



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LORENA ALMEIDA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO FRUTO DE *Morinda citrifolia* Linn (NONI)**

FORTALEZA

2014

LORENA ALMEIDA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO FRUTO DE *Morinda citrifolia* Linn (NONI)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa

**FORTALEZA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

O48c Oliveira, Lorena Almeida.
Caracterização estrutural e atividade antitumoral de polissacarídeo extraído do fruto de *Morinda citrifolia* Linn (Noni) / Lorena Almeida Oliveira. – 2014.
84 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

1. Noni (Planta). 2. Biopolímeros. 3. Agentes antineoplásicos. I. Título.

CDD 540

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Lorena Almeida Oliveira
Lorena Almeida Oliveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 25/08/2014.

EXAMINADORES:

Judith P. de A. Feitosa
Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Regina Célia M. Paula
Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Universidade Federal do Ceará – UFC

Ana Lúcia Ponte Freitas
Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Universidade Federal do Ceará – UFC

“Que teu coração deposite toda a sua confiança no Senhor! Não te firmes em tua própria sabedoria! Sejam quais forem os teus caminhos, pensa Nele, e Ele aplinará tuas sendas” Provérbios 3:5-6

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, em primeiro lugar, por ter me dado força, saúde e inspiração para produzir este trabalho.

Aos meus pais, Luís Ferreira e Deusamar Nunes, que com amor, dedicação e estímulo me impulsionaram a seguir em frente, sempre. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Kelen Almeida e Rosilda Sousa, que sempre acreditaram no meu potencial.

Ao meu noivo e melhor amigo, Igor Emerson, que sempre está ao meu lado, me apoiando e me aconselhando em todos os momentos difíceis. TE AMO!

À minha orientadora, Profa. Dra. Judith Feitosa, por sua fundamental colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Lívia Falcão e aos seus pais por me fornecerem os frutos de noni utilizados neste estudo.

À Profa. Dra. Regina Célia, pelas oportunas sugestões e contribuições para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lúcia, pela disponibilidade em participar da minha banca examinadora e pelas contribuições oferecidas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, em especial, à Profa. Pablyana L. Cunha, à Profa. Jeanny S. Maciel.

Ao professor Diego Wilke e a toda equipe do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará pelo auxílio na realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e de atividade antitumoral *in vivo*.

À Tereza Lima, à Elis Christina, à Célia Regina, ao Orlando Soares e aos demais funcionários do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica.

Aos meus companheiros do Laboratório de Polímeros (Labpol) por todo o conhecimento compartilhado e por me proporcionarem um ambiente de alegria e de amizade, Natália (Natpol), Rodrigo (Bem), Rayane, Venícios (B), Ana Rosa, Rubens, Nádia, Aliny, Marcos Vinícius, Maslândia, Eliseu, Emerson, Paulo e, em especial, à Clara Myrla.

Aos meus grandes amigos, Adalberto, Rafael, Julyana, Flávia, Rachel, Renata e Vanessa.

Ao CENAUREMN pelo uso dos equipamentos indispensáveis a realização deste trabalho.

Aos órgãos financiadores dos projetos de pesquisa do Labpol, FUNCAP, CAPES e CNPq.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O câncer tem se configurado como um grande problema de saúde pública mundial. Como alternativa terapêutica, muitos produtos naturais têm sido avaliados para seleção de compostos ativos com menos efeitos indesejáveis e capazes de reduzir tumores malignos de modo mais eficiente. *Morinda citrifolia*, conhecida popularmente como noni, é uma espécie nativa do sudeste asiático e da Austrália que tem sido utilizada popularmente para diversos fins terapêuticos e nutricionais. O polissacarídeo extraído da polpa do fruto de *Morinda citrifolia* Linn (Noni-ppt 1) foi purificado por reprecipitação em álcool etílico, originando as subfrações: Noni-ppt 3 e Noni-ppt 5. O objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do Noni-ppt, bem como realizar sua caracterização físico-química utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de infravermelho (FT-IR), cromatografia de permeação em gel (GPC), análise termogravimétrica (TGA), análise elementar de nitrogênio e ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN). A atividade citotóxica *in vitro* das três frações de Noni-ppt (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi avaliada sobre três linhagens de células tumorais (HCT-116; SF-295 e OVCAR-8) por meio do método colorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). O efeito antitumoral *in vivo* do Noni-ppt 3 foi analisado em camundongos com tumor Sarcoma 180 nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia por via oral. As análises físico-químicas demonstraram que o Noni-ppt é composto por 12,1-13,7% de proteínas, 44,2-58,8% de ácidos urônicos e 65,4-71,3% de carboidratos totais. A análise da composição monossacarídica demonstrou que o Noni-ppt é um heteropolissacarídeo constituído, predominantemente, por ramnose, arabinose, galactose e ácido galacturônico. Os resultados da avaliação da atividade antitumoral *in vitro* demonstraram que as amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5 não apresentam nenhuma atividade citotóxica direta sobre as células tumorais na concentração testada. Além disso, não foi observada qualquer inibição do tumor nos camundongos inoculados com as células tumorais.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia* Linn, fruto, polissacarídeo, caracterização, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Currently, cancer is a global public health problem. As an alternative therapy, many natural products have been evaluated for selection of active and with less undesirable effects capable of reducing malignant tumors more efficiently compounds. *Morinda citrifolia*, commonly known as noni, is a species native to Southeast Asia and Australia that has been popularly used for many therapeutic and nutritional purposes. The polysaccharide extracted from the pulp of *Morinda citrifolia* Linn fruits (Noni-ppt 1) was purified by reprecipitation in ethanol, yielding the subfractions: Noni-ppt 3 and Noni-ppt 5. The objective of this study was to investigate the antitumor activity *in vitro* and *in vivo* of Noni-ppt and carry out their physico-chemical characterization by high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), fourier transform infrared spectrometry (FTIR), gel permeation chromatography (GPC), thermal gravimetric analysis (TGA), elemental analysis and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR). The *in vitro* cytotoxic activity of the three fractions of Noni-ppt (50 µg/mL) was evaluated on three tumor cell lines (HCT-116, SF-295 and OVCAR-8) by colorimetric method bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The *in vivo* antitumor effect of Noni-ppt 3 was analyzed in mice with tumor Sarcoma 180 at doses of 25 and 50 mg/kg/day orally. The physico-chemical analyzes showed that Noni-ppt consists of protein (12.1-13.7%), uronic acids (44.2-58.8%) and of total carbohydrates (65.4-71.3%). The monosaccharide composition analysis showed that Noni-ppt is a heteropolysaccharide composed predominantly of rhamnose, arabinose, galactose and galacturonic acid. The Noni-ppt samples showed no direct cytotoxic activity against tumor cells *in vitro*. Moreover, the treatment with Noni-ppt 3 did not show any inhibition of tumor growth in mice inoculated with Sarcoma 180 cells.

Keywords: *Morinda citrifolia* Linn, fruit, polysaccharide, characterization, antitumor activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Características (cor e textura) dos diferentes estádios de maturação do fruto de <i>Morinda citrifolia</i> Linn.....	19
Figura 1	Diferentes estágios de maturação do fruto.....	19
Figura 2	Fruto maduro de <i>Morinda citrifolia</i>	19
Figura 3	Folhas de <i>Morinda citrifolia</i> Linn.....	20
Figura 4	Flores de <i>Morinda citrifolia</i> Linn.....	20
Figura 5	Mecanismo de ciclização da D-glicose.....	32
Figura 6	Mecanismo de hidrólise ácida de glicosídeos. (1) protonação do oxigênio glicosídico; (2) formação do íon cíclico carbono-oxônio (<i>half-chair</i>); (3) formação do açúcar redutor protonado; (4) liberação do próton, gerando o açúcar redutor.....	35
Figura 7	Mecanismo de separação na cromatografia de permeação em gel.....	36
Figura 8	Processamento do fruto na centrífuga Mondial Juicer.....	39
Figura 9	Procedimento de extração aquosa do Noni-ppt 1.....	40
Figura 10	Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazan.....	44
Figura 11	Animal de manutenção com a forma ascítica do Sarcoma 180.....	47
Figura 12	Animal com tumor sólido Sarcoma 180.....	48
Figura 13	Animal em tratamento por via oral.....	48
Figura 14	Aspecto macroscópico do Noni-ppt 1.....	50
Figura 15	Cromatograma de GPC para o Noni-ppt com detector de índice de refração.....	51
Figura 16	Curva de titulação potenciométrica do Noni-ppt 5 com NaOH 0,09097 mol/L e sua respectiva derivada.....	52
Figura 17	Espectros na região do infravermelho do Noni-ppt 1 e do Noni-ppt 1 acidificado.....	54
Figura 18	Espectros na região do infravermelho do Noni-ppt 1, 3 e 5.....	55
Figura 19	Espectros na região do infravermelho do Noni-ppt 1, 3 e 5 acidificado.	56
Figura 20	Curvas termogravimétricas e DTGs das amostras de Noni-ppt a 10°C/min em ar sintético.....	57

Figura 21	Cromatogramas do Noni-ppt 5.....	59
Figura 22	Cromatograma de CLAE do Noni-ppt 1 (A- outro, B- ácido glucurônico, C- ácido galacturônico, D-galactose, E- ramnose, F- arabinose).....	60
Figura 23	Cromatograma de CLAE do Noni-ppt 3 (A e G- outros, C- ácido galacturônico, D- galactose e E- ramnose, F- arabinose).....	60
Figura 24	Cromatograma de CLAE do Noni-ppt 5 (A e G- outros, B- ácido glucurônico, C- ácido galacturônico, D- galactose, E- ramnose, F- arabinose).....	60
Figura 25	Espectro de RMN de ^{13}C da fração Noni-ppt. Deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. Calibração interna com D_2O	62
Figura 26	Peso do tumor Sarcoma 180 transplantado em camundongos fêmeas Swiss.....	66
Figura 27	Peso relativo dos órgãos dos camundongos (<i>Mus musculus</i> Swiss) transplantados com Sarcoma 180.....	66
Figura 28	Peso do tumor Sarcoma 180 transplantado em camundongos fêmeas swiss.....	67
Figura 29	Peso relativo dos órgãos dos camundongos (<i>Mus musculus</i> Swiss) transplantados com Sarcoma 180.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fármacos anticâncer derivados de produtos naturais.....	16
Tabela 2	Estimativa da composição do fruto maduro de <i>Morinda citrifolia</i>	49
Tabela 3	Rendimento do Noni-ppt 1, 3 e 5 obtido a partir do purê de <i>Morinda citrifolia</i>	50
Tabela 4	Teor de proteína do Noni-ppt 1, 3 e 5.....	51
Tabela 5	Teor de ácido urônico do Noni-ppt 1, 3 e 5.....	53
Tabela 6	Atribuições das bandas no infravermelho do Noni-ppt 1 e do Noni-ppt 1 acidificado.....	54
Tabela 7	Dados obtidos a partir das curvas termogravimétricas e dos gráficos de DTG das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.....	58
Tabela 8	Teor de umidade determinado por análise gravimétrica.....	58
Tabela 9	Valores de Rf dos padrões de monossacarídeos em n-butanol/piridina/HCl 0,1 mol/L (10:3:3).....	59
Tabela 10	Tempo de retenção (Tr) dos padrões de monossacarídeos e dos componentes do Noni-ppt 1, 3 e 5.....	61
Tabela 11	Composição monossacarídica das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.....	62
Tabela 12	Principais parâmetros avaliados para o Noni-ppt 1, 3 e 5.....	63
Tabela 13	Viabilidade celular (%) das linhagens tumorais humanas HCT-116, SF-295 e OVCAR-8 tratadas com Noni-ppt 1, 3 e 5 na concentração de 50 µg/mL.....	64
Tabela 14	Efeito do Noni-ppt 3 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia i.p. sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.....	67
Tabela 15	Efeito do Noni-ppt 3 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia v.o. sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ara	Arabinose
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COX	Ciclooxygenase
EPM	Erro Padrão Médio
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformador de Fourier
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
CG	Cromatografia Gasosa
Glc	Glicose
GlcA	Ácido glicurônico
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
IC50	Concentração letal média
INF- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IT	Inibição do crescimento tumoral
Man	Manose
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Rha	Ramnose
Rib	Ribose
SAR	Superoxide Anion Radical
SD	Sprague-Dawley
Tr	Tempo de retenção
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TNJ Tahitian Noni Juice®
Xyl Xilose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Câncer.....	15
1.2	Plantas medicinais.....	17
1.3	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.....	18
1.3.1	Caracterização botânica.....	20
1.3.2	Principais formas de processamento do fruto de <i>Morinda citrifolia</i>.....	21
1.3.2.1	Despolpamento.....	21
1.3.2.2	Suco fermentado.....	21
1.3.2.3	Suco não fermentado.....	22
1.3.3	Situação regulamentar de <i>M. citrifolia</i>.....	22
1.3.4	Constituição química.....	23
1.3.5	Propriedades biológicas.....	24
1.3.5.1	Atividade antioxidante.....	25
1.3.5.2	Atividade anti-inflamatória.....	26
1.3.5.3	Atividade analgésica.....	27
1.3.5.4	Atividade antibacteriana.....	27
1.3.5.5	Atividade antiulcerosa.....	28
1.3.5.6	Atividade hipoglicêmica.....	29
1.3.5.7	Atividade antitumoral e imunomodulatória.....	29
1.4	Carboidratos.....	31
1.4.1	Polissacarídeos.....	32
1.4.1.1	Polissacarídeos como modificadores da resposta biológica.....	33
1.5	Fundamentação das técnicas de caracterização e de elucidação estrutural de polissacarídeos.....	35
1.5.1	Determinação da composição monossacarídica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	35
1.5.2	Cromatografia de Permeação em Gel.....	36
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo Geral.....	37
2.2	Objetivos Específicos.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38

3.1	Materiais utilizados.....	38
3.1.1	Reagentes.....	38
3.1.2	Equipamentos.....	38
3.2	Metodologia.....	38
3.2.1	Obtenção e limpeza dos frutos.....	38
3.2.2	Extração e purificação do Noni-ppt.....	38
3.2.3	Caracterização dos materiais.....	40
3.2.3.1	Determinação do perfil de distribuição da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	40
3.2.3.2	Determinação do teor de proteínas através de análise elementar.....	41
3.2.3.3	Dosagem de ácidos urônicos.....	41
3.2.3.4	Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	42
3.2.3.5	Análise termogravimétrica (TGA).....	42
3.2.3.6	Determinação do teor de umidade por análise gravimétrica.....	42
3.2.3.7	Determinação da composição monossacarídica.....	43
3.2.3.7.1	Hidrólise ácida total.....	43
3.2.3.7.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	43
3.2.3.7.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	43
3.2.3.8	Caracterização estrutural por ressonância magnética nuclear de ¹³ C.....	44
3.2.4	Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	44
3.2.4.1	Princípio do teste.....	44
3.2.4.2	Linhagens tumorais.....	45
3.2.4.3	Cultivo das células.....	45
3.2.4.4	Procedimento experimental.....	45
3.2.5	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	46
3.2.5.1	Obtenção e manutenção dos animais.....	47
3.2.5.2	Procedimento experimental.....	47
3.2.5.3	Analise dos dados.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	Extração e purificação do polissacarídeo de <i>Morinda citrifolia</i> Linn.....	49
4.2	Determinação do perfil de distribuição da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	50
4.3	Determinação do teor de proteínas através de análise elementar.....	51

4.4	Dosagem de ácidos urônicos.....	52
4.5	Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	53
4.6	Analise termogravimétrica (TGA).....	57
4.7	Determinação do teor de umidade.....	58
4.8	Determinação da composição monossacarídica.....	58
4.8.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	58
4.8.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	59
4.9	Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C.....	62
4.10	Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	63
4.11	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	65
5	CONCLUSÃO.....	72
6	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer compreende um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão e de destruição dos tecidos adjacentes, bem como de crescimento em sítios diferentes daquele do tumor primário (metastização) (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O aparecimento dessas células resulta de uma série de alterações genéticas envolvendo a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais e de genes que atuam no reparo do DNA (DANTAS *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, o câncer tem se configurado um evidente problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de oito milhões de óbitos a cada ano. O aumento da expectativa de vida da população, bem como a evolução dos métodos diagnósticos são fatores relacionados ao crescimento da taxa de incidência dessas neoplasias malignas ao longo dos últimos anos (BRASIL, 2014).

No Brasil, estima-se que ocorrerão 576 mil novos casos de câncer no ano de 2015, sendo os mais incidentes os cânceres de pele não melanoma, de próstata, de pulmão, de cólon, de reto e de estômago para o sexo masculino, e os cânceres de pele não melanoma, de mama, de colo do útero, de cólon, de reto, de pulmão e de glândula tireóide para o sexo feminino. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2030, irão ocorrer cerca de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com a doença (BRASIL, 2013).

A terapêutica do câncer baseia-se, de modo geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores com a quimioterapia e o tratamento radioterápico. Na década de 1970, estas formas clássicas de abordagem sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamento adjuvante. O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos, incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres (KUMMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004). Infelizmente, muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos e, portanto, torna-se imperativo encontrar, desenvolver e introduzir no arsenal médico modalidades terapêuticas mais eficientes, que possam oferecer ao número crescente de pacientes oportunidades reais de controle locorregional e à distância das células neoplásicas.

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. A maior parte dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (BAILLY, 2009). A Tabela 1 contém os principais fármacos utilizados atualmente na quimioterapia do câncer, suas fontes de obtenção e seus alvos moleculares.

Tabela 1 - Fármacos anticâncer derivados de produtos naturais.

Fármaco	Fonte	Alvos
Vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®)	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos
Paclitaxel (Taxol®) e docetaxel (Taxotere®)	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos
Podofilotoxina (Wartec®), etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®)	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II
Camptotecina, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®)	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I
Ixabepilona (Ixempra®)	<i>Sorangium cellulosum</i>	Microtúbulos
Trabectedina (Yondelis®)	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	DNA
Tensirolimus (Torisel®)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Proteína quinase mTOR

Fonte: BAILLY, 2009; LOTUFO *et al.*, 2010.

Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado. Como a monoterapia apresenta apenas resposta parcial em 15 a 20% dos casos e mesmo com as associações terapêuticas não ultrapassa 40 a 50%, é necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas (COSTA, 2010). A maior parte dos agentes utilizados na quimioterapia atua inibindo a síntese de DNA ou os mecanismos de replicação celular, mas acaba por apresentar melhor atividade “antiproliferativa” do que “antineoplásica”. Sendo assim, a seletividade entre células normais e tumorais torna-se modesta e os efeitos colaterais acentuados (GARRETT; WORKMAN, 1999). A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou

insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores (COSTA, 2010).

1.2 Plantas medicinais

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de uma grande variedade de plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Os primeiros registros sobre o uso de plantas medicinais datam de aproximadamente 3000 a.C., quando o imperador chinês Sheng-Nung utilizou uma série de plantas em seu próprio corpo, a fim de descobrir os efeitos que provocavam, escrevendo assim um tratado denominado PEN TSAO (“A Grande Fitoterapia”) (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Em 1803, o isolamento da morfina da *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Satürner marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas medicinais. A partir de então, outras substâncias foram isoladas, como a quinina e a quinidina obtidas da *Cynchona* spp em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna* em 1831, que passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A produção de fármacos via síntese química e o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas foram acompanhados pela ausência de comprovações científicas da eficácia das substâncias de origem vegetal. Além disso, as dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais utilizados contribuíram para que os medicamentos de origem vegetal, de uso quase exclusivo até a década de 1950, fossem gradativamente substituídos nas farmácias por medicamentos contendo as substâncias ativas deles extraídas ou os seus derivados sintéticos (RATES, 2001). Entretanto, a partir da década de 1980, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais permitiram maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Dessa maneira, nos últimos 34 anos, a pesquisa científica com produtos naturais, principalmente com plantas, voltou a progredir notavelmente em vários países da América Latina, como Brasil, México, Argentina e Chile (CALIXTO, 2005).

As plantas medicinais desempenham um papel fundamental na medicina moderna, tanto por fornecerem fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por fornecerem compostos que podem ser ligeiramente modificados para se tornarem mais eficazes ou menos tóxicos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Mesmo com o desenvolvimento de grandes laboratórios farmacêuticos e de fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Na África, por exemplo, 80% da população depende do uso destes medicamentos, os quais representam alternativa frente ao alto custo dos fármacos sintéticos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional para os seus cuidados básicos de saúde e, desse total, 85% utilizam plantas medicinais ou preparações obtidas a partir destas (BRASIL, 2006). O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos foi de US\$ 60 bilhões em 2002 (WHO, 2002). Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano (ASCHWANDEN, 2001).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002).

1.3 *Morinda citrifolia* Linn

Morinda citrifolia, conhecida popularmente como noni, é uma espécie nativa do sudeste asiático e da Austrália. A planta cresce em uma grande variedade de solos e sobrevive em habitats severos, como em terrenos rochosos, arenosos e vulcânicos. É considerada tolerante à salinidade, adaptando-se bem em áreas inundadas pelo mar (SCOT, 2006). Em condições favoráveis, a planta começa a produzir seus primeiros frutos com aproximadamente um ano de cultivo e continua a produzi-los de modo constante, sendo possível observar em

uma mesma planta a ocorrência simultânea de frutos em diferentes estágios de maturação (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

Os estágios de maturação do fruto encontram-se descritos no Quadro 1. Dependendo da técnica de pós-colheita adotada, os frutos podem ser colhidos nos mais diversos estágios de desenvolvimento e continuarem amadurecendo. De acordo com McKoy, Thomas e Simon (2002), a mudança da cor verde para amarela esbranquiçada ocorre quando o fruto encontra-se completamente maduro (Figura 2), estando pronto para consumo quando a casca estiver cerosa e semitranslúcida. Os frutos ficam com a textura macia muito rapidamente, passando do estágio 4 para o 5 em poucas horas. Neste estágio, a polpa torna-se quase liquefeita e adquire um odor característico (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

Quadro 1 - Características (cor e textura) dos diferentes estágios de maturação do fruto de *Morinda citrifolia*.

