,1 ± 16,3
	500 mg/kg	105,5 ± 16,9	40,0 ± 9,0
	1000 mg/kg	118,1 ± 21,1*	53,5 ± 13,4
	2000 mg/kg	67,2 ± 39,0	32,1 ± 16,9
Fígado	Salina	171,6 ± 15,4	81,6 ± 5,6
	500 mg/kg	207,4 ± 11,6***	87,1 ± 4,7
	1000 mg/kg	202,1 ± 18,3**	88,5 ± 4,4
	2000 mg/kg	195,1 ± 18,7*	84,0 ± 6,0
Rim	Salina	291,4 ± 32,0	88,2 ± 12,6
	500 mg/kg	261,1 ± 34,0	92,1 ± 7,6
	1000 mg/kg	281,2 ± 37,3	92,4 ± 6,0
	2000 mg/Kg	291,3 ± 33,8	94,6 ± 3,9

No tempo de 72 horas, correspondente ao sangue periférico coletado após as administrações das doses do extrato por três dias consecutivos, foi observada diminuição significativa de ID em todas as doses testadas e de FD apenas na dose de 1000 mg/kg do

EEFN, quando comparados ao grupo salina + H₂O₂, indicando proteção antigenotóxica do EEFN.

Os mecanismos pelos quais o suco de noni exerce a sua atividade antigenotóxica não são muito claros. Uma atividade antioxidante foi medida *in vitro* utilizando o ensaio de nitro azul tetrazolium (TNB), através da avaliação da capacidade potencial do suco para proteger as células da lipoperoxidação induzida por ânion radical superóxido (SAR), (FRANCH et al., 2013). A atividade sequestradora de SAR pelo suco de noni foi 2,8 vezes maior do que a da vitamina C, e 1,4 vezes mais elevada do que a de picnogenol (Wang; Su, 2001). No presente estudo, podemos observar que o suco de noni proporciona proteção contra danos oxidativos ao DNA após doses repetidas sendo assim antigenotóxico.

Tabela 2. Avaliação da atividade antigenotóxica pelo teste cometa em sangue periférico de camundongos tratados com salina ou extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* (500, 1000, 2000 mg/Kg).

Tempo de Exposição	Grupo	ID Média ± DP	FD Média ± DP
6 h	Salina S/ H ₂ O ₂	54,7 ± 14,4	43,3 ± 7,6
	Salina + H ₂ O ₂	217,5 ± 27,8	84,1 ± 7,1
	500 mg/kg + H ₂ O ₂	234,2 ± 27,8	84,7 ± 4,2
	1000 mg/kg + H ₂ O ₂	241,3 ± 32,7	86,6 ± 5,3
	2000 mg/kg + H ₂ O ₂	211,7 ± 29,9	82,2 ± 4,2
24 h	Salina S/ H ₂ O ₂	44,6 ± 9,7	35,6 ± 9,3
	Salina + H ₂ O ₂	239,0 ± 21,4	90,3 ± 5,0
	500 mg/kg + H ₂ O ₂	248,4 ± 10,6	92,1 ± 3,8
	1000 mg/kg + H ₂ O ₂	249,0 ± 57,9	90,8 ± 4,7
	2000 mg/kg + H ₂ O ₂	242,0 ± 42,1	91,0 ± 2,1
72 h	Salina S/ H ₂ O ₂	54,3 ± 26,3	45,8 ± 13,9
	3 x Salina + H ₂ O ₂	255,8 ± 32,0	93,1 ± 5,0
	3 x 500 mg/kg + H ₂ O ₂	224,2 ± 56,9**	88,0 ± 9,4*
	3 x 1000 mg/kg + H ₂ O ₂	204,5 ± 7,5**	84,8 ± 13,9
	3 x 2000 mg/kg + H ₂ O ₂	205,0 ± 36,3***	86,1 ± 6,4*