Estágio de maturidade	Cor	Textura
1	Verde	Muito firme
2	Verde amarelado	Muito firme
3	Amarelo pálido	Muito firme
4	Amarelo pálido	Firme
5	Acinzentado/ Translúcido	Macio

Fonte: CHAN-BLANCO *et al.*, 2006.

Figura 1 – Fruto em diferentes estágios de maturação.



Fonte: o autor.

Figura 2 – Fruto maduro de *Morinda citrifolia*.



Fonte: o autor.

1.3.1 Caracterização botânica

A classificação botânica de *Morinda citrifolia* L. segundo Müller (2007) encontra-se descrita abaixo:

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem Gentianales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: Morinda
- Espécie: *Morinda citrifolia*
- Nome científico: *Morinda citrifolia* Linn

Quando adulta, a árvore de *Morinda citrifolia* pode atingir até 10 metros de altura (SCOT, 2006). Os galhos jovens possuem ranhuras (estrias) e são angulares. As folhas são elípticas, opostas e com margens onduladas, possuindo coloração verde brilhante na face superior e opaca na inferior (Figura 2). A inflorescência é composta por pequenas flores de corola branca, as quais possuem de quatro a seis estames (Figura 3). As sementes, mais de 100 em frutos grandes, são triangulares a alongadas, marrons, e medem entre 3 e 10 mm de comprimento (WANG *et al.*, 2002; McCLATHEY, 2002; VEIGA *et al.*, 2005). Os frutos são ovóides e possuem uma superfície grumosa coberta de secções com formato poligonal (WANG *et al.*, 2002; SCOT, 2003).

Figura 3 – Folhas de *Morinda citrifolia* Linn.



Fonte: o autor.

Figura 4 – Flores de *Morinda citrifolia* Linn.



Fonte: o autor.

1.3.2 Principais formas de processamento do fruto de *Morinda citrifolia*

O processamento de alimentos tem a função primordial de atuar como uma operação de conservação, reduzindo ou evitando alterações indesejáveis (PEREDA *et al.*, 2005 *apud* BARROS, 2009). As frutas de noni não se danificam facilmente e não requerem nenhum recipiente especial para o transporte e nem refrigeração após a colheita. Anteriormente ao processamento, as frutas devem ser lavadas antes que amadureçam completamente e tornem-se frágeis.

1.3.2.1 Despolpamento

É a operação realizada a fim de separar da polpa o material fibroso, as sementes e a casca. A eficiência do despolpamento depende do diâmetro dos orifícios da peneira utilizada, quanto menor o diâmetro, mais refinada e homogênea será a polpa obtida (MAIA; SOUSA; LIMA, 2007). Sabe-se que os ingredientes ativos no noni encontram-se principalmente no suco e na polpa, e não nas sementes e nas cascas (RAM, 2003).

O suco de noni pode ser produzido por uma grande variedade de métodos, alguns destes serão brevemente discutidos a seguir.

1.3.2.2 Suco fermentado

No sudeste da Ásia, o suco fermentado de *Morinda citrifolia* L. é bastante popular. O suco pode ser consumido puro ou em combinação com outros sucos de frutas a fim de melhorar a sua palatabilidade (CORREIA, 2010). Para sua obtenção, as frutas maduras são lavadas e despolpadas ou armazenadas inteiras. Com o passar do tempo, o suco é separado naturalmente da polpa da fruta. O tempo mínimo de fermentação para a obtenção do produto é de 60 dias. Transcorrido esse período, o suco é filtrado e engarrafado em recipientes de vidro ou de plástico, podendo ser armazenado à temperatura ambiente sem pasteurização (SCOT, 2006).

Devido à fermentação, os açúcares contidos no suco do noni são convertidos em ácidos orgânicos, ocasionando a redução do pH para aproximadamente 3,5 - 4,0. Alguns dos ácidos orgânicos produzidos podem ter algum valor a ser descoberto em pesquisas futuras (RAM, 2003; SCOT, 2006).

1.3.2.3 Suco não fermentado

Alguns produtores e consumidores do suco de noni preferem um produto de sabor mais adocicado e de cor mais clara. Se o suco não for fermentado no recipiente de recolha, este se manterá relativamente doce, ao invés de adquirir um gosto azedo associado ao suco fermentado. Para a produção do suco, os frutos de *Morinda citrifolia* são armazenados à temperatura ambiente até atingirem o nível ideal de maturação. Posteriormente, os frutos maduros são prensados, sendo o produto engarrafado diretamente em recipientes de plástico ou de vidro e submetido à pasteurização e/ou à refrigeração para preservar sua integridade (RAM, 2003; SCOT, 2003).

1.3.2 Situação regulamentar da *Morinda citrifolia*

Morinda citrifolia é uma planta utilizada popularmente para diversos fins terapêuticos e nutricionais (WANG *et al.*, 2002). Seus efeitos medicinais tornaram-se amplamente difundidos no mundo a partir de 1996 quando o suco processado foi patenteado como Tahitian Noni Juice® (TNJ) pela empresa norte-americana Tahitian Noni International, atual Morinda Bioactives (MORINDA BIOACTIVES, 2012). Esta atua em 72 países, tendo sua sede localizada em Provo, nos Estados Unidos. A multinacional é líder em produtos de *Morinda citrifolia*, com 95% do mercado. A companhia iniciou suas atividades no Brasil em novembro de 2003 e, em menos de um ano de atuação, o mercado brasileiro tornou-se líder na América Latina, com vendas mensais próximas a 1 milhão de dólares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE VENDAS DIRETAS, 2005).

O suco de *Morinda citrifolia* é um produto sem histórico de consumo pela população brasileira e, portanto, enquadrado na definição de “novo alimento” estabelecida pela Resolução nº 16/1999. Para que o produto possa ser comercializado no Brasil, é necessário que as empresas interessadas apresentem documentação científica comprovando sua segurança e solicitem seu registro junto à Anvisa (BRASIL, 2007).

Os produtos com finalidade ou indicação medicamentosa não são considerados alimentos conforme determina o artigo 56 do Decreto-Lei nº 986/1969 e o item 3.1 “f” da Resolução RDC nº 259/2002. Por esta razão, a Anvisa determinou, por meio das Resoluções – RE nº 7/2004, nº 9/2004 e nº 148/2004, a suspensão de propagandas do suco Tahitian Noni® com alegações de propriedades terapêuticas e/ou medicinais que estavam sendo veiculadas em diversos meios de comunicação, inclusive na internet.

Apesar da extensa literatura científica sobre a espécie *Morinda citrifolia*, especialmente em relação aos seus possíveis efeitos farmacológicos e usos terapêuticos, a quantidade de estudos que avaliaram sua segurança é bastante limitada (WEST *et al.*, 2006). Por essa razão, em 29 de maio de 2007, a Anvisa publicou o informe técnico nº 25, com esclarecimentos sobre a comercialização de produtos contendo *Morinda citrifolia* (noni) no Brasil. Neste documento, a Anvisa adverte que tais produtos não devem ser comercializados como alimento até que os requisitos legais que exigem a comprovação da segurança de seu uso sejam atendidos. Assim, em maio de 2009, a Tahitian Noni International do Brasil foi obrigada a suspender suas atividades no país, uma vez que não apresentou documentação científica suficiente para demonstrar a segurança do uso de seus produtos (COMERCIALIZAÇÃO DO SUCO DO NONI ESTÁ PROIBIDA NO BRASIL, 2009).

Após avaliar os aspectos de segurança do Tahitian Noni Juice®, o Comitê Científico para Alimentação da União Europeia chegou à conclusão de que não existem indícios de efeitos adversos nos estudos realizados em cobaias animais que foram submetidas a testes de genotoxicidade, de alergenicidade e de toxicidade sub-aguda e subcrônica. Dessa forma, o Comitê aprovou a introdução do suco Tahitian Noni® no mercado europeu (COMISSÃO EUROPEIA, 2002). Em 2010, a Tahitian Noni® também obteve permissão para comercializar o purê e o concentrado dos frutos de *Morinda citrifolia* como novos ingredientes alimentares, em conformidade com os critérios estabelecidos no Regulamento (CE) nº 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho (EUROPEAN COMMISSION, 2010).

O governo dos Estados Unidos considera o noni seguro para consumo, incluindo-o na lista GRAS (Generally Recognized As Safe) e o FDA (Food & Drug Administration) permitiu que o mesmo fosse vendido como um suplemento dietético (SCOT; CRAIG, 2006).

1.3.3 Constituição química

Nas últimas décadas, muitos autores têm realizado estudos sobre os constituintes químicos das diversas partes de *Morinda citrifolia* Linn. Aproximadamente 200 compostos já foram isolados e identificados na planta, incluindo substâncias fenólicas, iridóides, lignanas, polissacarídeos, entre outros (PAWLUS; KINGHORN, 2007). Dos compostos fenólicos presentes, a grande maioria corresponde à antraquinonas e aos seus glicosídeos (damnacantol, alizarina, soranjidiol, rubiadina). Estudos sugerem que as antraquinonas estão presentes principalmente nas raízes (DENG *et al.*, 2007a) e no caule (SRIVASTAVA; SINGH, 1993). No entanto, há relatos de traços de antraquinonas nas flores (TIWARI; SINGH, 1977), frutos

(LIN *et al.*, 2007; KAMIYA *et al.*, 2005), e folhas de *Morinda citrifolia* (TAKASHIMA *et al.*, 2007). Segundo Deng *et al.* (2011), os iridóides majoritários são os ácidos deacetilasperulosídico e asperulosídico.

Até o momento, 96 compostos voláteis já foram identificados no fruto maduro de *Morinda citrifolia*, incluindo ácidos carboxílicos, álcoois (3-metil-3-buten-1-ol), ésteres (metil butanoato), cetonas (2-hexanona, 2-heptanona), aldeídos (furfural, benzaldeído), terpenos (D-limoneno, terpineol, linalol), lactonas [(E)-6-dodeceno- γ -lactona, (Z)-6-dodeceno- γ -lactona] e compostos organosulfurados (dimetil dissulfeto, S-metil tioacetato). Cerca de 83% dos constituintes voláteis do fruto correspondem a ácidos orgânicos, destacando-se o ácido hexanóico (19%) e o ácido octanóico (58%) (FARINE *et al.*, 1996; PINO *et al.*, 2010; WEI *et al.*, 2011).

O fruto apresenta aproximadamente 90% de água e um elevado teor de proteínas, representando 25,6% da matéria seca do suco. Os minerais correspondem a 8,8% da matéria seca, sendo os principais o potássio, o cálcio, o sódio, o magnésio e o fósforo. Traços de selênio e de molibdênio também têm sido descritos no suco de *M. citrifolia* (CHUNHIENG, 2005; BASAR; WESTENDORF, 2012). As principais vitaminas encontradas no fruto são a vitamina C, variando de 51,2 – 385,2 mg/100g de matéria seca (CANUTO *et al.*, 2010; SHOVIC; WHISTHER, 2001; SILVA *et al.*, 2012; NASCIMENTO, 2012), e a vitamina A (DIXON *et al.*, 1999).

Segundo Bui, Bacic e Pettolino (2006), a fração insolúvel em etanol (Noni-ppt) do suco produzido a partir do noni cultivado no Vietnã é composta principalmente por carboidratos (67% p/p), sendo os ácidos urônicos seu componente majoritário. De acordo com os autores, a fração polissacarídica é constituída predominantemente por ácido galacturônico (53,6%), arabinose (13,6%), galactose (17,9 %) e ramnose (9,5%). A análise das ligações glicosídicas sugere que a fração polissacarídica contém principalmente polissacarídeos pecticos, homogalacturonana (4-GalpA), ramnogalacturonana do tipo I (4-GalpA, 2-Rhap, 2,4-Rhap), arabinana (5-Araf, 3,5-Araf, t-Araf), arabinogalactana do tipo I (4-Galp, 3,4-Galp, t-Araf) e arabinogalactano do tipo II (3,6-Galp, t-Araf). Baixos níveis de xiloglucana (4-GlcP, 4,6-GlcP, t-XylP, t-FucP), heteroxilana (4-XylP) e heteromanana (4-ManP) também estão presentes.

1.3.4 Propriedades biológicas da *Morinda citrifolia*

Todas as partes da planta, incluindo a casca, o tronco, as raízes, as folhas e, especialmente, a fruta, têm sido utilizadas na medicina popular há mais de 2000 anos (WANG *et al.*, 2002). Estudos científicos recentes têm revelado e confirmado muitas das atividades biológicas do noni já descritas pelos povos polinésios, como: ação antioxidantante (CHEN *et al.*, 2009; DUSSOSSOY *et al.*, 2011), anti-inflamatória (DUSSOSSOY *et al.*, 2011), analgésica (BASAR *et al.*, 2010), imunomoduladora (WANG *et al.*, 2002), antibacteriana (USHA; SASHIDHARAN; PALANISWAMY, 2010; RIVERA *et al.*, 2011), antitumoral (FURUZAWA *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2013), antiulcerosa (MAHATTANADUL *et al.*, 2011), hipoglicêmica (NAYAK *et al.*, 2011), entre outras.

1.3.4.1 Atividade antioxidantante

Wang e Su (2001) avaliaram a atividade antioxidantante do TNJ® *in vitro*, comparando-a com os efeitos do ácido ascórbico, do pó de sementes de uva e do extrato da casca de pinheiro (picnogenol). A capacidade de combater radicais ânions superóxido (SAR) do suco de noni mostrou ser 2,8 vezes maior do que a da vitamina C; 1,4 vezes maior do que a do picnogenol e 1,1 vezes maior do que aquela do pó de semente de uva. Desse modo, segundo os autores, o suco de noni mostrou possuir um grande potencial para combater radicais livres de oxigênio.

Wang *et al.* (2001) investigaram posteriormente a atividade antioxidantante do TNJ® *in vivo* utilizando um modelo experimental de lesão hepática crônica induzida pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratas fêmeas. Os animais tratados com água contendo 10% de suco de *Morinda citrifolia* L. apresentaram marcadores sorológicos de função hepática (AST, ALT) bastante semelhantes aos do grupo controle, bem como não tiveram qualquer alteração histológica no fígado.

Zin, Abdul-Hamid e Osman (2002) investigaram a atividade antioxidantante de extratos das raízes, das folhas e dos frutos de *M. citrifolia*. Os resultados evidenciaram que os extratos em acetato de etila das três partes da planta possuem alta atividade antioxidantante, comparáveis à do α-tocoferol e à do BHT (butilhidroxitolueno). Tanto o extrato metanolico como o extrato em acetato de etila das raízes apresentaram maior ação antioxidantante do que o das folhas e dos frutos.

Su *et al.* (2005) isolaram 19 compostos do fruto de *M. citrifolia* e todos foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante. Um dos compostos analisados exibiu potente atividade antioxidante, a neolignana americanin A.

Chen *et al.* (2009) investigaram as propriedades antioxidantes do extrato bruto das folhas, dos caules verdes e marrons, e do fruto de *Morinda citrifolia* obtido por extração com CO₂ supercrítico. Os extratos dos caules marrons apresentaram o maior conteúdo fenólico total ($23,14 \pm 1,83$ mg/g), o maior poder redutor e a maior capacidade antioxidante.

Dussossoy *et al.* (2011) e Nascimento (2012) também demonstraram que o fruto de *Morinda citrifolia* L. apresenta propriedades antioxidantes, provavelmente, associadas à presença de compostos fenólicos, de iridóides e de ácido ascórbico.

1.3.4.2 Atividade anti-inflamatória

A seletividade de inibição da ciclooxygenase-2 (COX-2) do suco de noni foi investigada *in vitro* por Su *et al.* (2001) e sua atividade foi comparada à de alguns tradicionais anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), como a aspirina, a indometacina e o celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2. Os resultados mostraram que a seletividade para a inibição da COX-2 do suco de noni é comparável à do celecoxibe.

McKOY *et al.* (2002) mostraram que o extrato aquoso do fruto de *Morinda citrifolia* possui atividade antiedemogênica quando administrado por via oral, utilizando o modelo de edema de pata induzido por dois agentes pró-inflamatórios, carragenina e bradicinina.

Li *et al.* (2003) investigaram *in vitro* a atividade anti-inflamatória de 24 espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional australiana e chinesa, e observaram que o pó do fruto de *M. citrifolia* possui elevada atividade inibitória da COX-1.

A atividade anti-inflamatória de compostos isolados a partir do fruto de *Morinda citrifolia* foi avaliada frente a diferentes enzimas chave envolvidas na inflamação, incluindo COX-2, 5-lipoxigenase (5-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO). Oito compostos foram capazes de inibir a atividade enzimática da 5-LO e/ou da 15-LO, com concentração inibitória 50% (IC50) variando entre 0,43 e 16,5 µmol/L. A quer cetina, um flavonóide isolado do fruto, apresentou efeito inibitório contra COX-2, com IC50 de 28,6 µmol/L (DENG *et al.*, 2007b).

Dussossoy *et al.* (2011) estudaram *in vitro* e *in vivo* a atividade anti-inflamatória do suco de *Morinda citrifolia*. Os experimentos demonstraram que o suco tem capacidade de

reduzir o edema de pata induzido por carragenina em ratos e de inibir *in vitro* a atividade das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e a produção de óxido nítrico e prostaglandina E₂ (PGE₂).

1.3.4.3 Atividade analgésica

Younos *et al.* (1990) avaliaram as propriedades analgésicas do extrato aquoso lyophilizado das raízes de *M. citrifolia* em camundongos, o qual mostrou uma considerável atividade analgésica central dose-dependente. O efeito analgésico foi confirmado pela administração de naloxone, um antagonista específico dos receptores opioides.

Wang *et al.* (2002) investigaram *in vivo* as propriedades analgésicas do TNJ® por meio do método “twisted”. Este se baseia na administração intraperitoneal de tartarato de antimônio e potássio, o qual provoca contorções abdominais nos camundongos devido à dor causada. O número de contorções, dentro dos primeiros 15 minutos após a administração, foi registrado a fim de avaliar o efeito analgésico do TNJ®. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: controle, 5%, 10% e 20% TNJ®. O suco de *Morinda citrifolia* foi adicionado à água dos camundongos durante 10 dias consecutivos. Esta investigação revelou um significativo efeito analgésico dose dependente.

As propriedades analgésicas do suco de noni também foram investigadas utilizando fêmeas da linhagem SD. O TNJ® foi adicionado na água de beber durante sete dias utilizando quatro grupos de ratas: controle, 20% placebo, 10% TNJ® e 20% TNJ®. No último dia foi realizado um ensaio de aquecimento da plataforma (55°C) a fim de avaliar o comportamento dos animais frente ao calor. Este experimento mostrou que o TNJ® foi capaz de produzir atividade analgésica dose dependente (WANG *et al.*, 2002).

1.3.5.4 Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana de *Morinda citrifolia* provavelmente tenha sido sua primeira propriedade biológica observada. Seus frutos podem ser armazenados em recipientes fechados à temperatura ambiente sem que haja a fermentação da quantidade relativamente elevada de açúcares que os compõem (RETHINAM; SIVARAMAN, 2007).

Saludes *et al.* (2002) descreveram que a fração em hexano do extrato de noni foi capaz de inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* em 89-95%, demonstrando assim a sua pronunciada atividade antituberculosa.

Usha, Sashidharan e Palaniswamy (2010) investigaram *in vitro* a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes extratos da folha de *Morinda citrifolia*. Os extratos avaliados foram capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Candida albicans* e de *Aspergillus niger*. Os resultados mostraram que com o aumento da concentração dos extratos há um aumento da inibição do crescimento microbiano.

Rivera *et al.* (2011) avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana do suco de noni frente a diferentes espécies de micoplasma: *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma penetrans* e *Mycoplasma fermentans*. O suco apresentou a capacidade de inibir o crescimento de todas as espécies testadas.

2.3.5.5 Atividade antiulcerosa

O extrato aquoso do fruto de *Morinda citrifolia* foi capaz de reduzir o desenvolvimento de lesões gástricas induzidas por etanol 80% em ratos, de suprimir o surgimento de lesões gástricas crônicas induzidas por serotonina, bem como de acelerar a cicatrização de úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético em ratos, com eficácia semelhante à de outros agentes antiulcerosos (ranitidina e lansoprazol). O extrato inibiu significativamente a secreção de ácido gástrico e a atividade da pepsina (MAHATTANADUL *et al.*, 2011).

2.3.5.6 Atividade hipoglicêmica

Diabetes mellitus é um grupo de desordens metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica, e decorrente de defeitos na produção de insulina e/ou incapacidade desta exercer adequadamente sua ação (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

Horsfall *et al.* (2008) investigaram *in vivo* a atividade hipoglicêmica do suco de *Morinda citrifolia* e observaram um sinergismo quando este é administrado em combinação com insulina.

A administração do suco fermentado de noni foi capaz de reduzir significativamente os níveis de glicose sanguíneos de ratos e de promover a perda de massa corpórea dos mesmos, comprovando o efeito hipoglicêmico do fruto (NAYAK *et al.*, 2011).

1.3.4.7 Atividade antitumoral e imunomodulatória

Desde a década de 1990, diversos pesquisadores tem investigado por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* o potencial anticâncer de *Morinda citrifolia* e de compostos isolados desta espécie (BROWN, 2012).

Em 1994, Hirazumi *et al.* estudaram o efeito antitumoral de uma fração rica em polissacarídeos extraída do fruto de *M. citrifolia* (Noni-ppt) frente a um modelo de carcinoma pulmonar de Lewis em camundongos. Os resultados do experimento mostraram que o Noni-ppt foi capaz de ocasionar um aumento significativo no tempo de vida dos animais.

Hirazumi e Furusawa (1999) investigaram a atividade imunomodulatória do Noni-ppt no mesmo modelo de carcinoma pulmonar. A administração terapêutica do Noni-ppt promoveu a ativação de células do exudato peritoneal e o aumento do tempo de sobrevivência dos camundongos. O Noni-ppt também foi capaz de estimular a liberação de diversos mediadores por células efetoras, incluindo fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interferon gama (IFN- γ), óxido nítrico (NO), entre outros.

O potencial profilático e terapêutico contra Sarcoma 180 foi investigado por Furuzawa *et al.* (2003) utilizando polissacarídeos extraídos do fruto de *M. citrifolia* (Noni-ppt) cultivado no Hawaii em um modelo experimental de tumor adaptado a forma ascítica. Os resultados mostraram que a atividade antitumoral do Noni-ppt produziu a cura de 25 a 45% dos camundongos alogênicos e que esta atividade foi completamente abolida através da administração concomitante de inibidores específicos de macrófagos (2-cloroadenosina), de células T (ciclosporina) ou de células natural killer (anticorpo anti-asialo GM1). O Noni-ppt apresentou sinergismo quando combinado com uma ampla variedade de drogas antineoplásicas, incluindo cisplatina, etoposídeo, 5-fluorouracil, vincristina e mitomicina C.

O glicosídeo 6-O-(β -D-glucopyranosyl)-1-O-octanoyl- β -D-glucopyranose e o ácido asperulosídico (designados NB10 e NB11, respectivamente) obtidos a partir da fração n-butanólica do suco de *Morinda citrifolia* demonstraram inibir AP-1, um eucariótico fator envolvido na proliferação celular, no metabolismo celular e na presença de metástases (LIU *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000).

Wang e Su (2001) investigaram o efeito preventivo do TNJ[®] no estágio inicial da carcinogênese. Os resultados sugeriram que a prevenção da formação de adutos de DNA-carcinogênicos e a atividade antioxidante do TNJ[®] podem contribuir para o efeito quimiopreventivo.

Wang *et al.* (2002) demonstraram que animais tratados com o TNJ® têm uma melhora da função imune com concomitante hiperplasia do timo.

Hornick *et al.* (2003) utilizaram como modelos de angiogênese veias da placenta e transplante de tumor mamário humano para testar a atividade antiangiogênica do suco de *Morinda citrifolia*. Os resultados mostraram que o suco na concentração de 5% (v/v) foi efetivo em inibir a iniciação do crescimento de novos vasos da placenta e em reduzir a taxa de crescimento e proliferação de novos capilares já em desenvolvimento. Quando utilizaram o suco a 10% (v/v), este foi capaz de induzir a degeneração dos vasos e de produzir apoptose em redes capilares estabelecidas após poucos dias de aplicação. Nesta concentração observou-se também a atividade de inibir a iniciação de crescimento de novos vasos a partir do tumor de mama transplantado.

Em 2005, um ensaio clínico envolvendo 29 pacientes com câncer em estado avançado demonstrou que a administração de cápsulas contendo extrato seco do fruto maduro de *Morinda citrifolia* não foi capaz de ocasionar a regressão dos tumores (ISSELL *et al.*, 2005).

Li *et al.* (2008) demonstraram que a administração intraperitoneal do exudato de noni obtido após 14 dias de fermentação (fNE) aumentou significativamente as porcentagens de granulócitos e, principalmente, de células NK no sangue periférico, no peritônio e no baço dos animais tratados. A administração profilática do fNE preveniu em mais de 85% o aparecimento do Sarcoma 180 em sua forma ascítica em camundongos C57BL/6J, mas não foi capaz de evitar o aparecimento do tumor ascítico em camundongos deficientes de linfócitos funcionais e em camundongos deficientes de células NK. Além disso, os pesquisadores verificaram que o sobrenadante obtido após centrifugação (10.000 rpm; 10 min) e filtração (0,2 µm) do fNE também apresentou atividade antitumoral e que esta permaneceu mesmo após o seu aquecimento.

Taskin *et al.* (2009) investigaram o efeito anticâncer do Alnoni®, suco de noni produzido pela empresa Hanoju Europe Ltd, frente a um modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos fêmeas Balb/c. Após 14 dias de tratamento, pode-se verificar que a administração oral do suco de noni induziu a apoptose das células tumorais, reduzindo significativamente a taxa de proliferação celular.

Zhang *et al.* (2009) demonstraram que células dendríticas tratadas com o fNE promoveram a proliferação *in vitro* de esplenócitos e de células B, sugerindo que constituintes do suco fermentado de noni atuam como um modificadores da resposta biológica.

Ahmad *et al.* (2012) investigaram *in vitro* o efeito quimiopreventivo do suco de noni (NJ) através da mutagenicidade induzida pela aflatoxina B1 em cultura de linfócitos humanos. Os pesquisadores verificaram que o NJ ocasionou uma redução dose-dependente na frequência de trocas entre cromátides irmãs e de aberrações cromossômicas.

Clafshenkel *et al.* (2012) testaram o potencial antitumoral do Tahitian Noni Juice® sobre a carcinogênese mamária em camundongos transgênicos MMTV-neu. O período de latência do tumor, a incidência e a incidência metastática não foram afetadas pelo tratamento com TNJ®. No entanto, o TNJ® mostrou-se útil no tratamento de mulheres com câncer de mama HER2/neu, pois ocasionou uma redução significativa no peso e no volume dos tumores.

Em 2013, Li *et al.* investigaram a atividade antitumoral de duas diferentes frações do fNE frente a um modelo ascítico de Sarcoma 180 em camundongos C57BL/6J. Os resultados dos ensaios *in vivo* mostraram que a administração intraperitoneal da fração n-butanol do fNE foi capaz de prevenir em 100% o aparecimento do tumor e de erradicar 75% dos tumores já existentes, proporcionando uma resposta imune mais forte do que aquela estimulada pelo fNE. Por outro lado, a administração profilática da fração acetato de etila não foi capaz de prevenir o aparecimento do tumor. Quando adicionada à água ingerida pelos animais durante 4 semanas, a fração n-butanol previu em 62,5% o aparecimento do tumor e a fração acetato de etila em 50%, demonstrando que estas frações são ativas por via oral.

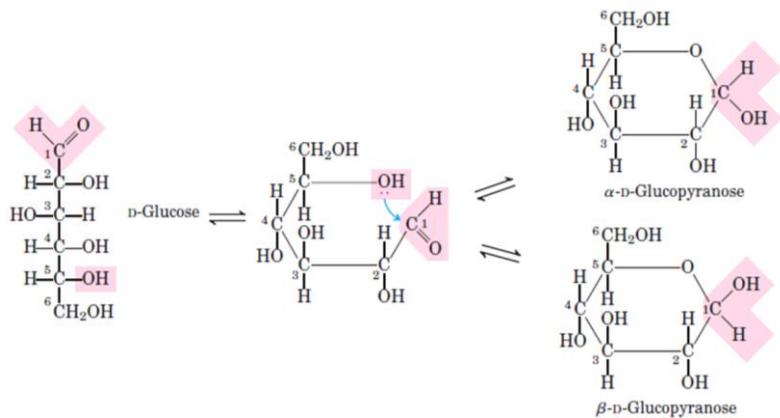
1.4 Carboidratos

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza. Eles apresentam uma grande variedade de funções, as quais incluem o fornecimento de energia, a atuação como uma forma de armazenamento de energia e como elementos estruturais. Os carboidratos são polihidroxialdeídos ou polihidroxicetonas, ou substâncias que liberam esses compostos por hidrólise.

Os carboidratos podem ser classificados, segundo o seu tamanho, em três classes principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos (açúcares simples) são constituídos por uma única unidade de polihidroxialdeído ou polihidroxicetona. O monossacarídeo mais abundante na natureza é a D-glicose, açúcar com seis átomos de carbono em sua estrutura. Os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono na cadeia geralmente ocorrem em soluções aquosas como estruturas cíclicas (em anel) nas quais o grupo carbonila forma uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila da mesma molécula. Nesse processo de ciclização, ocorre à formação dos

estereoisômeros α e β do monossacarídeo (Figura 5). Por sua vez, os oligossacarídeos são formados por cadeias curtas de monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas. Os mais abundantes são os dissacarídeos, com cadeias contendo apenas duas unidades monossacarídicas.

Figura 5 – Mecanismo de ciclização da D-glicose.



Fonte: Adaptado de NELSON; COX, 2006.

1.4.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo o grupo de compostos mais abundante e importante da biosfera. Esses polímeros são constituídos por vinte ou mais unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo-se entre si na identidade das suas unidades, nos tipos de ligações que as une, no comprimento de suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas (NELSON; COX, 2006).

Nos polissacarídeos, as unidades monossacarídicas estão na forma cíclica (furanosílica ou piranosílica), resultantes da reação intramolecular do grupo carbonílico em C-1 (poliidroxialdeído) ou em C-2 (poliidroxicetona) com grupos hidroxílicos em C-4 ou C-5 da estrutura em cadeia aberta, formando um hemiacetal ou hemicetal cíclico.

O processo de formação das longas cadeias poliméricas ocorre através da policondensação das unidades monossacarídicas e a ligação glicosídica é formada após a eliminação de uma molécula de água entre duas moléculas adjacentes (NELSON; COX, 2006). As ligações glicosídicas entre as unidades monoméricas são designadas de acordo com o número dos carbonos que estabelecem a conexão e também em função da posição do grupo

hidroxila no carbono anomérico do glicídeo envolvido na ligação. Se esse grupo hidroxila do carbono anômero estiver na configuração α , a ligação é denominada α . Se o grupo estiver na configuração β , a ligação é chamada de β (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Os polissacarídeos podem ser classificados em homopolissacarídeos, quando resultantes da condensação de um único tipo de monossacarídeo, e em heteropolissacarídeos, quando formados pela condensação de diferentes tipos de monossacarídeos (NELSON; COX, 2006).

1.4.1.1 Polissacarídeos como modificadores da resposta biológica

Modificadores da resposta biológica são substâncias que têm a capacidade de melhorar o sistema imune. Estes podem ser citocinas produzidas de forma endógena por células imunes como também substâncias provenientes de outros organismos. Estes modificadores da resposta biológica exógenos podem ser ácidos nucléicos, lipídeos, proteínas ou polissacarídeos. Dentre eles, os polissacarídeos são os que estão presentes em maior abundância na natureza. Sua origem pode ser uma bactéria, um fungo ou um vegetal. À nível celular, sua fonte pode ser a partir de reservas de polissacarídeos do citoplasma, ou de polissacarídeos estruturais presentes nas membranas ou nas paredes celulares dos organismos. Os métodos de extração e purificação estão diretamente relacionados com a forma como as moléculas desses polímeros encontram-se arranjadas (LEUNG *et al.*, 2006).

A possibilidade de utilizar esses polissacarídeos como agentes antitumorais tem atraído a atenção nas áreas bioquímica e médica. Muitos dos compostos que foram descobertos como agentes citotóxicos contra células cancerígenas também apresentam toxicidade para as células normais do hospedeiro. Atualmente, a descoberta de novas substâncias que sejam realmente efetivas contra tumores malignos tem se tornado uma importante meta das pesquisas biomédicas. O aumento ou potencialização dos mecanismos de defesa do organismo surge como uma possível alternativa para inibir o crescimento tumoral sem prejudicar o hospedeiro (OOI; LIU, 2000).

Nas últimas décadas, polissacarídeos de origem vegetal emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos. Atividade antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, anticoagulante, hipoglicêmica e hipコレsterolemiantem sido relatada para uma grande variedade de polissacarídeos (SIMÕES *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos envolvendo polissacarídeos está ainda em fase pré-clínica, entretanto, alguns polissacarídeos extraídos de fungos já são largamente comercializados no

Japão, dentre eles destacam-se a lentinana, a schizophyllana e o PSK (polissacaropeptídeo Krestin), isolados da *Lentinus edodes* (Shiitake), da *Schizophyllum commune* e da *Coriolus versicolor*, respectivamente. Tanto a lentinana como a schizophyllana são β -D-glucanas puras, ao passo que o PSK é constituído por uma β -D-glucana ligada a peptídeos (YANG *et al.*, 1992; MIZUNO, 1999; ZONG; CAO; WANG, 2012).

A lentinana foi isolada pela primeira vez por Chihara *et al.* (1970), que demonstraram seu elevado potencial antitumoral. Desde então, diversos pesquisadores têm demonstrado que a lentinana é capaz de prolongar a sobrevida de pacientes com câncer, especialmente nos casos de carcinomas colorretal e gástrico (FURUE *et al.*, 1981; TAGUCHI, 1987, INA *et al.*, 2011). Somente na década de 1990, foi descoberto que o mecanismo de ação da lentinana estaria diretamente relacionado ao seu potencial imunoestimulatório. Ela é capaz de elevar os níveis de expressão gênica de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , citocinas que agem em diversos alvos, como células B, células T e monócitos (LIU *et al.*, 1999). Sua biodisponibilidade oral é limitada e, por essa razão, a lentinana tem sido rotineiramente administrada por via intravenosa (KIDD, 2000).

O PSK, assim como a lentinana, também prolonga a sobrevida de pacientes com carcinomas colorretal e gástrico (MITOMI *et al.*, 1989; NAKAZATO, 1994; ITO *et al.*, 2004). O PSK age estimulando a ativação de células T e de células NK, e induzindo a expressão gênica de algumas citocinas, como IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-6 *in vitro* e *in vivo* (KOBAYASHI; MATSUNAGA; FUJII, 1993).

Na China, um polissacarídeo ligado a proteínas (PSP), similar ao PSK, também isolado da espécie *Coriolus versicolor*, apresentou de modo semelhante uma ampla e potente atividade antitumoral, sendo capaz de inibir tumores de Ehrlich, leucemia PS33 e leucemia monocítica (YANG *et al.*, 1992).

Em um estudo randomizado envolvendo 220 pacientes com câncer cervical tratados com radioterapia e/ou schizophyllana, foi verificado que o polissacarídeo ocasionou uma significativa redução dos tumores. Em comparação aos resultados do grupo controle, o tempo de recorrência foi maior para os pacientes com câncer em estágio II tratados com schizophyllana. Além disso, o tempo de sobrevida dos pacientes com câncer cervical em estágio II no grupo tratado com schizophyllana mostrou-se significativamente maior do que no grupo controle (KUNIHIRO *et al.*, 1986). Em 1994, Kimura *et al.* (1994) verificaram que a schizophyllana é capaz de proporcionar um aumento da sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

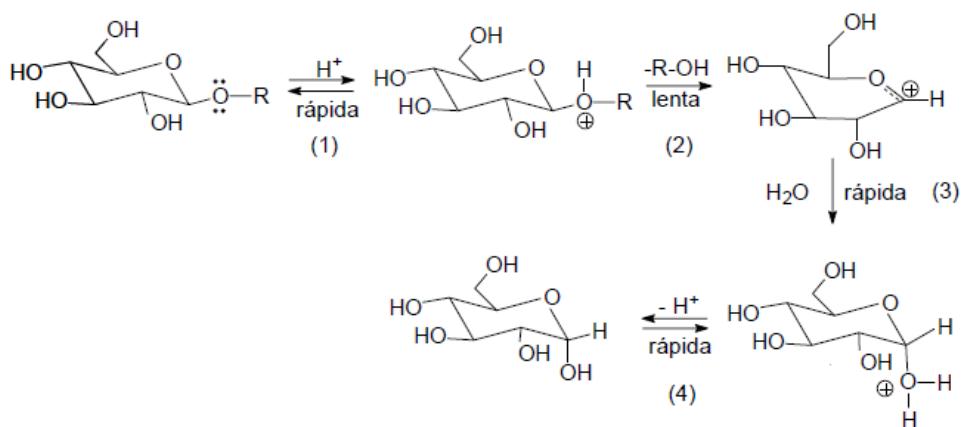
1.5 Fundamentação das técnicas de caracterização e de elucidação estrutural de polissacarídeos

1.5.1 Determinação da composição monossacarídica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para obter informações a respeito da composição monomérica dos polissacarídeos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência, os materiais devem ser primeiramente submetidos à hidrólise ácida, gerando, após a quebra das ligações glicosídicas, os monossacarídeos livres.

De acordo com esse procedimento, o material é submetido a uma hidrólise ácida utilizando ácido trifluoroacético (TFA), o qual é posteriormente removido do meio (BIERMANN e McGINNIS, 1990 *apud* SOUZA, 2009). Seguindo o mecanismo de hidrólise (Figura 6), primeiro ocorre a protonação do átomo de oxigênio glicosídico (1), seguida pela quebra da ligação em O–C em C-1 da unidade monossacarídica (2), originando o íon cíclico de carbono-oxônio, que apresenta uma conformação de meia cadeira (*half-chair*) com C-2, C-1 e C-5 no mesmo plano. A reação do íon oxônio com a água gera o açúcar redutor protonado e, após desprotonação, forma-se o açúcar redutor (EDWARD, 1955; FOSTER; OVEREND, 1955 *apud* SOUZA, 2009).

Figura 6 – Mecanismo de hidrólise ácida de glicosídeos. (1) protonação do oxigênio glicosídico; (2) formação do íon cíclico carbono-oxônio (*half-chair*); (3) formação do açúcar redutor protonado; (4) liberação do próton, gerando o açúcar redutor.



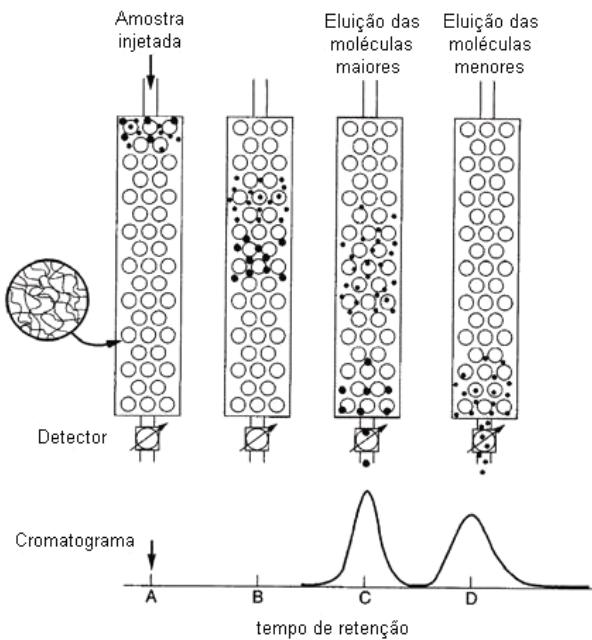
Fonte: EDWARD, 1955; FOSTER; OVEREND, 1955 *apud* SOUZA, 2009.

1.5.2 Cromatografia de Permeação em Gel

A cromatografia de permeação em gel (GPC ou SEC, do inglês Gel permeation chromatography ou Size exclusion chromatography) tornou-se um método convencional para determinação da distribuição de massa molar (M_{WD}) de diversos materiais poliméricos. O conhecimento da massa molar (MM) e da sua distribuição é importante para a aplicação e processabilidade do polímero. A cinética das reações poliméricas, como síntese, transformações químicas e também degradação das macromoléculas, pode ser avaliada eficazmente através de mudanças na MM. Além disso, a MM fornece indiretamente informações sobre a composição química, ramificação da cadeia e comportamento em solução dos polímeros (EREMEEVA, 2003).

O princípio de operação do GPC consiste na separação de diferentes moléculas em solução com base em seu raio (R_h) ou em seu volume hidrodinâmico (V_h), e não em sua massa molar. O processo de separação ocorre em colunas empacotadas com materiais de diferentes porosidades, como géis, polímeros reticulados, partículas de sílica, entre outros (AGILENT TECHNOLOGIES, 2012). O tempo de eluição é maior para moléculas menores, uma vez que estas tendem a passar por um número maior de poros, o que aumenta seu tempo de residência na coluna. A Figura 7 ilustra o mecanismo de separação por exclusão de tamanho nas análises por GPC.

Figura 7 – Mecanismo de separação na cromatografia de permeação em gel.



Fonte: Adaptado de STRIEGEL *et al.*, 2009.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar a caracterização estrutural do polissacarídeo presente no purê do fruto de *Morinda citrifolia* Linn e investigar sua atividade antitumoral.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e purificar o Noni-ppt;
- Realizar a caracterização estrutural e físico-química do Noni-ppt;
- Avaliar a atividade citotóxica do Noni-ppt em cultura de células tumorais por meio do método colorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT);
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do Noni-ppt, administrado por via intraperitoneal e oral, em camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com tumor Sarcoma 180.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Polímeros (Labpol) em parceria com o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE), ambos pertencentes à Universidade Federal do Ceará.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Água destilada, álcool etílico comercial e P.A., ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido trifluoroacético, biftalato de potássio, n-butanol, hidróxido de sódio P.A., orcinol foram utilizados.

3.1.2 Equipamentos de pequeno porte

Balança analítica A&D® HR-200; Bomba à vácuo Tecnal® Te-0581; Centrífuga Sigma® 3-30K; Estufa com circulação de ar Nova ética® 400; Liofilizador da Edwards®, modelo RV12 e Liofilizador da Labconco®, modelo FreeZone 4.5.

3.2 Metodologia

3.2.1 Obtenção e limpeza dos frutos

Os frutos foram colhidos manualmente em uma propriedade localizada em Fortaleza – CE no período de agosto de 2012 a fevereiro de 2013. Posteriormente, foi realizada uma pré-seleção, descartando os frutos danificados e aqueles em fase de senescência avançada. Os frutos foram lavados em água corrente e, em seguida, selecionados com a finalidade de padronizar o seu estágio de maturação.