No presente estudo a relação de EPC e ENC observada na tabela 6 foi semelhante em todos os grupos testados, indicando que não houve toxicidade aparente na medula óssea dos animais, exceto para o controle positivo. Em relação a EPCMN, também não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com noni e o controle negativo (Tabela 6). Somente no grupo controle positivo (ciclofosfamida) foi observado aumento significativo na frequência de MN quando comparado com o controle negativo (Tabela 6). Resultados semelhantes foram obtidos por Edwards (2002) que utilizou cerca de 10 g/ Kg do suco do noni desidratado via gavagem em ratos. Após o período do experimento, foi retirada a medula óssea dos fêmures e examinada em microscópio óptico, no qual se avaliou a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Os resultados não evidenciaram um aumento da frequência de eritrócitos micronucleados, não caracterizando, portanto uma ação clastogênica, nem evidência tóxica no grupo tratado com o suco do noni, corroborando o presente estudo.

Tabela 3. Atividade mutagênica em medula óssea de camundongos tratados com salina ou extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* (500 , 1000, 2000 mg/kg), por 3 dias consecutivos e eutanasiados após 72 horas da primeira administração.

Grupo	EPC/ENC^a Média ± DP	EPC MN^b Média ± DP
3 x Salina	0,8 ± 0,12	4,8 ± 2,4
3 x 500 mg/kg	0,9 ± 0,10	3,0 ± 1,7
3 x 1000 mg/kg	0,9 ± 0,08	4,2 ± 2,8
3 x 2000 mg/kg	0,8 ± 0,22	4,5 ± 3,8
Ciclofosfamida	0,2 ± 0,05***	24,0 ± 1,5***

CONCLUSÕES

- O extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia* não apresentou atividade genotóxica em sangue periférico e tecido renal em camundongos.
- O extrato de noni aumentou danos ao DNA do tecido cerebral na dose de 1000 mg/kg.
- No tecido hepático o extrato foi genotóxico não aumentou em todas as doses o índice de dano.
- O extrato mostrou um efeito protetor contra danos oxidativos em sangue periférico através do teste cometa *ex vivo* sugerindo uma atividade antígenotóxica.
- O extrato não apresentou atividade mutagênica, pela análise da mutagênicidade utilizando o teste de micronúcleos em medula óssea.

Através deste estudo é possível concluir que o EEFN pode aumentar danos ao DNA em tecidos específicos, apesar de não apresentar efeito mutagênico. Testes adicionais deveriam ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos na indução dos efeitos genotóxico/antígenotóxico observados.

REFERÊNCIAS

- BUI, A. K. T.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1271–1275, 2006.
- COSTA, A. B. **Atividade antioxidante in vitro e antifúngica do noni (*Morinda citrifolia* L.)**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí. Piauí, 2011.
- EDWARDS, C. N. Tahitian Noni Juice - Mouse Micronucleus Test. Scantox Biologisk Laboratorium, Lille Skensved, Denmark (Lab n° 47053). ELKINS, R. Noni (*Morinda citrifolia*) la hierba preciada del pacífico sur. Pleasant Grove: Woodland. 1997. (2002).
- FRANCH, L. P. et al. Antimutagenic and antirecombinagenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 585-594, 2013.
- LI, J. Fermented Noni Exudate (fNE): A mediator between immune system and anti-tumor activity. **ONCOLOGY REPORTS**, v. 20, p. 1505-1509, 2008.
- SOUSA, J. A.de. et al. **Noni *Morinda citrifolia* L.** 1ª Edição. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE, 2009.

MCCLATCHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **INTEGRATIVE CANCER THERAPIES**, v. 1, n. 2, p. 110-120, 2002.

MUTO, J., et al. *Morinda citrifolia* fruit reduces stress-induced impairment of cognitive function accompanied by vasculature improvement in mice. **Physiology & Behavior**, v.101, p. 211–217, 2010.

PANDY, V., et al. Effect of Noni (*Morinda citrifolia* Linn.) Fruit and its bioactive principles scopoletin and rutin on rat vas deferens contractility: An *ex vivo* study. **The Scientific World Journal**, p. 1 – 11, 2014.

RYBAK, J.; RUZIK, L. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of cobalt, copper, manganese and molybdenum in *Morinda citrifolia*. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 19– 25, 2013.

WESTENDORF, J. et al. Toxicological and Analytical Investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 529-537, 2007.