3.2.2 Extração e purificação do Noni-ppt

A extração foi realizada segundo uma adaptação da metodologia descrita por Hirazumi e Furasawa (1999). Os frutos de *Morinda citrifolia* em estágio 4 de maturação

(Quadro 1, pág. 19) tiveram as cascas removidas manualmente e, posteriormente, foram processados utilizando a centrífuga Mondial Juicer para a obtenção do purê de noni (Figura 8). Em seguida, o purê foi liofilizado para determinação de sua massa seca. Para cada 5 g do purê seco foram adicionadas 100 mL de água destilada e a suspensão foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 1 h. Após esse período, a suspensão foi centrifugada (6000 rpm; 20 min.; 25°C) e o resíduo descartado. O sobrenadante foi filtrado em um funil de placa sinterizada n°4 e liofilizado. Em seguida, o resíduo seco obtido foi dissolvido em 50 mL de água destilada. O polissacarídeo foi precipitado, lentamente e sob agitação moderada, em álcool etílico comercial 96% na proporção de 1:4 (volume de solução de noni/volume de álcool) (BUI; BACIC; PETTOLINO, 2006). Após a precipitação, a suspensão contendo o polissacarídeo foi centrifugada (8000 rpm; 30 min.; 10°C) e o sobrenadante descartado. Finalmente, o precipitado foi dissolvido em água e liofilizado, sendo então denominado de Noni-ppt 1.

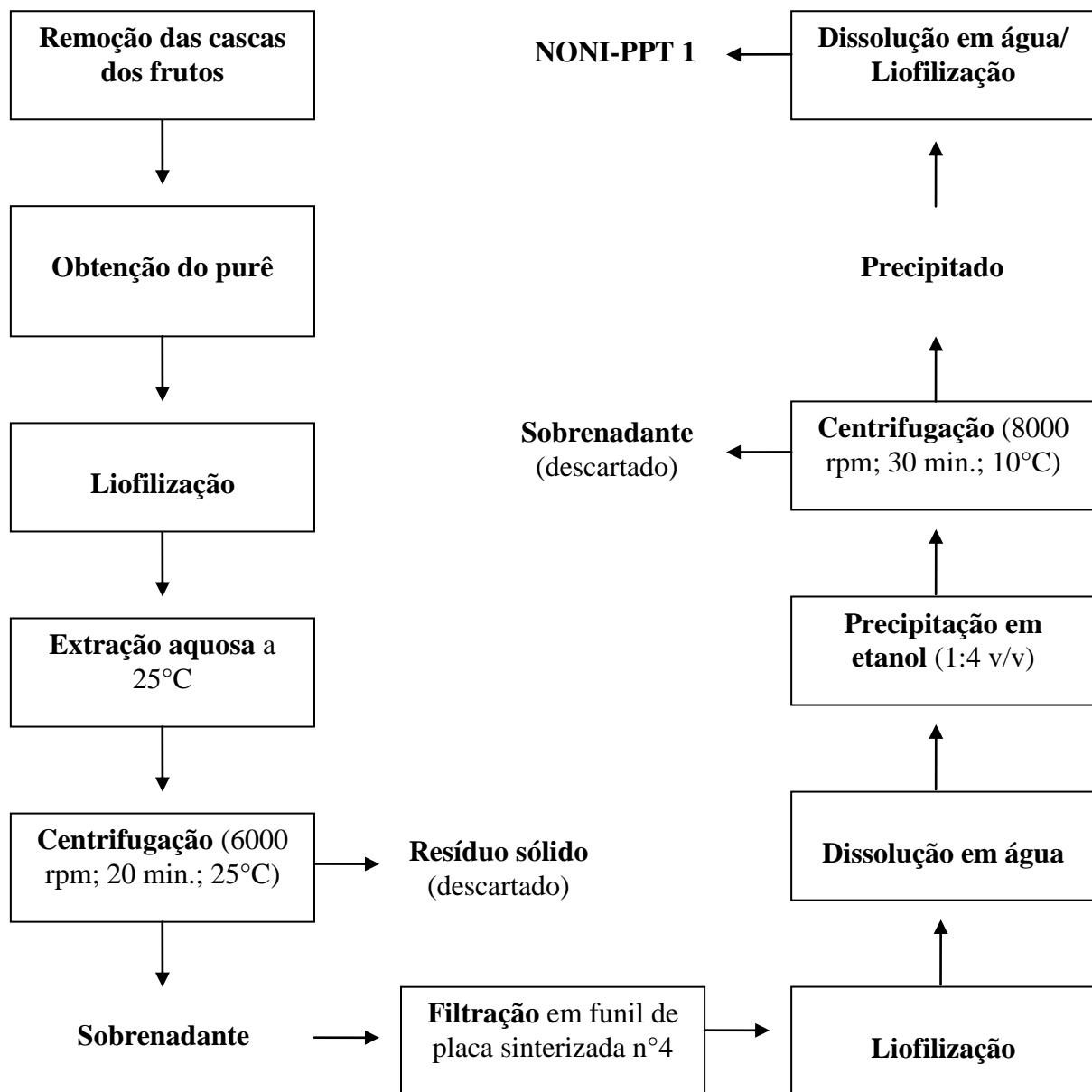
Figura 8 – Processo de obtenção do purê de noni.



Fonte: o autor.

A fim de purificar o Noni-ppt 1 foram realizadas etapas sucessivas de dissolução em água destilada e precipitação em álcool etílico comercial 96% na proporção de 1:4 (volume de solução de noni/volume de álcool). O Noni-ppt 1 após duas etapas de reprecipitação foi denominado de Noni-ppt 3 e após quatro etapas de reprecipitação de Noni-ppt 5.

Figura 9 – Procedimento de extração aquosa do Noni-ppt 1.



3.2.3 Caracterização dos materiais

3.2.3.1 Determinação do perfil de distribuição da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Foram preparadas soluções 0,1% (m/v) do polissacarídeo em água deionizada. Tais soluções foram filtradas com membrana MILIPORE de porosidade 0,45 µm e, em seguida, foi adicionado etilenoglicol como padrão interno.

O perfil de distribuição da massa molar foi determinado através de Cromatografia de Permeação em Gel, utilizando um sistema cromatográfico tipo HPLC da Shimadzu constituído de uma bomba modelo LC-20AD funcionando isocraticamente com os detectores de índice de refração modelo RID-6A e UV-VIS SPD-10AV, ambos da Shimadzu. Foi utilizada uma coluna PolySep-GFC-P Linear de 7,8 x 300 mm, com fase móvel NaNO_3 0,1 mol/L, à 40 °C e fluxo de 1,0 mL/min. O volume injetado das amostras foi de 50 μL .

3.2.3.2 Determinação do teor de proteínas através de análise elementar

O teor de nitrogênio das amostras de Noni-ppt foi obtido em um microanalisador Perkin-Elmer 2400 CHN. A quantidade de proteína foi estimada através do teor de nitrogênio obtido para cada amostra, sendo utilizado um fator de conversão igual a 5,75, usual para proteínas de origem vegetal (BRASIL, 2003).

3.2.3.3 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação de ácidos urônicos das três amostras (Noni-ppt 1, Noni-ppt 3 e Noni-ppt 5) foi realizada por titulação potenciométrica. Inicialmente, 250 mg do Noni-ppt foram dissolvidos em 40 mL de água deionizada sob agitação magnética e, em seguida, a solução foi filtrada através de funil de placa sinterizada nº4. A solução obtida foi percolada três vezes através de uma coluna empacotada com resina de troca catiônica e, posteriormente, liofilizada. Uma massa conhecida da amostra liofilizada (Noni-ppt acidificado) foi titulada com a solução de NaOH 0,09097 mol/L previamente padronizada, sendo este procedimento realizado em triplicata. Para o cálculo do teor de ácido urônico foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\% \text{Ácido urônico (m/m)} = 176,14 \times M \times V \times 100}{m}$$

onde:

- 176,14 corresponde à massa molar do ácido galacturônico (194,14 g), monossacarídeo citado como majoritário por Bui, Bacic e Pettolino (2006), após a subtração da massa molar da água (18 g);

- M representa a concentração em mol/L da solução de hidróxido de sódio;
- V é o volume gasto para atingir o ponto de equivalência, o qual foi determinado a partir da segunda derivada;
- m corresponde a massa de amostra (Noni-ppt).

3.2.3.4 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho do polissacarídeo foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Shimadzu® 8300 em pastilhas de KBr, na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica, a umidade e o percentual de resíduo das amostras foram determinados por ensaios termogravimétricos feitos em equipamento Netzsch STA 449F3, em fluxo de ar sintético de 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min na faixa de 25 a 900 °C. Foi utilizada massa inicial de 7 mg.

3.2.3.6 Determinação do teor de umidade por análise gravimétrica

O teor de umidade das amostras foi quantificado pelo método de secagem em estufa. As amostras de Noni-ppt (0,5 g) foram transferidas para pesa-filtros e submetidas à secagem em estufa a 105 °C até peso constante, sendo este procedimento realizado em duplicata. O teor de umidade foi calculado utilizando a equação:

$$\text{Perda (\%)} = \frac{(Pu - Ps) \times 100}{Pa}$$

onde:

- Pa = peso da amostra (g)
- Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da desidratação (g)
- Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a desidratação (g)

3.2.3.7 Determinação da composição monossacarídica

3.2.3.7.1 Hidrólise ácida total

A fim de obter informações a respeito da composição monossacarídica do biopolímero, as amostras de Noni-ppt foram submetidas à hidrólise ácida, gerando assim monossacarídeos livres após a quebra das ligações glicosídicas.

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos foi realizada utilizando-se cerca de 10 mg da amostra dissolvidos em 2,0 mL de TFA 4 mol.L⁻¹, a 100 °C, por 5 horas. Após a hidrólise, o ácido residual foi eliminado através da adição de metanol e evaporação em banho de areia a 80° (PAULA, 1995).

3.2.3.7.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os produtos da hidrólise foram dissolvidos em 1 mL de água miliQ e, posteriormente, submetidos à cromatografia em cromatoplacas de sílica gel 60 (Merk) eluídas com n-butanol/piridina/HCl 0,1 mol/L (10:3:3) (CHAPLIN; KENNEDY, 1994). As placas foram reveladas com orcinol 0,4% em ácido sulfúrico/álcool (1:19). Os monossacarídeos presentes no Noni-ppt foram identificados através da comparação dos fatores de retenção (R_{fs}) com aqueles obtidos para os padrões de monossacarídeos testados (Rha, Ara, Rib, Xyl, Man, Gal, Glc, GalA e GlcA).

3.2.3.7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas em aparelho SHIMADZU com detector de índice de refração (RID 10A, SHIMADZU), utilizando uma coluna para ácidos orgânicos (REZEX ROA - Organic Acid, 300 x 7,80 mm). O fluxo da fase móvel (H₂SO₄ 8 mmol.L⁻¹) foi de 0,6 mL.min⁻¹. As amostras foram solubilizadas em água deionizada a uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ e filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm. O volume de amostra injetado foi de 50 µL e foram utilizados padrões de monossacarídeos (Rha, Ara, Rib, Xyl, Man, Gal, Glc, GalA e GlcA) para comparação dos tempos de retenção.

3.2.3.8 Caracterização estrutural por ressonância magnética nuclear de ^{13}C

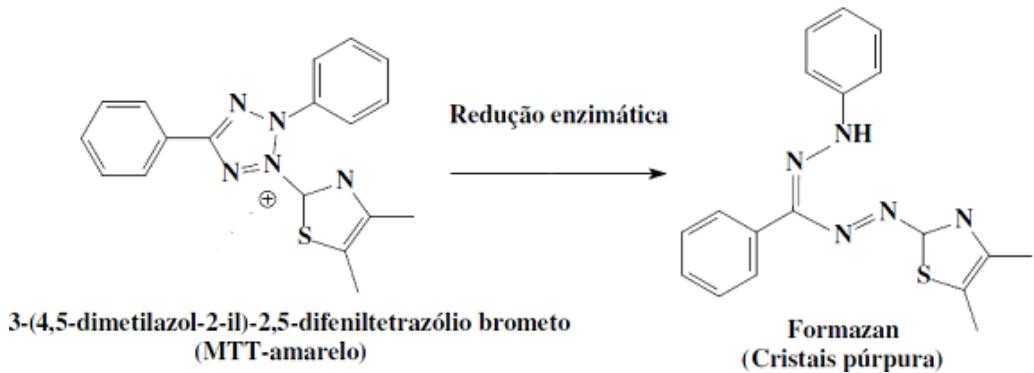
Os polissacarídeos foram caracterizados a partir dos deslocamentos apresentados nos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13. As análises de RMN foram realizadas nas técnicas unidimensionais (RMN ^{13}C desacoplado) utilizando um espectrômetro Bruker modelo Avance DRX-500, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN). Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados a temperatura ambiente, utilizando o D_2O como solvente e DSS como padrão interno.

3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

3.2.4.1 Princípio do teste

Foi utilizado o método colorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) descrito por Mosmann (1983). Esse ensaio consiste em medir a viabilidade celular através da atividade enzimática mitocondrial das células viáveis, visto que o MTT é reduzido a formazan por enzimas pertencentes à cadeia respiratória (Figura 10). Formazan é um composto de coloração púrpura, insolúvel em água e solúvel em DMSO. A quantificação da inibição enzimática é realizada espectrofotometricamente.

Figura 10 – Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazan.



Fonte: MOSMANN, 1983.

3.2.4.2 Linhagens tumorais

No ensaio *in vitro*, foram utilizadas células tumorais das seguintes linhagens: HCT-116 (câncer de cólon), SF-295 (sistema nervoso central) e OVCAR-8 (carcinoma ovariano), cedidas pelo NCI-USA (*National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA*).

3.2.4.3 Cultivo das células

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm², volume de 250 mL); utilizando o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI, Cultilab) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL de penicillina e 100 mg/mL de estreptomicina) sempre manipuladas dentro de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II). O meio RPMI 1640 foi preparado a partir da diluição do conteúdo em pó do sachê em água tridestilada numa temperatura entre 15 e 20 °C sob agitação lenta e constante e suplementado com bicarbonato de sódio (5,6%), glutamina (0,2 mol/L) e HEPES (1 mol/L). O pH foi ajustado para 7,2 e o meio foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore) para esterilização. As células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow), seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Nikon, modelo Diaphot) a cada 24 horas. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizada solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em tampão fosfato (BUTLER e DAWSON, 1992).

3.2.4.4 Procedimento experimental

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* do Noni-ppt 3 foi realizada no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em duplicata. As células em suspensão ou em monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 poços na concentração de 2 x 10⁴ células/100 µL para as células suspensas e de 2 x 10³ células/100 µL para as células aderidas utilizando o método automatizado oferecido pelo instrumento de High Throughout Screening (Becman Coulter Inc., modelo Biomek 3000). As amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5 (50 µg/mL) foram incubadas durante 72 h juntamente com as linhagens tumorais em um volume final de 200 µL em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, as

placas foram centrifugadas (1500 rpm por 15 min.; Eppendorf, modelo Centrifuge 5403) e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram acrescentados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium 0,5 mg/mL) a cada poço e a placa foi incubada por mais 3 h. Após este período, foram acrescentados 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% a fim de solubilizar o formazan produzido e, em seguida, a placa foi enrolada em papel alumínio e colocada na estufa a 37°C por mais uma noite. A leitura de absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) e, por fim, procedeu-se a determinação da porcentagem de células viáveis empregando a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{Células tratadas}} - \text{DO}_{\text{Branco}}}{\text{DO}_{\text{Controle negativo}} - \text{DO}_{\text{Branco}}} \times 100$$

onde:

- $\text{DO}_{\text{Células tratadas}}$ = Densidade óptica dos poços com o Noni-ppt
- $\text{DO}_{\text{Controle negativo}}$ = Densidade óptica dos poços do controle negativo
- $\text{DO}_{\text{Branco}}$ = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

3.2.5 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do Noni-ppt 3 foi realizada no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará. O protocolo experimental adotado foi submetido à análise da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovado segundo o protocolo nº 83/2013.

O tumor utilizado no experimento foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no Crocker Laboratory (Columbia University, New York), sendo originalmente um tumor de natureza sólida, surgindo espontaneamente na região axilar de camundongos.

Inicialmente, o Sarcoma 180 foi classificado como um carcinoma mamário, mas por volta de 1919, após a realização de vários transplantes subcutâneos, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram peculiares de um tumor sarcomatoso, passando então a ser denominado Sarcoma 180 (RIOS, 2013).

3.2.5.1 Obtenção e manutenção dos animais

Nos testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do Noni-ppt, foram utilizados camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial (Purina, São Paulo) e de água clorada durante o período do experimento.

O animal de manutenção (Figura 11) foi sacrificado por deslocamento cervical e, em seguida, foi coletado o líquido ascítico da sua cavidade abdominal e preparada uma suspensão de células com 40 mL de soro Ringer lactato, 100 µL de gentamicina (10 mg/mL) e 5 mL de líquido ascítico para posterior contagem de células.

Figura 11 – Animal de manutenção com a forma ascítica do Sarcoma 180.

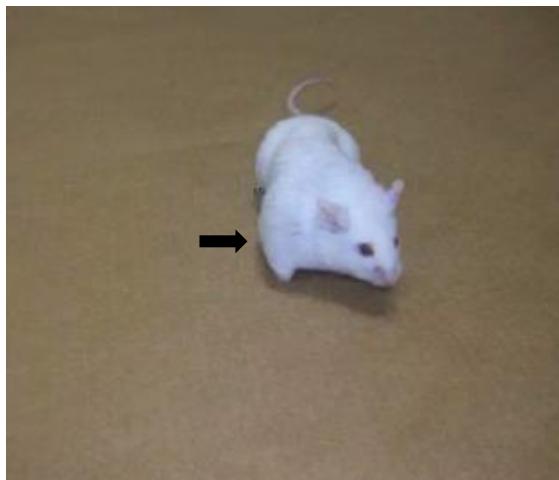


Fonte: o autor.

3.2.5.2 Procedimento experimental

Para a implantação do tumor sólido, foram injetadas 2×10^6 células/0,5 mL na região axilar esquerda de camundongos com peso médio de 30 g. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos ($n=8$) e, após 24 h da inoculação do tumor, foi dado início ao tratamento, o qual foi realizado por sete dias consecutivos, utilizando 25 mg/kg/dia de 5-Fluorouracil (5-FU) para o controle positivo e solução salina para o controle negativo. O Noni-ppt 3 foi testado nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, sendo administradas tanto por via intraperitoneal (i.p.) como por via oral (v.o.) (Figura 13).

Figura 12 – Animal com tumor sólido Sarcoma 180.



Fonte: LabNOE – UFC

Figura 13 – Animal em tratamento por via oral.



Fonte: LabNOE – UFC

No final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado e estômago) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

onde:

- A = média dos pesos dos tumores no grupo controle
- B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados

3.2.5.3 Análise dos dados

Os efeitos do Noni-ppt 3 no crescimento tumoral *in vivo* foram avaliados utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software). Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e purificação do polissacarídeo de *Morinda citrifolia* Linn

Na Tabela 2, encontram-se as porcentagens dos componentes do fruto maduro de *Morinda citrifolia* Linn. Pode-se observar que o rendimento de purê seco é baixo, representando apenas 3% do total do fruto *in natura*. O teor de água no purê é de aproximadamente 91%.

Tabela 2 – Estimativa da composição centesimal do fruto maduro de *Morinda citrifolia*.

Parte do fruto	g/100g do fruto <i>in natura</i>
Casca	17
Sementes e Fibras	48
Purê	35
Purê seco	3

Os polissacarídeos frequentemente são encontrados na natureza misturados a sais inorgânicos, proteínas, ligninas, ácidos nucléicos e outros materiais, que deles precisam ser separados. Desse modo, a investigação estrutural deve ser precedida de cuidadosas etapas de isolamento e purificação, uma vez que estas podem descharacterizar o material original, alterando sua estrutura ou sua massa molar média (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993).

Existem vários métodos aplicáveis à purificação de polissacarídeos. As metodologias incluem deslipidificação, formação de complexos iônicos, precipitação alcoólica, tratamentos enzimáticos e tratamentos mecânicos, como centrifugação e filtração (KENNEDY, WHITE, 1983 BRUMMER, CUI, WANG, 2003; BOUZOUITA *et al.*, 2007). A fim de purificar o Noni-ppt 1 (Figura 14), foram realizadas sucessivas etapas de dissolução em água destilada e precipitação em álcool. O Noni-ppt 1 após duas etapas de reprecipitação foi denominado de Noni-ppt 3 e após quatro etapas de reprecipitação de Noni-ppt 5.

O rendimento das amostras de Noni-ppt encontra-se na Tabela 3. Hirazumi e Furusawa (1999) obtiveram um rendimento de Noni-ppt de 13% a partir dos sólidos totais do suco, semelhante ao rendimento de 16% reportado por Bui, Bacic e Pettolino (2006). O rendimento do Noni-ppt 1 (9,3%) obtido no presente estudo encontra-se abaixo do mencionado nas pesquisas anteriores. O Noni-ppt 5 representa 5,0% do purê seco e apenas 0,1% do fruto de *Morinda citrifolia*.

Figura 14 – Aspecto macroscópico do Noni-ppt 1.



Fonte: o autor.

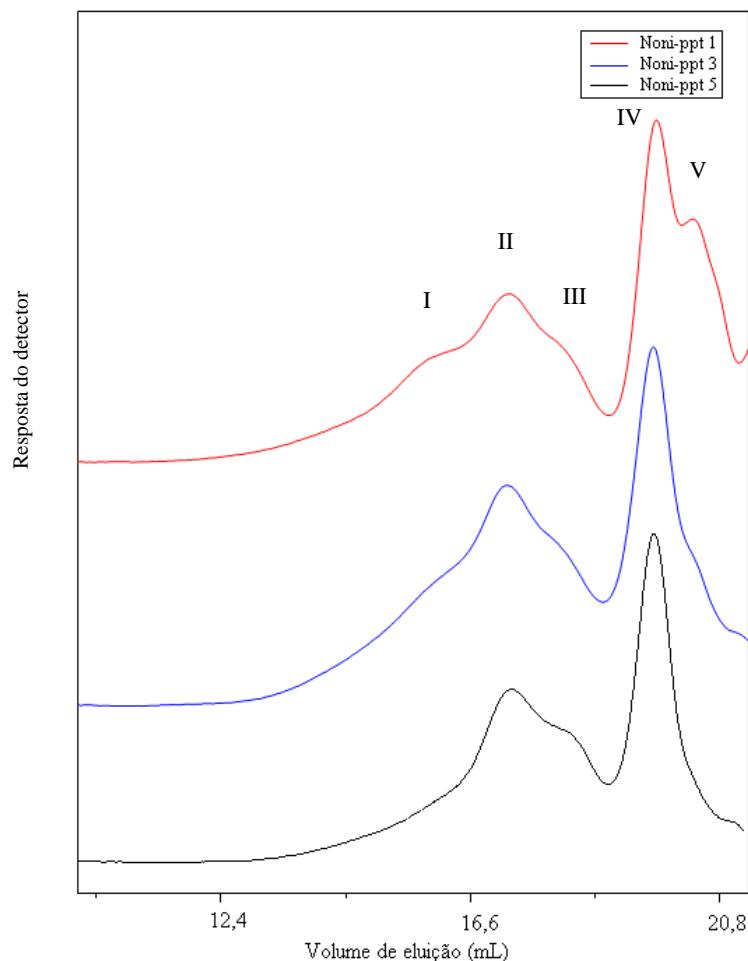
Tabela 3 – Rendimento das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5 obtidas a partir do purê de *Morinda citrifolia*.

Noni-ppt	Porcentagem (%) em relação ao	
	Fruto <i>in natura</i>	Purê seco
Noni-ppt 1	0,30	9,3
Noni-ppt 3	0,20	6,6
Noni-ppt 5	0,14	5,0

4.2 Determinação do perfil de distribuição da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

No cromatograma de GPC do Noni-ppt 1 (Figura 15), pode-se observar uma larga distribuição de massa molar, com frações eluindo em 16,3 mL (I), 17,2 mL (II), 18,0 mL (III), 19,6 mL (IV) e 20,2 mL (V). Pode-se verificar ainda que tanto a fração de maior (I) como a de menor (V) massa molar foram reduzidas no Noni-ppt 3 e completamente eliminadas no Noni-ppt 5, restando dois materiais com volume de eluição de 17,2 mL e 19,6 mL e um ombro com volume de eluição 18,1 mL.

Figura 15 – Cromatograma de GPC para as amostras de Noni-ppt com detector de índice de refração.



4.3 Determinação do teor de proteínas através da análise elementar

A quantidade de proteínas das amostras de Noni-ppt encontra-se na Tabela 4. Pode-se verificar que o Noni-ppt 1 apresenta um menor conteúdo de proteínas quando comparado às amostras submetidas ao processo de purificação. Bui, Bacic e Pettolino (2006) obtiveram para o Noni-ppt um teor de proteínas de 6% empregando o método de Kjeldahl, o que corresponde a aproximadamente metade do determinado no presente estudo.

Tabela 4 – Teor de proteína das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.

Amostra	Teor de nitrogênio (% m/m)	Teor de proteína (% m/m)
Noni-ppt 1	2,11	12,1
Noni-ppt 3	2,36	13,6
Noni-ppt 5	2,39	13,7

4.4 Dosagem de ácidos urônicos

Os ácidos urônicos consistem em monossacarídeos cujo carbono primário terminal ($-\text{CH}_2\text{OH}$) foi oxidado a ácido carboxílico. Estes grupos carboxílicos presentes nos polissacarídeos naturais podem existir tanto na forma ácida ($-\text{COOH}$) como na forma salina ($-\text{COO}^-\text{M}^+$). Para garantir a protonação de todos os grupos carboxílicos, as soluções de Noni-ppt foram percoladas através de uma coluna contendo microesferas catiônicas. A Figura 16 apresenta a curva de titulação potenciométrica do Noni-ppt 5 com NaOH e sua respectiva derivada.

A Tabela 5 apresenta o teor de ácido urônico das amostras de Noni-ppt. O ácido urônico é citado por Bui, Bacic e Pettolino (2006) como componente majoritário do Noni-ppt, correspondendo a 62% da sua composição. O teor de ácido urônico encontrado para as amostras foi elevado, porém inferior àquele reportado pelos referidos pesquisadores. Como se sabe, a composição química dos frutos pode variar tanto com as condições edafoclimáticas da região em que a planta se desenvolve (BARROS, 2009) como com o estágio de maturação dos frutos (LINDSAY *et al.*, 2012), fatos estes que podem estar associados à diferença observada.

Foi possível verificar que as sucessivas etapas de dissolução e precipitação empregadas na purificação do Noni-ppt 1 influenciaram no teor de ácido das amostras. A quantidade de ácido urônico do Noni-ppt 3 e do Noni-ppt 5 foram semelhantes, mas significativamente inferiores àquela encontrada para o Noni-ppt 1.

Figura 16 – Curva de titulação potenciométrica do Noni-ppt 5 com NaOH 0,09097 mol/L e sua respectiva derivada.

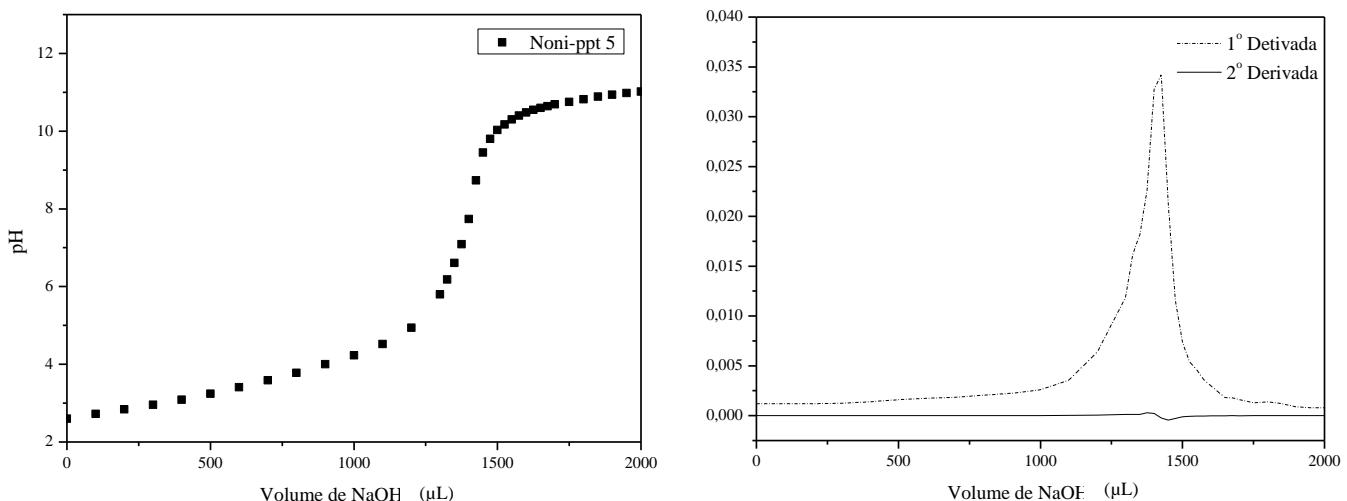


Tabela 5 – Teor de ácido urônico das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.

Amostra	Teor de ácido urônico (% m/m)
Noni-ppt 1	58,8 ± 0,8
Noni-ppt 3	45,7 ± 1,4
Noni-ppt 5	44,2 ± 1,2

4.5 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada com o intuito de observar as bandas de absorção características de polissacarídeos. De acordo com o espectro do Noni-ppt 1 (Figura 18), é possível observar a banda em 3408 cm^{-1} referente ao estiramento axial da ligação O-H, a absorção em 2939 cm^{-1} característica do estiramento axial da ligação C-H de grupamentos metila, a banda em 1146 cm^{-1} referente à deformação de C-O-C da ligação glicosídica e banda em 1016 cm^{-1} relacionada ao estiramento de C-O de álcool primário.

Nos polissacarídeos, a vibração de estiramento da carbonila do ácido carboxílico ocorre entre $1710\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$, enquanto que a vibração assimétrica do grupamento carboxilato aparece na região entre $1600\text{-}1651\text{ cm}^{-1}$ e a simétrica absorve entre $1408\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$. Assim, nos sais de ácidos carboxílicos, as vibrações do grupo carbonílico são deslocadas para uma região de menor número de onda. Isto ocorre devido a maior possibilidade de ressonância da ligação RCOO^- da carbonila do ácido carboxílico que ocasiona um decréscimo de densidade eletrônica entre os átomos de carbono e de oxigênio (OLIVEIRA, 1998).

O Noni-ppt 1 apresenta uma parte dos grupos carboxílicos na forma ácida e outra na forma salina, o que pode ser verificado através da absorção em 1744 cm^{-1} atribuída ao estiramento da carbonila do ácido carboxílico, da banda em 1420 cm^{-1} característica do estiramento simétrico do grupamento carboxilato e da absorção em 1618 cm^{-1} característica do estiramento assimétrico do grupamento carboxilato.

Observando o espectro do Noni-ppt 1 acidificado (Figura 17), pode-se admitir que todos os grupos carboxílicos encontram-se protonados, visto que houve um considerável aumento da banda em 1742 cm^{-1} , referente ao estiramento da carbonila do ácido carboxílico, o desaparecimento da banda em 1420 cm^{-1} , atribuída ao estiramento simétrico do grupamento carboxilato, e da banda em 1618 cm^{-1} , relacionada ao estiramento assimétrico desse mesmo grupo.

Figura 17 - Espectros na região do infravermelho do Noni-ppt 1 e do Noni-ppt 1 acidificado.

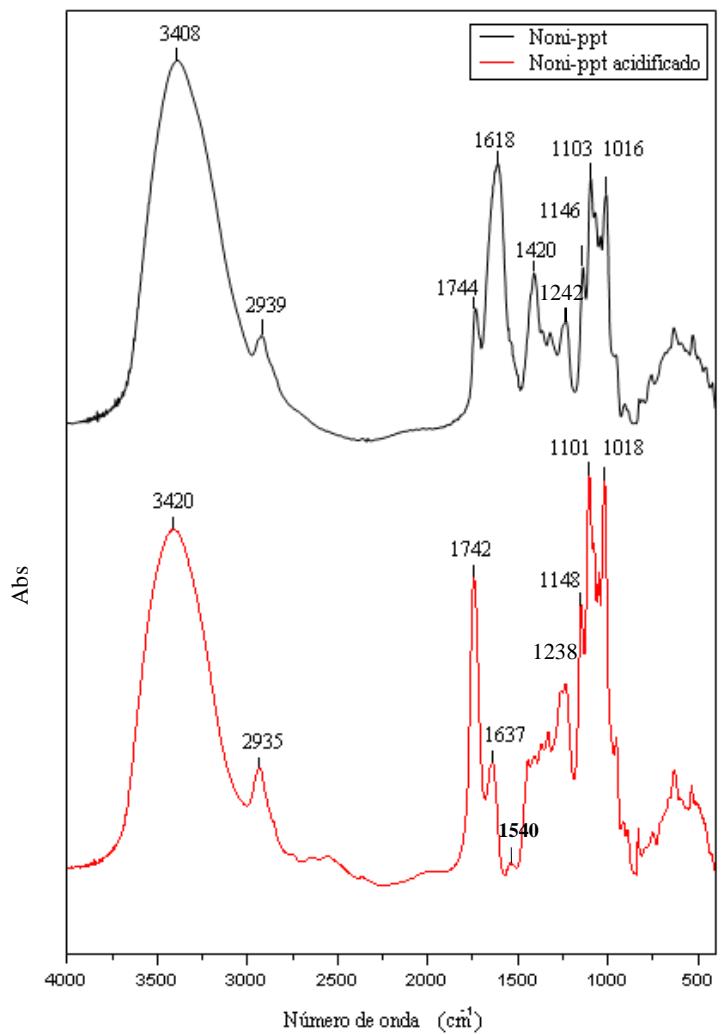


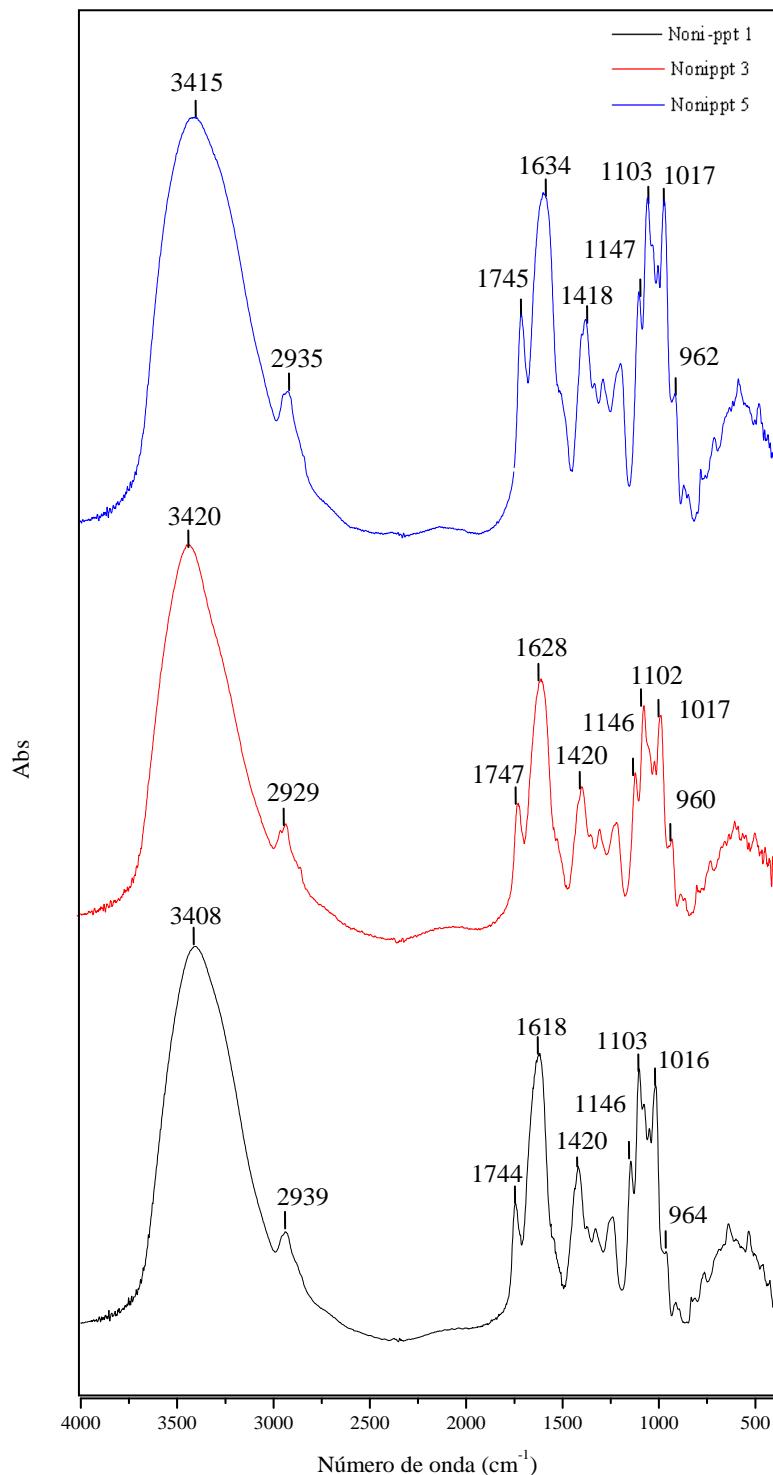
Tabela 6 – Atribuições das bandas no infravermelho do Noni-ppt 1 e do Noni-ppt 1 acidificado.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuições
Noni-ppt 1	Noni-ppt acidificado	
3408	3420	v(O-H)
2939	2935	v(C-H)
1744	1742	vC=O do COOH
1618	-	v _{as} (COO ⁻)
1618	1637	δ(O-H) de H ₂ O adsorvida
1242	1238	vC=O do R-COCH ₂
1420	-	v _s (COO ⁻)
1146	1148	v(C–O–C) éter de ligação glicosídica
1103	1101	v(C–O) álcool secundário
1016	1018	v(C–O) álcool primário

Na Tabela 6, encontram-se as atribuições das principais bandas no espectro de infravermelho do Noni-ppt 1 e do Noni-ppt 1 acidificado.

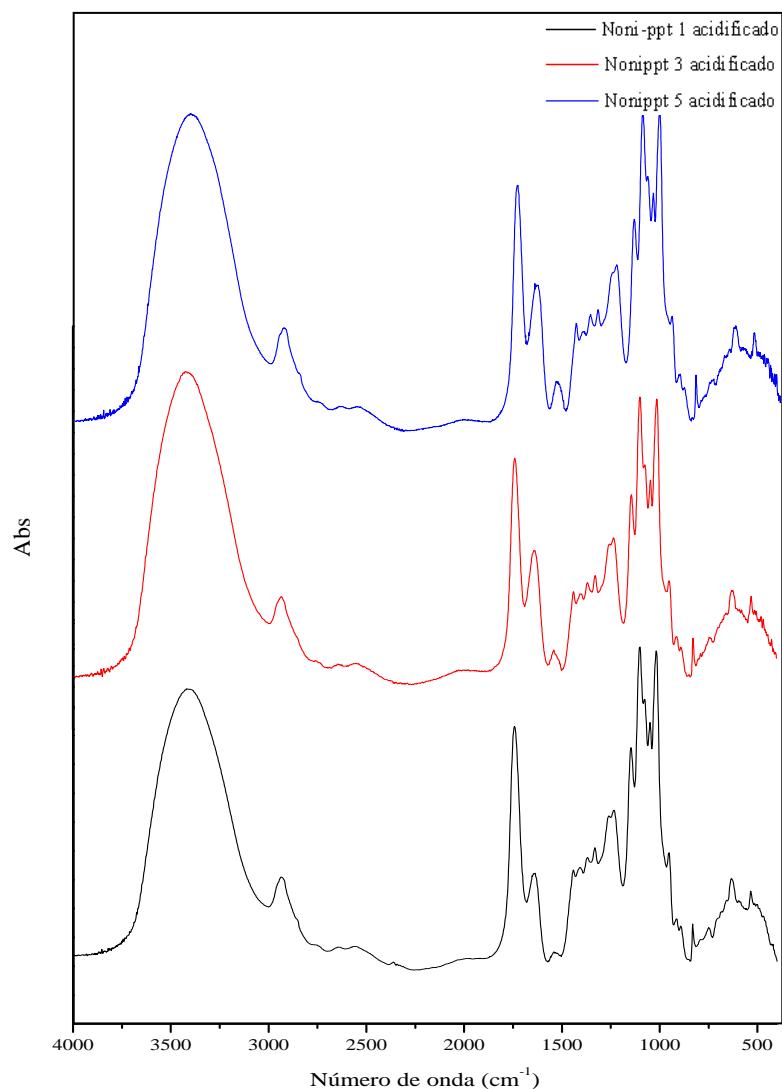
Ao comparar os três espectros de infravermelho das amostras de Noni-ppt (Figura 18), observa-se que estes são bastante semelhantes e correspondem a polissacarídeos.

Figura 18 – Espectros na região do infravermelho das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.



O fruto maduro de *Morinda citrifolia* Linn apresenta uma quantidade elevada de proteínas, sendo estas compostas por diversos aminoácidos, dentre os quais se destacam a asparagina, a prolina, a serina, a alanina, a glutamina, o ácido aspártico e o ácido glutâmico (LINDSAY; GOLDEN, 2012). Nos espectros das amostras acidificadas de Noni-ppt (Figura 19), observa-se a existência de uma banda por volta de 1540 cm^{-1} , que pode ser atribuída à deformação angular N-H da amida II (ARÊAS; KAWANO, 1991; LIMA *et al.*, 2013) resultante das ligações peptídicas que ocorrem entre o grupo α -carbonila de um aminoácido e o grupo α -amino de outro (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006). Foi verificado ainda que a purificação do Noni-ppt 1 ocasionou um aumento da intensidade da banda em 1540 cm^{-1} , o que é condizente com o aumento do teor de nitrogênio das amostras determinado por análise elementar.

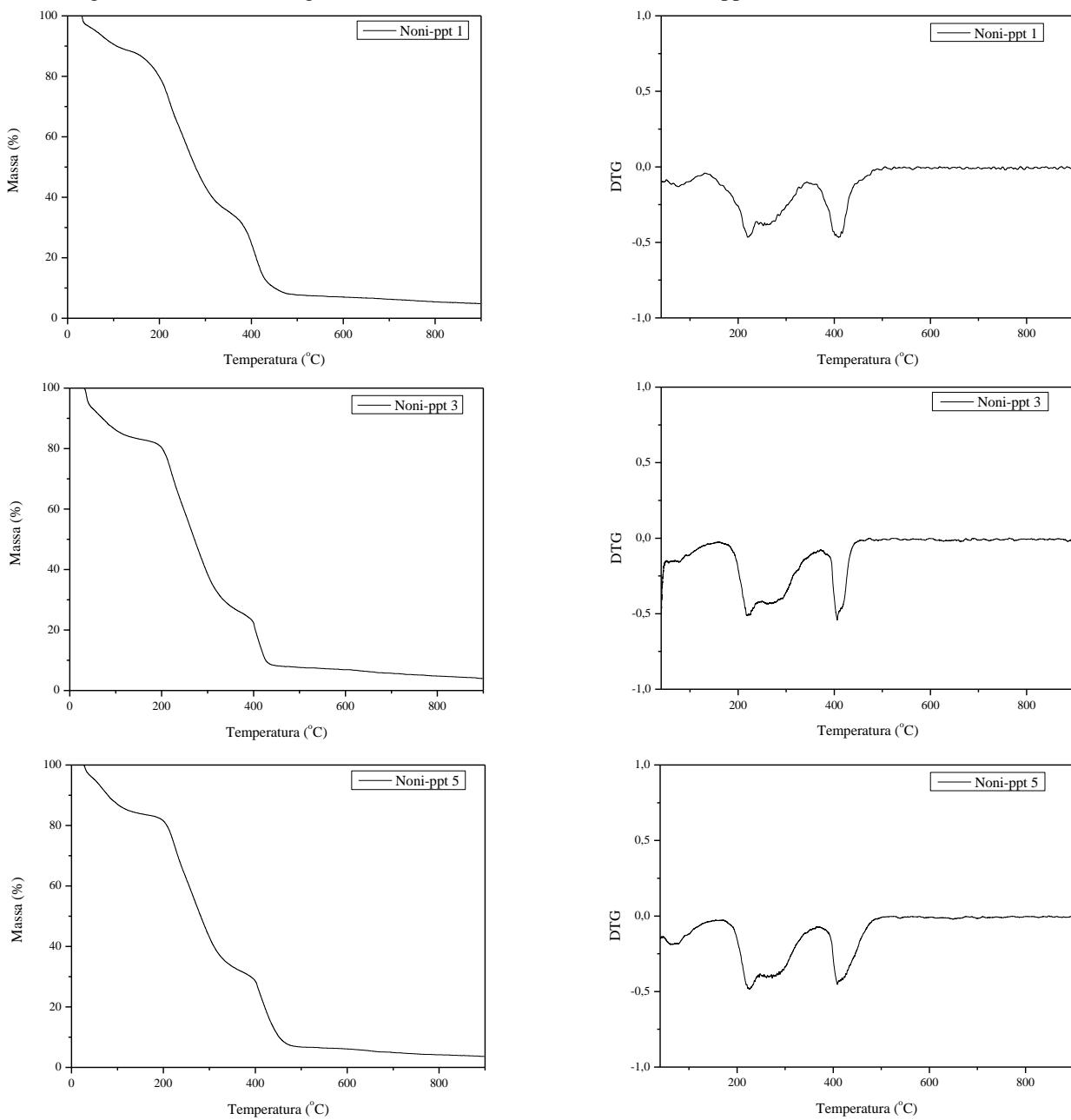
Figura 19 – Espectros na região do infravermelho do Noni-ppt 1, 3 e 5 acidificado.



4.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 20 exibe as curvas termogravimétricas e suas respectivas derivadas para as amostras de Noni-ppt. As curvas termogravimétricas das amostras apresentaram perfis semelhantes, com quatro eventos de perda de massa em cada. O primeiro evento de perda de massa das amostras corresponde à perda de umidade, que geralmente ocorre antes de 100 °C. O perfil termogravimétrico das amostras apresentou três eventos de perda de massa correspondentes à decomposição térmica do Noni-ppt. Para o primeiro evento de decomposição térmica, a temperatura máxima de decomposição (Tmax) obtida pela DTG variou de 222 a 226 °C. Para o segundo evento, a Tmax variou de 257 a 267 °C, enquanto que a Tmax do último evento foi de 408 °C para as três amostras.

Figura 20 - Curvas termogravimétricas e DTGs das amostras de Noni-ppt a 10°C/min em ar sintético.



A umidade, a temperatura inicial de decomposição (T_i), a temperatura de máxima decomposição (T_{max}) e o percentual de resíduo são mostrados na Tabela 7. Pode-se observar que as sucessivas etapas de dissolução e precipitação empregadas na purificação do Noni-ppt 1 ocasionaram a redução do resíduo a 900 °C, o que é compatível com o decréscimo do teor de ácido urônico também encontrado para as amostras (PAULA, 1990).

Tabela 7 – Dados obtidos a partir das curvas termogravimétricas e dos gráficos de DTG das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.

Amostras	Umidade (%)	T_i (°C)	T_{max} dos eventos de perda de massa (°C)			Resíduo a 900 °C (%)
			I	II	III	
Noni-ppt 1	11,5	132	222	257	408	4,8
Noni-ppt 3	17,0	158	222	267	408	4,0
Noni-ppt 5	16,7	171	226	264	408	3,6

4.7 Determinação do teor de umidade por análise gravimétrica

A Tabela 8 apresenta o teor de umidade das amostras de Noni-ppt obtido por gravimetria.

Tabela 8 – Teor de umidade determinado por análise gravimétrica.

Amostra	Teor de umidade (% m/m)
Noni-ppt 1	12,1 ± 0,3
Noni-ppt 3	17,0 ± 0,6
Noni-ppt 5	13,9 ± 3,2

Pode-se observar que os valores encontrados são semelhantes àqueles obtidos através da análise termogravimétrica, considerando o desvio padrão. A porcentagem de umidade das amostras variou entre 12 e 17%.

4.8 Determinação da composição monossacarídica

4.8.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

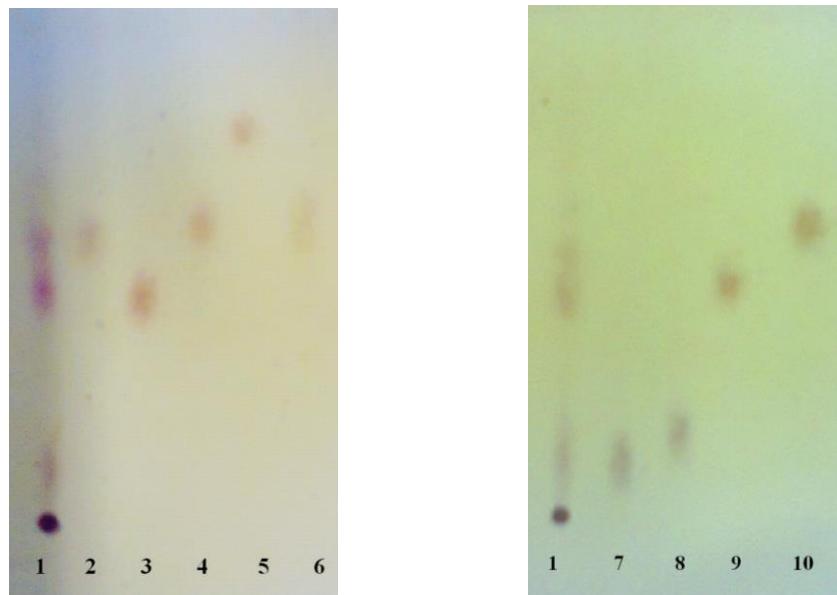
Para a determinação da composição monossacarídica do polissacarídeo extraído do fruto de *M. citrifolia*, o material foi primeiramente submetido a uma hidrólise ácida utilizando o ácido trifluoracético. O cromatograma do Noni-ppt 5 (Figura 21) hidrolisado

apresentou três manchas distintas com valores de R_f iguais a 0,09, 0,45 e 0,52, sugerindo a presença de ácido galacturônico (GalA), galactose (Gal) e arabinose (Ara).

Tabela 9 – Valores de R_f dos padrões de monossacarídeos em n-butanol/piridina/HCl 0,1 mol/L (10:3:3).

Padrões testados	Rfs dos padrões
GalA	0,09
GlcA	0,15
Ara	0,54
Gal	0,42
Man	0,56
Glc	0,40
Rha	0,74
Xyl	0,56
Rib	0,54

Figura 21 – Cromatogramas do Noni-ppt 5.



Fonte: o autor. (1) Noni-ppt hidrolisado; (2) arabinose; (3) galactose; (4) manose; (5) ramnose; (6) xilose; (7) ácido galacturônico; (8) ácido glucurônico; (9) glicose e (10) ribose.

4.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os cromatogramas do Noni-ppt 1, 3 e 5 podem ser observados nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

Figura 22 – Cromatograma de CLAE do hidrolisado de Noni-ppt 1 (A- ácido glucurônico, B- ácido galacturônico, C-galactose, D- ramnose, E- arabinose).

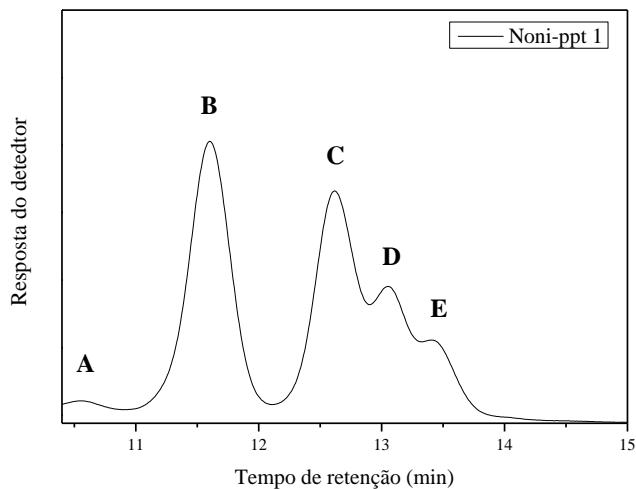


Figura 23 – Cromatograma de CLAE do hidrolisado de Noni-ppt 3 (B- ácido galacturônico, C- galactose e D- ramnose, E- arabinose).

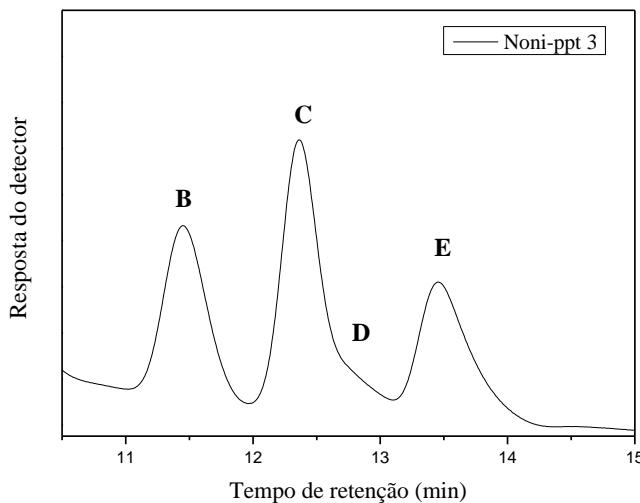
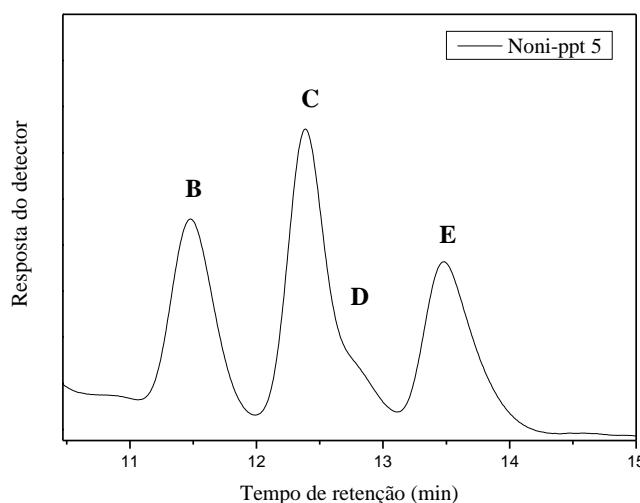


Figura 24 – Cromatograma de CLAE do hidrolisado de Noni-ppt 5 (B- ácido galacturônico, C- galactose, D- ramnose, E- arabinose).



Através da análise por CLAE, pode-se confirmar que o Noni-ppt contém um heteropolissacarídeo formado majoritariamente por ácido galacturônico (B), galactose (C) e arabinose (E). Pode-se identificar ainda a presença de ácido glicurônico (A) e de ramnose (D), na amostra de Noni-ppt 1. A presença de pequenas concentrações de glicose (Glc), de manose (Man) e de xilose (Xyl) não pode ser descartada, uma vez que seus tempos de retenção (Tr) são próximos aos de outros monossacarídeos, havendo a possibilidade de sobreposição de picos.

Tabela 10 – Tempo de retenção (Tr) dos padrões de monossacarídeos e dos componentes do Noni-ppt 1, 3 e 5.

Componentes	Tempo de retenção (Tr) min			Identificação dos padrões/ Tr
	Noni-ppt 1	Noni-ppt 3	Noni-ppt 5	
A	10,57	10,60	10,84	GlcA / 10,60
B	11,60	11,45	11,43	GalA / 11,39
C	12,62	12,36	12,32	Gal / 12,33 Man / 12,26 Xyl / 12,26
D	13,05	12,74	12,83	Rha / 12,70
E	13,41	13,45	13,42	Ara / 13,41

A composição percentual do Noni-ppt foi estimada calculando-se as áreas correspondentes aos picos e relacionando-as à área total através da utilização do software Origin® 7.0. Devido à sobreposição dos picos de galactose, ramnose e arabinose no Noni-ppt 1, suas concentrações não puderam ser estimadas de forma isolada. Os resultados encontram-se listados na Tabela 11.

De acordo com Bui, Bacic e Pettolino (2006), o Noni-ppt extraído a partir de frutos cultivados no Vietnã é constituído por 52,6% GalA, 17,9% Gal, 13,6% Ara, 9,5% Rha e pequenas quantidades de Man, Xyl, GlcA, Fuc e Glc. De modo semelhante, o presente trabalho apresentou como componentes marjoritários GalA e Gal. O teor de ramnose também foi semelhante, porém o de arabinose foi praticamente o dobro daquele determinado por Bui, Bacic e Pettolino. Uma comparação mais acurada com o referido trabalho torna-se difícil, visto que os autores não informam o número de etapas de reprecipitação em álcool etílico empregadas no processo de purificação do Noni-ppt analisado. Desse modo, as diferenças observadas na composição monossacarídica do Noni-ppt podem estar relacionadas ao número

de etapas de reprecipitação em etanol, às diferentes condições edafoclimáticas dos locais de cultivo do noni (Vietnã/Brasil) e/ou ao estágio de maturação dos frutos processados.

Tabela 11 – Composição monossacarídica das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5.

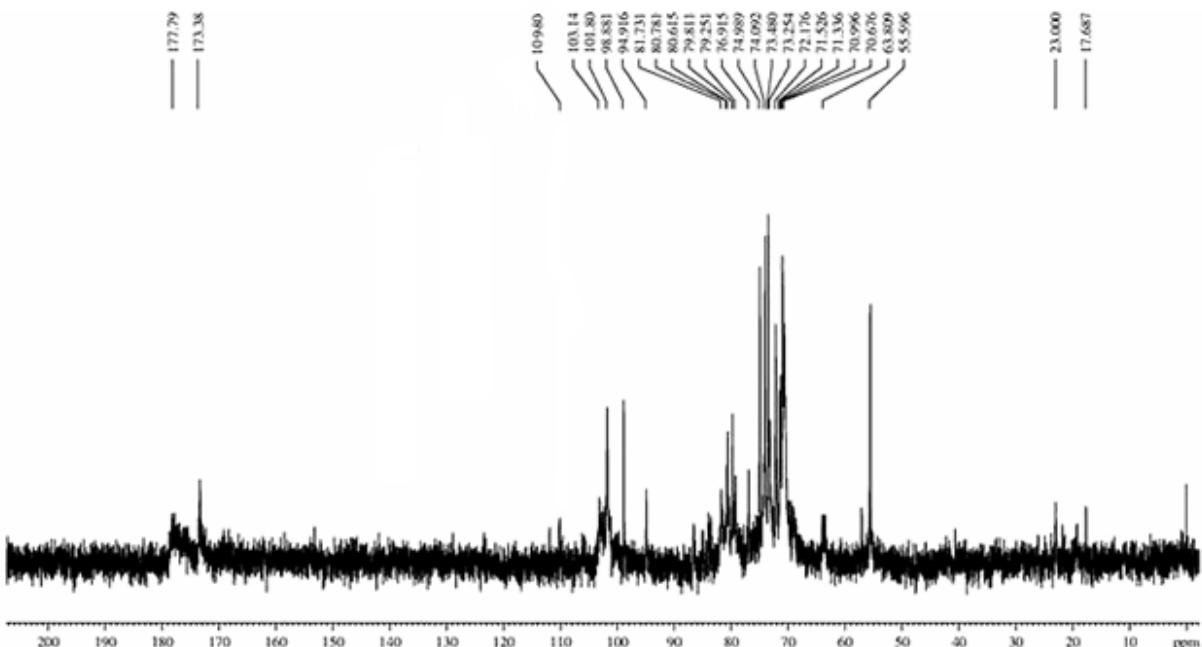
Amostra	Componentes			
	B	C	D	E
	GalA (%)	Gal (%)	Rha (%)	Ara (%)
Noni-ppt 1	41,8 ± 0,6	-----	58,2 ± 0,4	-----
Noni-ppt 3	32,0 ± 2,4	31,8 ± 1,1	11,1 ± 0,4	25,1 ± 1,7
Noni-ppt 5	28,4 ± 3,2	34,2 ± 3,2	10,4 ± 0,1	27,0 ± 0,2

4.9 Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

A amostra de Noni-ppt 3 foi analisada por técnicas de ressonância magnética nuclear unidimensional. A atribuição dos sinais no espectro de RMN ^{13}C foi realizada considerando a composição monossacarídica encontrada e os dados já descritos na literatura.

O espectro de RMN de ^{13}C do Noni-ppt 3 (Figura 25) apresenta dois sinais em campo alto, em 173,4 e em 177,8 ppm, os quais são característicos de carbonila e podem ser atribuídos ao C-6 (COOH e COOCH₃) das unidades de ácido galacturônico (PETERSEN *et al.*, 2008).

Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração Noni-ppt 3. Deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. Calibração interna com D₂O.



A análise da região anomérica do espectro mostra sinais mais intensos em 109,8; 103,1; 101,8; 98,9 e 94,9 ppm que podem ser atribuídos ao C-1 das unidades de arabinose, galactose (substituída e não substituída), de ácido galacturônico e de ramnose, respectivamente (AGRAWAL, 1992; VRIESMAN, 2012). Os sinais em 17,7 e 55,6 ppm correspondem, respectivamente, ao C-6 da ramnose (AGRAWAL, 1992) e ao carbono de grupos metil (COOCH_3) das unidades esterificadas de $\text{Gal}\alpha\text{A}$ presentes no heteropolissacarídeo. A existência de grupos acetil foi evidenciada pelo sinal em 23,0 ppm (JUNGLES, 2008; VRIESMAN, 2012).

A Tabela 12 apresenta um resumo dos parâmetros avaliados ao longo do trabalho. O teor de carboidratos totais foi determinado através da subtração dos demais constituintes (umidade, proteínas, resíduo) das amostras de Noni-ppt.

Tabela 12 – Principais parâmetros avaliados para o Noni-ppt 1, 3 e 5.

Composição (% em massa)	Noni-ppt 1	Noni-ppt 3	Noni-ppt 5
Umidade média*	11,8	17,0	15,3
Resíduo a 900 °C	4,8	4,0	3,6
Teor de proteínas	12,1	13,6	13,7
Carboidratos totais	71,3	65,4	67,4
Ácido galacturônico (GalA)	$41,8 \pm 0,6$	$32,0 \pm 2,4$	$28,4 \pm 3,2$
Galactose (Gal)	↑	$31,8 \pm 1,1$	$34,2 \pm 3,2$
Ramnose (Rha)	$58,2 \pm 0,4$	$11,1 \pm 0,4$	$10,4 \pm 0,1$
Arabinose (Ara)	↓	$25,1 \pm 1,7$	$27,0 \pm 0,2$

*média entre a umidade obtida por análise termogravimétrica e por gravimetria.

4.10 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

Uma forma rápida e eficaz de investigar as propriedades antitumorais de novas substâncias é através da utilização de modelos *in vitro* (CRAGG; NEWMANN, 2000). Algumas das vantagens dos testes de citotoxicidade *in vitro* são o maior controle das condições experimentais, o baixo custo e a rapidez dos resultados (NACHTIGAL, 2011). No entanto, tais ensaios apresentam limitações, uma vez que não são eficientes na análise de compostos que atuam como pró-fármacos ou que possuam mecanismos de ação dependentes do hospedeiro.

A análise *in vitro* foi realizada com o intuito de avaliar o efeito antiproliferativo das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5 sobre as seguintes linhagens tumorais: HCT-116 (câncer de cólon), SF-295 (sistema nervoso central) e OVCAR-8 (carcinoma ovariano). Os resultados do teste *in vitro* (Tabela 13) demonstraram que o polissacarídeo ocasionou apenas uma pequena redução da viabilidade celular e, por essa razão, não apresenta atividade citotóxica direta sobre as células tumorais na concentração testada (50 µg/mL). Nos ensaios com as linhagens HCT-116 e OVCAR-8, o Noni-ppt 3 foi a amostra que exibiu maior citotoxicidade, com 75,0% e 80,7% de viabilidade celular, respectivamente.

Tabela 13 – Viabilidade celular (%) das linhagens tumorais humanas HCT-116, SF-295 e OVCAR-8 tratadas com Noni-ppt 1, 3 e 5 na concentração de 50 µg/mL.

Amostra	Linhagens tumorais		
	HCT-116	SF-295	OVCAR-8
	Viabilidade celular (%)		
Noni-ppt 1	84,8 ± 3,4	104,6 ± 9,3	87,8 ± 10,4
Noni-ppt 3	75,0 ± 4,2	101,8 ± 4,1	80,7 ± 10,5
Noni-ppt 5	85,6 ± 2,2	95,4 ± 4,5	82,1 ± 2,8

A ausência de citotoxicidade em modelos *in vitro* envolvendo macromoléculas, incluindo os polissacarídeos, é comum na literatura. Em contrapartida, estudos têm demonstrado que, quando administrados em animais, muitos deles são capazes de inibir o crescimento tumoral (OOI; LIU, 2000). Cao e Lin (2004) reportaram que um polissacarídeo isolado da espécie de cogumelo *Ganoderma lucidum* não foi capaz de impedir a proliferação das células tumorais *in vitro*, mas apresentou inibição tumoral significativa (61,9%) quando administrado em camundongos com Sarcoma 180. Os alginatos isolados da alga *Sargassum vulgare* também são inativos em modelos *in vitro*, porém possuem pronunciada atividade antitumoral em modelos murinos tanto quando administrados por via intraperitoneal quanto por via oral (SOUZA *et al.*, 2007).

Em 1999, Hirazumi e Furusawa investigaram a atividade antitumoral do polissacarídeo extraído do fruto do noni (Noni-ppt) e também verificaram que este não era citotóxico abaixo da concentração de 2 mg/mL. Por outro lado, quando administrado em camundongos portadores de carcinoma pulmonar de Lewis, o Noni-ppt foi capaz de promover o aumento do tempo de sobrevivência dos animais. O polissacarídeo estimulou a liberação de diversos mediadores por células efetoras, incluindo fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa),

interleucina 1 beta (IL-1beta), interferon gama (IFN-gama), óxido nítrico (NO), entre outros. O tratamento concomitante com agentes imunossupressores diminuiu a atividade antitumoral do Noni-ppt isolado pelos autores, reforçando a hipótese de que sua capacidade de suprimir o crescimento tumoral esteja intimamente relacionada à ativação do sistema imune do hospedeiro.

Em 2003, Furuzawa *et al.* investigaram o potencial profilático e terapêutico contra Sarcoma 180 do Noni-ppt em um modelo experimental de tumor ascítico. Os resultados mostraram que a atividade antitumoral de Noni-ppt produziu a cura de 25 a 45% dos camundongos alógénicos e que esta atividade foi completamente abolida através da administração concomitante de inibidores específicos de macrófagos (2-cloroadenosina), de células T (ciclosporina) ou de células natural killer (anticorpo anti-asialo GM1).

4.11 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese aceitos atualmente são fortemente influenciados por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos dos humanos (KAMB, 2005).

Na investigação da atividade antitumoral *in vivo*, podem ser utilizadas basicamente duas metodologias de acordo com a natureza do tumor: tumores ascíticos cujas células tumorais são inoculadas por via intraperitoneal em camundongos isogênicos, e tumores sólidos onde é realizada a inólução de células tumorais por via subcutânea (MACIEL *et al.*, 2002). A atividade antitumoral *in vivo* pode ser observada através da regressão total de tumores em animais, da redução do crescimento dos tumores ou do aumento da expectativa de vida dos animais em comparação àqueles não tratados (RIOS, 2013).

A fração intermediária, Noni-ppt 3, foi escolhida para a realização dos ensaios *in vivo*. A avaliação da atividade antitumoral do Noni-ppt 3 foi realizada em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180 na forma sólida. O Noni-ppt 3 (25 e 50 mg/kg/dia) foi administrado nos animais pelas vias intraperitoneal e oral durante sete dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor e dos órgãos (fígado, baço, rins e estômago).

Em nenhuma das doses testadas, o Noni-ppt 3 foi capaz de reduzir o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo (solução salina). No experimento cuja

administração do Noni-ppt 3 foi realizada por via i.p., foram excluídos os valores que se encontravam acima ou abaixo da média ± 2 EPM, sendo o “n” de, no mínimo, 3 animais.

O peso médio dos tumores dos animais tratados com a solução salina e com o Noni-ppt 3 i.p. nas doses de 25 mg/kg/dia e de 50 mg/kg/dia foi, respectivamente, de $2,48 \pm 0,09$ g; $2,34 \pm 0,26$ g e $2,62 \pm 0,15$ (Figura 26). Por outro lado, o peso médio dos tumores dos animais tratados com o quimioterápico 5-FU (25 mg/kg/dia) foi de $1,07 \pm 0,13$ g.

Figura 26 – Peso médio dos tumores Sarcoma 180 transplantados em camundongos fêmeas Swiss.

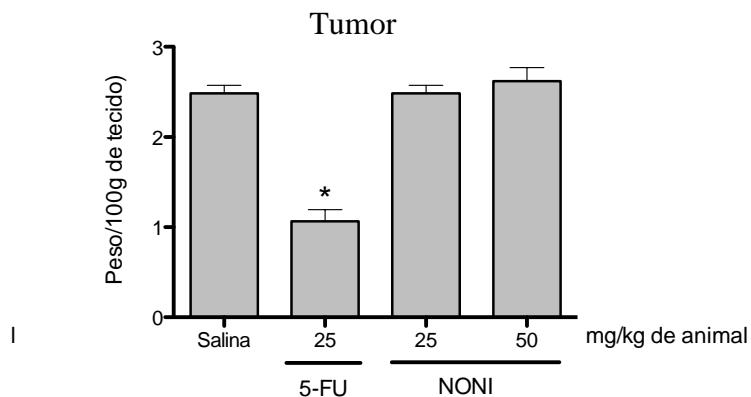
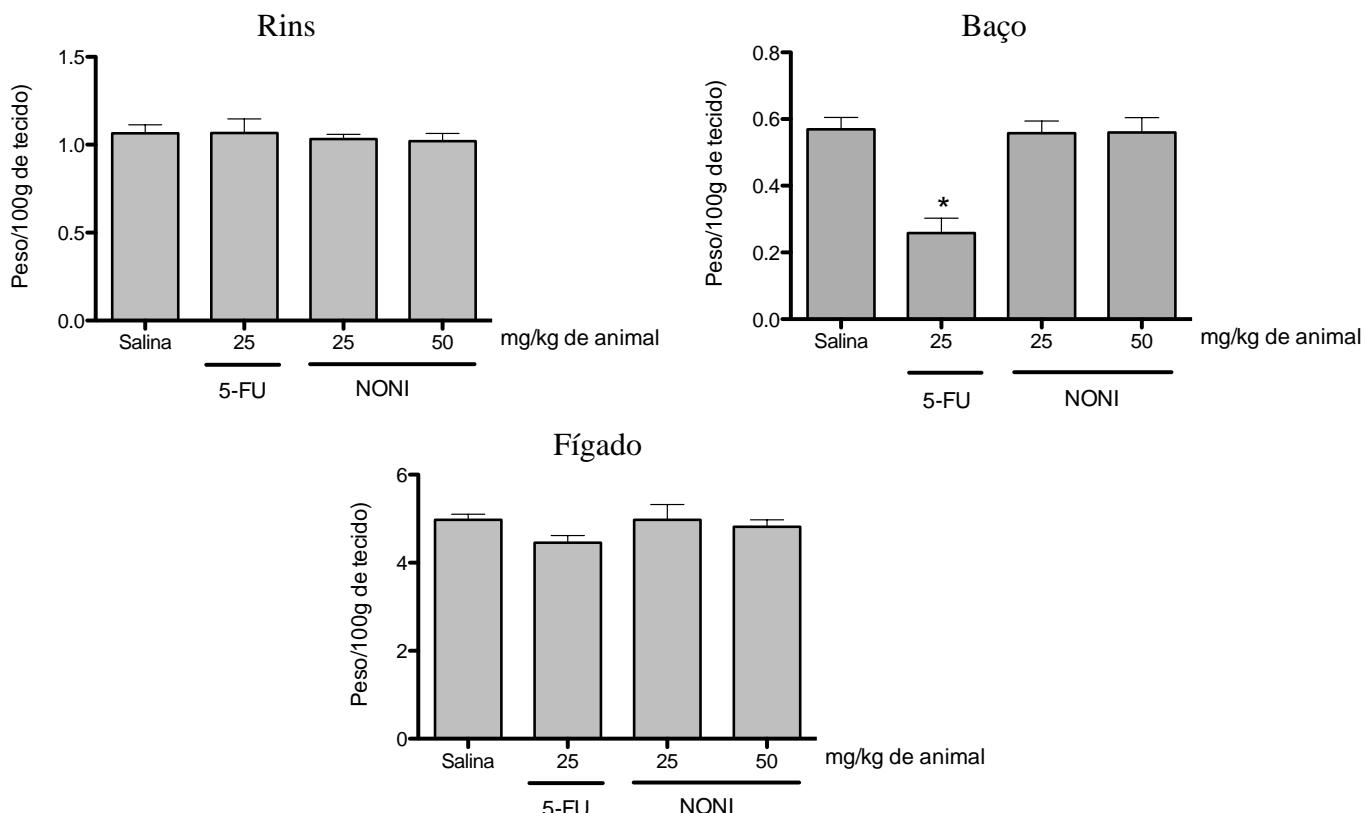


Figura 27 – Peso relativo dos órgãos dos camundongos (*Mus musculus* Swiss) transplantados com Sarcoma 180.



Efeito do polissacarídeo do fruto de *Morinda citrifolia* (Noni-ppt 3) nas doses 25 e 50 mg/kg/dia i.p. sobre o peso relativo dos órgãos dos animais após 7 dias consecutivos de tratamento. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina e o controle positivo com 25 mg/kg/dia de 5-Fluorouracil (5-FU). Dados obtidos com análise ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p<0,05.

De acordo com a Figura 27, observa-se que o tratamento com o Noni-ppt 3 administrado nas concentrações de 25 mg/kg/dia e de 50 mg/kg/dia por via intraperitoneal não ocasionou alterações no peso relativo dos órgãos (fígado, rim e baço) dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180.

O peso médio do baço dos animais tratados com o 5-fluorouracil (25 mg/kg/dia) foi significativamente menor do que daqueles do grupo controle salina, o que ocorreu provavelmente devido ao efeito imunossupressor do quimioterápico.

Tabela 14 – Efeito do Noni-ppt 3 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia i.p. sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.

Grupo	Dose mg/kg/dia	Fígado	Rim	Baço
		Peso relativo (g/100g)		
Controle negativo	-	4,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1
5-FU	25	4,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,2 ± 0,1
	25	5,1 ± 0,7	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Noni i.p.	50	4,9 ± 0,6	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1

No experimento cuja administração do Noni-ppt 3 foi realizada por via oral, o peso médio dos tumores dos animais tratados com a solução salina e com o Noni-ppt 3 nas doses de 25 mg/kg/dia e de 50 mg/kg/dia foi, respectivamente, de $3,00 \pm 0,47$ g; $2,74 \pm 0,08$ g e $2,76 \pm 0,26$ g. O peso médio dos tumores dos animais tratados com o 5-FU (25 mg/kg/dia) foi de $0,09 \pm 0,07$ g (Figura 28). O “n” para este ensaio foi de 7 camundongos.

O tratamento com o Noni-ppt 3 administrado nas concentrações de 25 mg/kg/dia e de 50 mg/kg/dia por via oral não ocasionou quaisquer alterações no peso relativo dos órgãos (fígado, rim, baço e estômago) dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 (Figura 29).

Figura 28 – Peso médio dos tumores Sarcoma 180 transplantados em camundongos fêmeas Swiss.

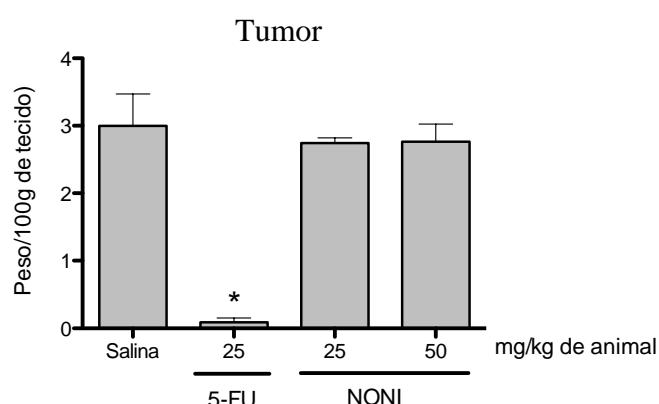
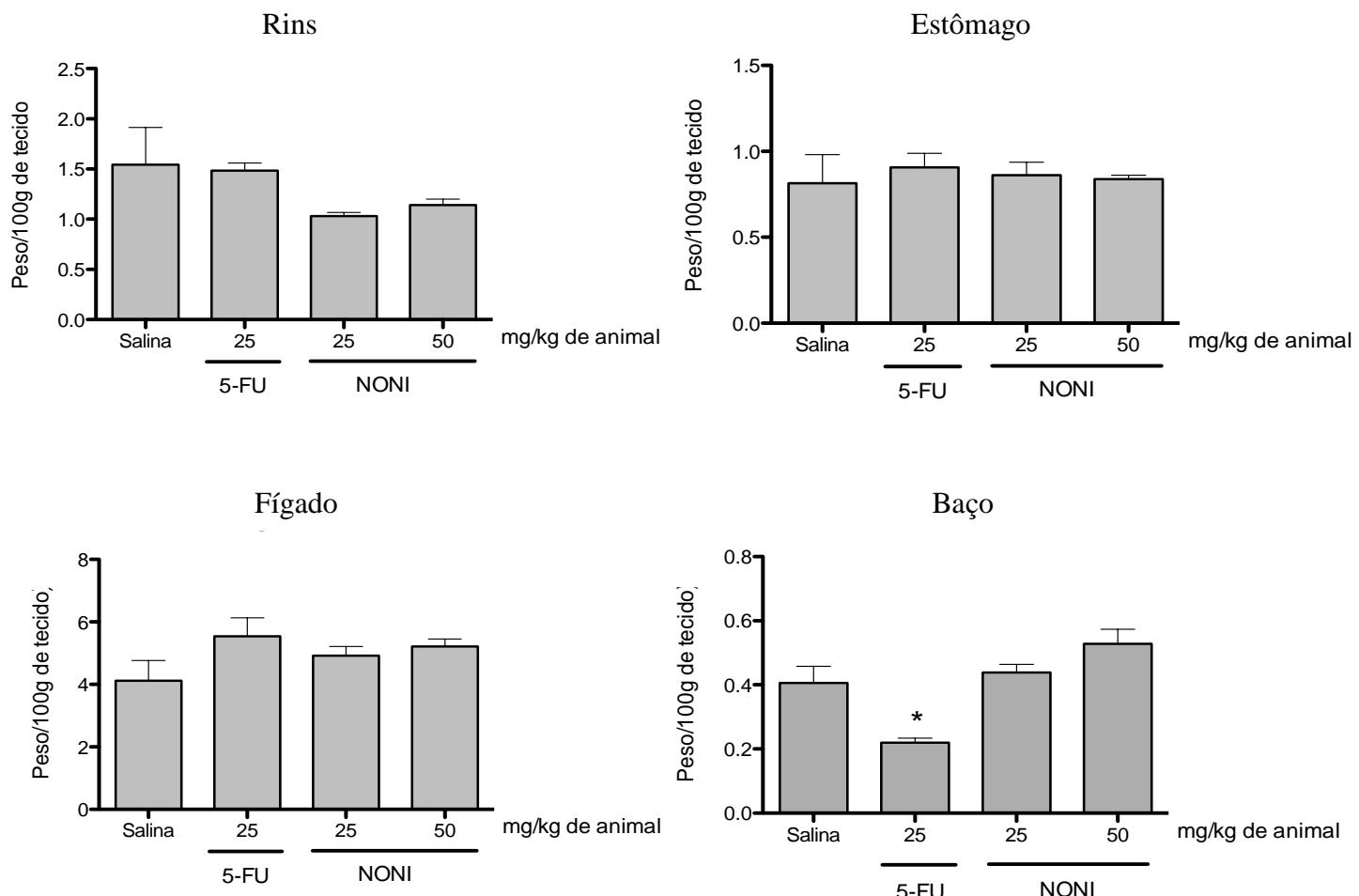


Figura 29 - Peso relativo dos órgãos dos camundongos (*Mus musculus* Swiss) transplantados com Sarcoma 180.



Efeito do polissacarídeo do fruto de *Morinda citrifolia* (Noni-ppt 3) nas doses 25 e 50 mg/kg/dia v.o. sobre o peso relativo dos órgãos dos animais após 7 dias consecutivos de tratamento. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina e o controle positivo com 25 mg/kg/dia de 5-Fluorouracil (5-FU). Dados obtidos com análise ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p<0,05.

Tabela 15 – Efeito do Noni-ppt 3 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia v.o. sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.

Grupo	Dose mg/kg/dia	Fígado			Estômago
		Peso relativo (g/100g)			
Controle negativo	-	4,1 ± 1,7	1,5 ± 1,0	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,4
5-FU	25	5,5 ± 1,3	1,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,2
Noni i.p.	25	4,9 ± 0,8	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,2
	50	5,1 ± 0,5	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1

O câncer tem se configurado como um grande problema de saúde pública mundial. Apesar dos avanços científicos e tecnológicos da indústria farmacêutica, a quimioterapia do câncer ainda permanece desafiadora devido à resistência às drogas e aos graves efeitos colaterais resultantes das semelhantes morfológicas e fisiológicas entre as células normais e cancerosas (KAMB, 2005). Como alternativa terapêutica, produtos naturais têm sido avaliados para seleção de compostos ativos com menos efeitos indesejáveis e capazes de reduzir tumores malignos de modo mais eficiente. Assim, atualmente, há um grande número de agentes antineoplásicos derivados de produtos naturais sob avaliação pré-clínica e clínica (LOTUFO *et al.*, 2010).

A utilização de plantas no tratamento e na prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Quando atributos medicinais relacionados à determinada planta são divulgados, é comum ocorrer a popularização do seu consumo. Esse fato ocorreu com a espécie *Morinda citrifolia* em escala mundial quando diversos artigos e estudos científicos sugeriram ou confirmaram muitas de suas propriedades benéficas. Desde o final da década de 1990, diversos trabalhos científicos têm demonstrado o potencial antitumoral do fruto de *Morinda citrifolia* L. (HIRAZUMI; FURUSAWA, 1999; WANG; SU, 2001; LIU *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; FURUZAWA *et al.*, 2003; LI *et al.* 2008; LI *et al.*, 2013; CLAFSHENKEL *et al.*, 2012). Assim, muitos consumidores buscam no noni um tratamento alternativo para o câncer e optam pelo suco puro ou em combinação com outros sucos de frutas, como o de uva.

A atividade anticâncer de *Morinda citrifolia* foi investigada pela primeira vez por Hirazumi *et al.* (1994) em um modelo de carcinoma pulmonar em camundongos. Os resultados mostraram que a administração terapêutica de uma fração rica em polissacarídeos extraída do fruto de *M. citrifolia* (Noni-ppt) foi capaz de prolongar o tempo de sobrevivência dos animais. Desde então, diversos pesquisadores têm demonstrado que o suco fermentado ou seus componentes exercem efeito preventivo e terapêutico contra o câncer.

Em 2003, o efeito antitumoral do Noni-ppt foi reportado por Furuzawa *et al.* em um modelo experimental de tumor ascítico do Sarcoma 180. Os resultados de seus ensaios mostraram que o Noni-ppt administrado por via intraperitoneal na dosagem de 0,5 mg/camundongo/dia foi capaz de produzir a total regressão de tumores em 25 a 45% dos camundongos alógênicos. A fim de avaliar a atividade antitumoral do Noni-ppt em um modelo mais adequado e mais próximo a realidade, o Noni-ppt 3 (25 e 50 mg/kg/dia) foi administrado pelas vias intraperitoneal e oral durante sete dias consecutivos em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180 na forma sólida.

No presente trabalho, o purê de noni foi obtido logo após o amadurecimento dos frutos. Em contrapartida, no processo de extração do Noni-ppt adotado tanto por Hirazumi e Furusawa (1999) como por Furazawa *et al.* (2003), os frutos colhidos no Hawaii foram deixados amadurecer até que adquirissem uma consistência macia e, posteriormente, foram armazenados em um recipiente estéril protegido da luz solar por um período de 1 a 3 dias a fim de que o suco fosse naturalmente separado da polpa da fruta. De acordo com Bui, Bacic e Pettolino (2006) e Correia *et al.* (2011), a fração insolúvel em álcool do suco de *Morinda citrifolia* é constituída predominantemente por polissacarídeos pécticos. Estudos sobre o metabolismo da parede celular durante o amadurecimento dos frutos indicam que este é um processo ordenado, envolvendo o relaxamento da parede celular e a degradação de hemicelulose nos estágios iniciais e, posteriormente, a despolimerização da pectina. O aumento da solubilidade dos polissacarídeos pécticos é uma das características indiscutivelmente associadas ao amadurecimento de frutas. Os mecanismos que contribuem nesse processo não estão completamente esclarecidos e sua magnitude varia acentuadamente entre diferentes frutas. Os radicais livres produzidos por meios enzimáticos ou químicos podem participar da hidrólise de pectinas (HUBER; KARAKURT; JEONG, 2001). Dessa forma, é provável que Noni-ppt avaliado no presente estudo apresente uma composição diferente daquele extraído pelos referidos pesquisadores.

Por outro lado, Li *et al.* (2008) demonstraram que a administração intraperitoneal do suco de noni fermentado (fNE) foi capaz de prevenir e de erradicar em mais de 85% o aparecimento do Sarcoma 180 em sua forma ascítica em camundongos. Os autores da pesquisa não descartaram a possibilidade da atividade antitumoral do fNE estar relacionada à presença de contaminantes bacterianos. Em 2013, Li *et al.* investigaram a atividade antitumoral de duas diferentes frações do fNE frente ao mesmo modelo experimental. Os resultados dos ensaios *in vivo* mostraram que a administração i.p. da fração n-butanol do fNE foi capaz de prevenir em 100% o aparecimento do tumor e de erradicar 75% dos tumores já existentes, proporcionando uma resposta imune mais forte do que aquela estimulada pelo próprio fNE. A administração profilática da fração acetato de etila não foi capaz de prevenir o aparecimento do tumor, sugerindo que os compostos ativos estariam presentes unicamente na fração alcoólica do fNE. Uma vez que os polissacarídeos contidos no Noni-ppt são insolúveis em n-butanol, pode-se inferir que existem outros compostos no suco fermentado de *Morinda citrifolia* associados à atividade antitumoral da espécie.

No presente estudo, verificou-se que o Noni-ppt 3 obtido a partir do fruto não fermentado de *Morinda citrifolia* não foi capaz de reduzir o crescimento da massa tumoral em

relação ao controle negativo em nenhuma das vias de administração testadas, sugerindo que as propriedades anticâncer do suco estariam relacionadas ao tempo de amadurecimento dos frutos empregados e/ou ao processo de fermentação adotado para obtenção do mesmo.

Dessa maneira, há necessidade de realização de novos estudos que possam auxiliar na identificação dos compostos presentes no fruto de *M. citrifolia* responsáveis por sua já comprovada atividade antitumoral.

5 CONCLUSÃO

O Noni-ppt 1 obtido no presente trabalho representa 9,3% do purê seco de *Morinda citrifolia*, enquanto que o Noni-ppt 3 e o Noni-ppt 5 correspondem, respectivamente, a 6,6% e 5% deste.

Através da análise termogravimétrica foi possível verificar que todas as amostras de Noni-ppt apresentam três eventos de perda de massa correspondentes à sua decomposição térmica. O Noni-ppt é constituído por proteínas e por um heteropolissacarídeo formado predominantemente por ácido galacturônico, galactose, arabinose e ramnose. O teor de proteína das amostras de Noni-ppt 1, 3 e 5 foi de 12,1%, 13,6% e 13,7%, respectivamente.

Os resultados do teste *in vitro* demonstraram que as amostras de Noni-ppt não apresentam nenhuma atividade citotóxica direta sobre as células tumorais na concentração testada (50 µg/mL). A avaliação da atividade antitumoral do Noni-ppt 3 (25 e 50 mg/kg/dia) obtido a partir do fruto não fermentado de *Morinda citrifolia* em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 não evidenciou nenhuma redução da massa tumoral nas vias de administração testadas. A ausência da atividade antitumoral observada no presente trabalho, diferentemente daquela relatada na literatura, pode estar associada ao estágio de maturação dos frutos empregados e/ou às diferenças na composição química do Noni-ppt decorrentes das distintas condições edafoclimáticas dos locais de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. The LC Handbook. Guide to LC columns and method development. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/24184%20Agilent.pdf>>. Acesso em 26 jan. 2013.
- AGRAWAL, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.
- AHMAD, S.; SHEEBA; ALI, A.; RAI, K. B. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice against the aflatoxinB1-induced genotoxicity in human peripheral lymphocytes *in vitro*. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 228-234, 2012.
- ARÊAS, E. P. G.; KAWANO, Y. Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. **Química Nova**, v. 14, n. 1, p. 31-43, 1991.
- ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? Bull. W. H. O., Geneva, v.79, n.7, p.691-692, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin>>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE VENDAS DIRETAS (ABEVD). **Cresce a venda em domicílio**. Disponível em: <http://www.abevd.org.br>. Acesso em: 12 jul. 2013.
- BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 1447-1457, 2009.
- BARROS, S. P. N. **Caracterização química e bioquímica da polpa e produtos de noni (*Morinda citrifolia* L.)**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- BASAR, S.; UHLENHUT, K.; HÖGGER, P.; SCHÖNE, F.; WESTENDORF, J. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.
- BASAR, S.; WESTENDORF, J. Mineral and trace element concentrations in *Morinda citrifolia* L. (Noni) Leaf, Fruit and Fruit Juice. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1176-1188, 2012.
- BRASIL. Resolução - RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2003.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 9, de 29 de abril de 2004.
- _____. Informe técnico nº 25, de 29 de maio de 2007.

_____. Ministério da Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2013.

_____. Ministério da Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BOUZOUITA, N.; KHADI, A.; ZGOULLI, S.; CHEBIL, L.; CHEKKI, R.; CHAABOUNI, M. M.; THONART, P. The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1508-1515, 2007.

BROWN, A. C. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit: a review. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1427-1440, 2012.

BRUMMER, Y; CUI, W.; WANG, Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 229-236, 2003.

BUI, A. K.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1271-1275, 2006.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CAO, Q.; LIN, Z. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptides. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p. 833-838, 2004.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 645-654, 2006.

CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate Analysis – A Practical Approach**, 2. ed., Oxford: IRL Press, 1994.

CHEN, C. H.; LIN, T. P.; CHUNG, Y. L.; LEE, C. K.; YEH, D. B.; CHEN, S. Y. Determination of antioxidative properties of *Morinda citrifolia* using near supercritical fluid extraction. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, n. 5, p. 333-341, 2009.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, (an Edible Mushroom). **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CHUNHIENG, T.; HAY, L.; MONTET, D. Detailed study of the juice composition of noni (*Morinda citrifolia*) fruits from Cambodia. **Fruits**, v. 60, p. 13-24, 2005.

CLAFSHENKEL, W. P.; KING, T. L.; KOTLARCZYK, M. P.; CLINE, J. M.; FOSTER, W. G., DAVIS, V. L.; WITT-ENDERBY, P. A. *Morinda citrifolia* (noni) juice augments mammary gland differentiation and reduces mammary tumor growth in mice expressing the unactivated c-erbB2 transgene. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

COMERCIALIZAÇÃO DO SUCO NONI ESTÁ PROIBIDA NO BRASIL, 2009. Disponível em: <<http://www.noni.siteonline.com.br/interna.jsp?lnk=42204>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

COMISSÃO EUROPEIA. Perícia do Comitê Científico para Alimentação em relação ao suco Tahitian Noni ®, 2002. Disponível em:
<https://nonioffice.com/sfs/uc/4998339261/br_portuguese/Comiss_o_europeia.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2014.

CORREIA, A. A. S.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 4, p. 609-615, 2011.

CORREIA, A. A. S. **Maceração enzimática da polpa de noni (*Morinda citrifolia* L.)**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Centro de Ciências Agrárias da Universidade de Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

COSTA, L. L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J. Antineoplastics agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 9, p. 1-15, 2000.

DANTAS, E. L. R.; SÁ, F. H. L.; CARVALHO, S. M. F.; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, E. M.; Genética do cancer hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 263-269, 2009.

DENG, Y.; CHIN, Y.; CHAI, H.; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. Anthraquinones with quinone reductase-inducing activity and benzophenones from *Morinda citrifolia* (Noni) roots. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2049-2052, 2007a.

DENG, S.; PALU, A. K.; WEST, B. J.; SU, C. X.; ZHOU, B. N.; JENSEN, J. C. Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 859-862, 2007b.

DENG, S.; WEST, B. J.; PALU, A. K.; JENSEN, J. C. Determination and comparative analysis of major iridoids in different parts and cultivation sources of *Morinda citrifolia*. **Phytochemical analysis**, v. 22, p. 26-30, 2011.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - Tratamento e acompanhamento do *Diabetes mellitus*, 2006. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/diretrizes.pdf>>. Acesso em: 4 set. 2012.

DIXON, A.R., McMILLEN, H., ETKIN, N. L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Ecological Botany**, v. 53, p. 51-68, 1999.

DUSSOSSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 108-115, 2011.

EDWARD, J.T. Stability of Glycosides to Acid Hydrolysis. **Chemistry and Industry**, p.1102-1104, 1955.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária à saúde. São Paulo: Manole, 2001.

EREMEEVA, T. Size-exclusion chromatography of enzymatically treated cellulose and related polysaccharides: a review. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 56, p. 253-264, 2003.

EUROPEAN COMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Commission Decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of “noni juice” as a novel food ingredient under Regulation (EC) N° 258/97 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, 2003.

EUROPEAN COMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Commission Decision of 21 April 2010 authorising the placing on the market of puree and concentrate of the fruits of *Morinda citrifolia* as a novel food ingredient under Regulation (EC) N° 258/97 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, 2010.

FARINE, J. P.; LEGAL, L., MORETEAU, B., LE QUERE, J. L. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 433-438, 1996.

FURUE, H., KITOH, I. Phase III - Study on Lentinan. **Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy**, v. 8, p. 944-960, 1981.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumor potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma

- 180 ascites tumout in mice. **Phytotherapy Research.**, v.13, p. 1158-1164, 2003.
- GARRETT, M.D.; WORKMAN, P. Discovering Novel Chemotherapeutic Drugs for the Third Millennium. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 14, p. 2010-2030, 1999.
- GUPTA, R. K.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; SHARMA, C.; SINGH, N. Induction of Mitochondrial-Mediated Apoptosis by *Morinda citrifolia* (Noni) in Human Cervical Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 237-242, 2013.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer - Review. **Cell**, v. 100, p. 57-70, January 7, 2000.
- HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E.; CHOU, S. C.; HOKAMA, Y. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 37, p. 145-146, 1994.
- HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. **Phytotherapy Research.**, v. 13, n. 5, p. 380-387, 1999.
- HORSFALL, A. U.; OLABIYI, O.; AIYEBUSI, A.; NORONHA, C. C.; OKANLAWON, A. O. *Morinda citrifolia* fruit juice augments insulin action in Sprague-Dawley rats with experimentally induced diabetes. **Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine**, v. 18, n. 3, p. 162-165, 2008.
- HORNICK, C. A.; MYERS, A.; SADOWSKA-KROWICKA, H.; ANTHONY, C. T.; WOLTERING, E. A. Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (noni). **Angiogenesis**, v. 6, p. 143-149, 2003.
- HUBER, D. J.; KARAKURT, Y.; JEONG, J. Pectin degradation in ripening and wounded fruits. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 224-241, 2001.
- INA, K.; FURUTA, R.; KATAOKA, T.; KAYUKAWA, S.; YOSHIDA, T.; MIWA, T.; YAMAMURA, Y.; TAKEUCHI, Y. Lentinan prolonged survival in patients with gastric cancer receiving S-1-based chemotherapy. **World Journal of Clinical Oncology**, p. 339-343, 2011.
- ISSELL, B. F.; GOTAY, C.; PAGANO, I.; FRANKE, A. Quality of life measures in a phase I trial of noni. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16, 2005.
- ITO, K.; NAKAZATO, H.; KOIBE, A.; TAKAGI, H.; SAJI, S.; BABA, S.; MAI, M.; SAKAMOTO, J.; OHASHI, Y. Long-term effect of 5-fluorouracil enhanced by intermittent administration of polysaccharide K after curative resection of colon cancer. A randomized controlled trial for 7 year followup. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 19, p. 157-164, 2004.
- JUNGLES, T. M. C. **Caracterização da estrutura química e avaliação da atividade antiúlcera de polissacarídeos extraídos da ameixa seca (*Prunus domestica*)**. 2013. 91f.

Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2013.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p. 161-165, 2005.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. New anthraquinone and iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1597-1599, 2005.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. **Bioactive carbohydrates**. Inglaterra: Elis Horwood, 1983.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 1, p. 4-27, 2000.

KIMURA, Y.; MIZUNO, H.; SATAKE, K.; TAHARA, H.; TSUKUDA, M. Clinical evaluation of Sizofilan an assistant immunotherapy in treatment of head and neck cancer. **Acta Otolaryngology**, v. 511, p. 192-195, 1994.

KOBAYASHI, H.; MATSUNAGA, K., FUJII, M. PSK as a chemopreventive agent. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 2, p. 271-276, 1993.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS & COTRAN. **Pathology Basis of Disease**, 7. ed., China: WB Saunders, 2004.

KUNIHIRO, O. M. D.; MASAKUNI, S. M. D; AKIRA, Y. M. D.; TSUTOMU, C. M. D; ATSUSHI, F. M. D; TORU, F. M. D.; SHIRO, G. M. D.; KIHYOE, I. M. D.; SHOJI, J. M. D.; TATSUHIRO, K. M. D.; NOBUHIDE, K. M. D; KOJI, M. M. D.; SOEI, M. M. D., HITOO, N. M. D.; KIICHIRO, N. M. D.; KAORU, S. M. D; KEIGO, S. M. D., TADAO S. M. D.; KATSUYUKI, T. M. D; KUNIO, T. M. D; SHOSHICHI, T. M. D.; NOBUYA O. M. D. Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer: A randomized controlled study. **Cancer**, v. 58, p. 865-872, 1986.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**, 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101-114, 2006.

LI, R. W.; MYERS, S. P.; LEACH, D. N.; LIN, G. D.; LEACH, G.. A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 25-32, 2003.

LI, J.; STICKEL, S. L.; BOUTON-VERVILLE, H.; BURGIN, K. E.; YU, X.; WONG, D. K.W.; WAGNER, T. E.; WEI, Y. Fermented Noni Exudate (fNE): A mediator between immune system and anti-tumor activity. **Oncology Reports**, v. 20, p. 1505-1509, 2008.

- LI, J.; CHANG, L.; WALL, M.; WONG, D. K. W.; YU, X.; WEI, Y. Antitumor activity of fermented noni exudates and its fractions. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 1, p. 161-164, 2013.
- LIMA, B. V.; MARQUESI, N. N.; CARDOSO, O. R.; ARAÚJO, R. M.; VIDAL, R. R. L.; BALADAM, R. C. Caracterização estrutural e morfológica de polímeros termossensíveis. In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013, Florianópolis.
- LIN, C. F.; NI, C. L.; HUANG, Y. L.; SHEU, S. J.; CHEN, C. C. Lignans and anthraquinones from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Natural Product Research**, v. 21, p. 1199-1204, 2007.
- LINDSAY, C.; GOLDEN, K. D. *Morinda citrifolia*: Amino Acid and Lipid Content of the Noni Fruit at Various Stages of Maturity. **Journal of Scientific Research**, v. 4, p. 467-476, 2012.
- LIU, F.; OOIB V. E. C.; FUNG, M. C. Analysis of immunomodulating cytokine mrnas in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1005-1011, 1999.
- LIU, G.; BODE, A.; MA, W.; SANG, S.; HO, C.; DONG, Z. Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. **Cancer Research**, v. 61, p. 5749-5756, 2001.
- LOTUFO, L. C.; MONTENEGRO, V. R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Edições UFC, 2007, 320p.
- MAHATTANADUL, S.; RIDTITID, W.; NIMA, S.; PHDOONGSOMBUT, N.; RATANASUWON, P.; KASIWONG, S. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 243-250, 2011.
- McCLATHEY, 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.
- McKOY, M. G.; THOMAS, E. A.; SIMON, O. R. Preliminary Investigation of the Anti-Inflammatory Properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (Noni). **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 76-78, 2002.
- MITOMI, T.; TSUCHIYA, S.; IIJIMA, N.; ASO, K.; SUZUKI, K., NISHIYAMA, K., AMANO, T., TAKAHASHI, T., MURAYAMA, N., OKA, H., et al. Randomized controlled

study on adjuvant immunochemotherapy with PSK in curatively resected colorectal cancer. The Cooperative Study Group of Surgical Adjuvant Immunochemotherapy for Cancer of Colon and Rectum. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 16, p. 2241-2249, 1989.

MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MORINDA BIOACTIVES, 2012. Disponível em: <<http://morinda.com/en-us/company>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v 16, p. 55-63, 1983.

MULLER, J. C. **Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn.** 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Setor de Ciências Biológicas, Universidade de Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NACHTIGAL, G. C. **Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Comportamento). Centro de Ciências da saúde da Universidade Católica de Pelotas, 2011.

NAKAZATO, H.; KOIBE, A.; SAJI, S.; OGAWA, N.; SAKAMOTO, J. Efficacy of immunotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. **The Lancet**, v. 343, p. 1122-1126, 1994.

NASCIMENTO, L. C. S. **Caracterização centesimal, composição química e atividade antioxidante do noni (*Morinda Citrifolia* L.) cultivado no município de Zé Doca-MA.** 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G.; ADOGWA, A. Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. **Evidence-Based Complement Alternative Medicine**, 2011.

OLIVEIRA, J. D. **Goma exsudada da *Enterolobium contortisiliquum* – Aspectos físico-químico e estruturais.** 1988. 97f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica). Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, 1998.

OOI, V. E.; LIU, F.; Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 715-729, 2000.

PAULA, R. C. M. **Goma do *Anacardium occidentale* L.: isolamento, caracterização e estudo reológico.** 1990. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, 1990.

PAULA, R. C. M. **Characterization of Brazilian Tree Exudate gums from *Anacardium Occidentale* L. and *Anadenathera Macrocarpa* B.** 1995. Tese (Doutorado em Ciências). Departamento de Química, University of Manchester, 1995.

- PAWLUS, A. D.; KINGHORN, A. D. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Pharmacy Pharmacology**. v. 59, p 1587-1609, 2007.
- PETERSEN, B. O.; MEIER, S.; DUUS, J. O.; CLAUSEN, M. H. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 16, p. 2830-2833, 2008.
- PINO, J. A.; MARQUEZ, E.; QUIJANO, C. E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 183-187, 2010.
- RAM, J. Noni processing and quality control: protecting the image of Hawaiian products. Proceedings of the 2002 Hawai‘i Noni Conference. University of Hawaii at Manoa: College of Tropical Agriculture and Human Resources, p. 25-28, 2003.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RETHINAM, P.; SIVARAMAN, K. Noni (*Morinda citrifolia* L.) - the miracle fruit - a holistic review. **International Journal of Noni Research**, v. 2, p. 4-37, 2007.
- RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. 2013. 122f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade de Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- RIVERA, A.; GONO, S.; GONZALEZ, M., RODRIGUEZ, N.; CEDILLO, L. Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. **Annals of Biological Research**, v. 2, p. 491-497, 2011.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.
- RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 31-36, 1993.
- SALUDES, J. P.; GARSON, M. J. FRANZBLAU, S. G. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 683-685, oct., 2002.
- SCOT, N. C. *Morinda citrifolia* (noni). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Hōlualoa, Hawaii, 2006.
- SCOT, N. C. Noni cultivation and production in Hawai‘i. Hawai‘i Noni Conference, University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, 2003.
- SCOT, N. C.; CRAIG, E. R. **Workshop manual to supplement Noni: The Complete Guide for Consumers and Growers for Noni Processing, Marketing, and Field Training Workshop for YAP**. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawaii, 2006.

SHOVIC, A. C.; WHISTLER, W. A. Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. **Tropical Science**, v. 41, p. 199-202, 2001.

SILVA, L. R.; MEDEIROS, P. V. Q.; LEITE, G. A.; SILVA, K. J. P.; MENDONÇA, V.; SILVA, G. G. Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, p. 93-100, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; LILIAN, A. M.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SRIVASTAVA, M.; SINGH, J. A new anthraquinone glycoside from *Morinda citrifolia*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, p. 182-184, 1993.

STRIEGEL, A. M.; YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J.; BLY, D. D. **Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography- Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography**, 2. ed. Hoboken. N. J. (2009).

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. v. 1, 9. ed., LTC, 2009.

SOUSA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C; MORAES, M. O.; FILHO, F. D. R.; ALVES, A. P. N. N.; LOTUFO, L. V. C. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 7-13, 2007.

SOUZA, C. F. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. 2009. 113f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

STRIEGEL, A. M.; YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J.; BLY, D. D. **Modern size-exclusion liquid chromatography- practice of gel permeation and gel filtration chromatography**, 2. ed., New Jersey: Hoboken, 2009.

SU, C.; WANG, M. Y.; NOWICKI, D.; JENSEN, J.; ANDERSON, G. Selective COX-2 inhibition of *Morinda citrifolia* (Noni) *in vitro*. **The proceedings of the Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Disease**. The 7th Annual Conference, Tennessee, USA, 2001.

SU, B.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H.; KELLER, W. J.; MCLAUGHLIN, J. L.; KINGHORN, A. D. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. **Journal of Natural Products**. v. 68, p. 592-595, 2005.

TAGUCHI, T. Clinical efficacy of lentinan on patients with stomach cancer: end point results of a four-year follow-up survey. **Cancer Detection Prevention Supplement**, p. 333-349, 1987.

- TAKASHIMA, J.; IKEDA, Y.; KOMIYAMA, K.; HAYASHI, M.; KISHIDA, A.; AHSAKI, A. New constituents from the leaves of *Morinda citrifolia*. **Chemical Plants Bulletin**, v. 55, p. 343-345, 2007.
- TIWARI, R.D.; SINGH, J. Structural study of the anthraquinone glycoside from the flowers of *Morinda citrifolia*. **Journal Indian Chemistry Society**, v. 54, p. 429-430, 1977.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 42, n. 2, n. 289-306, 2006.
- USHA, R.; SASHIDHARAN, S.; PALANISWAMY, M. Antimicrobial activity of a rarely known species, *Morinda citrifolia* L. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 14, p. 306-311, 2010.
- VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENDACOLLI, S. L. J.; TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A. Noni: Frutífera medicinal em introdução e aclimatação no Brasil. **O Agronômico**, Campinas, v. 57, n.1, p. 20-21, 2005.
- VRIESMANN, L. C. **Pectinas da casca do fruto do cacau (*Theobroma cacao* L.): otimização da extração e caracterização**. 2013. 172f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2012.
- WANG, M.; KIKUZAKI, H.; CSISZAR, K.; BOYD, C. D.; MAUNAKEA, A.; FONG, S. F.; GHAI, G.; ROSEN, R. T.; NAKATANI, N.; HO, C. T. Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4880-4882, 1999.
- WANG, M.; KIKUZAKI, H.; JIN, Y.; NAKATANI, N.; ZHU, N.; CSISZAR, K.; BOYD C.; ROSEN, R. T.; GHAI, G.; HO, CHI-TANG. Novel Glycosides from Noni (*Morinda citrifolia*). **Journal of Natural Products**, n. 63, p. 1182-1183, 2000.
- WANG, M. Y.; ANDERSON, G.; NOWICKI, D.; JENSEN, J. Protective effect of *Morinda citrifolia* in carbontetrachloride induced liver injury model: A light and electron microscopic study. **The proceedings of the Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammatory and Related Diseases**. The 7th Annual Conference, Tennessee, USA, 2001.
- WANG, M. Y.; SU, C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, p. 161-168, 2001.
- WANG, M.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A. K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, p. 1127-1141, 2002.
- WEI, G. J.; HO, C. T.; HUANG, A. S. Analysis of volatile compounds in noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) juice by team distillation-extraction and solid phase microextraction coupled with GC/AED and GC/MS. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, p. 33-39, 2011.
- WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J.; WHITE, L. D. A safety review of noni fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 100-106, 2006.

WHO. Traditional medicine strategy 2002–2005. Disponível em: <whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2014.

WHO. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva: WHO, 45. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/whozip57e/whozip57e.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2014.

YANG, Q.Y.; JONG, S.; LI, X.Y.; ZHOU, J.X.; CHEN, R.T.; XU, L.Z. Antitumor and immunomodulating activities of the polysaccharide-peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. - **Journal of Immunology & ImmunoPharmacology**, v. 12, p. 29-34, 1992.

YOUNOS, C.; ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Medica**, v. 56, p. 430-434, 1990.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, p. 227-231, 2002.

ZHANG, X.; LI, J.; WONG, D. K.; WAGNER, T. E.; WEI, Y. Fermented Noni Exudate-treated dendritic cells directly stimulate B lymphocyte proliferation and differentiation. **Oncology Reports**, v. 21, p. 1147-1152, 2009.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395-1410, 2012.