

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

DAVID TEIXEIRA GUIDOTI

**Isolamento químico e avaliação de bioatividade de frações do fruto de noni
(*Morinda citrifolia* L.)**

MARINGÁ
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

DAVID TEIXEIRA GUIDOTI

**Isolamento químico e avaliação de bioatividade de frações do fruto de noni
(*Morinda citrifolia* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha

MARINGÁ
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

G948i

Guidoti, David Teixeira
Isolamento químico e avaliação de bioatividade de frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) / David Teixeira Guidoti. -- Maringá, 2015.
117 f. : il. color., figs., tabs. + anexos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2015.

1. Noni (*Morinda citrifolia* L.) - Nutracêuticos - Compostos Bioativos. 2. Isoescopoletina. 3. Cumarina. 4. Anticâncer. 5. Antimutagênido 6. Antigenotóxico. 7. *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans* (Fungo) - Mutação genética - Germinação. I. Rocha, Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 21.ed. 579.135

MN-002059

FOLHA DE APROVAÇÃO

DAVID TEIXEIRA GUIDOTI

Isolamento químico e avaliação de bioatividade de frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Adriana Gonela
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Káthia Socorro Mathias Mourão
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Lilian Düsman Tonin
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Alessandra Paim Berti
Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul

Aprovada em: 31 de julho de 2015.

Local de defesa: Sala 202, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho a todos que amam fazer ciência e são apaixonados por pesquisar, não medindo esforços na constante busca pela cura e melhores tratamentos no combate ao câncer. E ainda, aqueles que não se entregam, mas lutam pelo direito de vida, sonhando e cumprindo seu propósito de vivê-la e desfrutá-la com alegria, pela abundante graça e misericórdia de Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em essência trina na pessoa do Pai, do Filho e do Espírito Santo, pois é o motivo, razão, essência e inspiração para tudo o que faço ou venha fazer. Obrigado pelo dom da vida, pelo cuidado, por tanta graça, amor, paciência e misericórdia. Tudo que tenho, tudo o que sou, e o que vier a ser, entrego a ti Senhor. Seja tudo em mim! A Deus seja dada toda a honra, glória e todo o louvor.

À minha amada esposa Daniela, por ser canal de Deus em minha vida, pela cumplicidade e por todo seu legado. O cerne desta obra foi fundamentado com sua expressiva participação e a leitura de cada linha exala os doces aromas de suas preciosas contribuições. Obrigado por ser minha melhor parte e por escrever minha história com palavras de amor.

Aos meus amados pais, Célia e Egídio, pela vida, cuidado, amor e apoio durante a escalada, cujo percurso é penoso, mas a vista do cume é mais que recompensadora, tirou meu fôlego! A construção familiar é a pedra fundamental de todo indivíduo e eu agradeço a Deus porque a base de minha família está na rocha de Cristo.

Aos meus segundos pais, Vera e Donizete e ao meu irmão, Adriano, pessoas que tanto amo e entraram em minha vida como propósito de Deus, me acolheram em amor e em amor, agradeço por constituírem parte da minha família e da história da minha jornada. Que o amor de Deus e as doces consolações do Espírito Santo estejam sobre vocês, hoje e sempre.

À Comunidade Evangélica de Maringá, pastora Irene Ribaroli, pastores Beto e Daniela e a toda equipe do ministério de louvor, líderes Rose Mary e André Bereta, nosso eterno maestro. O apoio, orações e contribuições de todos vocês foram fundamentais para nossa adaptação, estadia e crescimento espiritual. Foi uma honra e um indescritível prazer ter voado acima dos ventos ao lado de pessoas tão especiais, das quais sempre sentirei doces saudades.

À minha orientadora, professora doutora Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso Rocha, que com seus preciosos conhecimentos sobre a biologia do *Aspergillus* e todo o carinho demonstrado pelas técnicas laboratoriais me serviram como exemplo, base e muito contribuiu para minha formação. Agradeço ainda, pelos cuidados atentos durante todo o percurso acadêmico e minha trajetória em Maringá. Que a graça, o amor e misericórdia do Senhor Jesus Cristo sejam sobremaneira derramadas em ti e em toda sua família.

Ao professor Adriano Lopes Romero, um grande amigo e verdadeiro co-orientador. Suas contribuições na área da química de produtos naturais foram fundamentais para sustentar o progresso da tese. Obrigado por me mostrar o horizonte da fitoquímica, seus vieses e potenciais aplicações na ciência contemporânea. Obrigado por todo suporte em Campo Mourão

e por sua contínua prestatividade de forma tão sólida e, ao mesmo tempo, com gestos tão humildes.

À Rafaelle Romero, esposa do professor Adriano e sua filha Beatriz, por dividirem o tempo do esposo e pai e por me acolherem em Campo Mourão. Deus os abençoe com bênçãos sem fim. E ainda, à toda equipe do Laboratório de Química Orgânica e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, Paraná, pelo apoio técnico durante parte da pesquisa realizada.

À Mary Ann Foglio, Ana Lúcia Ruiz, equipe laboratorial e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas, Paulínia, São Paulo, que aceitaram o desafio de investigar os potenciais anticancerígenos do fruto de noni e, por proporcionarem meios para os tais, contribuindo significativamente para o cumprimento dos objetivos do presente trabalho.

À professora doutora Maria João Silva e sua aluna Mariana Pinhão, que mesmo sem me conhecer, abraçaram o sonho desta tese e não mediram esforços ao se dispor na realização dos testes de citogenotoxicidade, fundamentais para alcançar os objetivos do presente trabalho. Agradeço ainda, ao Departamento de Genética Humana da Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Divisão de Toxicologia Genética, do Instituto de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, por todo o suporte técnico.

À Marcia Helena Leonel e família, secretária do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, que através de sua amizade ajudou a mim e minha esposa, sem medir esforços das mais diversas formas possíveis. Obrigado por todo apoio, carinho, amizade e prestatividade. Deus te recompense com bênçãos das quais nem poderás contar.

Aos colegas Fábio, Priscila, Suelen, Luciana, Amanda e Alessandra, do Laboratório de Genética Molecular e do Desenvolvimento do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. Desde o início foram fundamentais na construção da caminhada acadêmica, nas aulas, trabalhos, discussões, pesquisas laboratoriais e nos momentos preciosos de comunhão.

Aos técnicos Marli e Donizete, ao Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular e Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, pelo apoio técnico durante a realização de parte da pesquisa.

Ao senhor Paulo Cezar Batista, proprietário do sítio São José, município de Urânia, São Paulo, pela gentil doação dos frutos de noni para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, coordenadora professora doutora Rosilaine Carrenho, coordenadora ajunta, professora doutora Lindamir Hernandez Pastorini, secretária Maria Estela Afonso e a todo corpo docente, por terem contribuído com minha formação acadêmica-profissional e pelos tantos conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em avaliar o presente trabalho e pelas valiosas contribuições e, também, à CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado.

“I still believe in Your faithfulness
I still believe in Your true
I still believe in Your holy word
Even when I don't see. I still believe”

(JEREMY CAMP)

Isolamento químico e avaliação de bioatividade de frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.)

RESUMO

Morinda citrifolia (Rubiaceae), popularmente conhecido como noni, é encontrado desde regiões tropicais do Centro Sul Africano, até o Caribe, Austrália, China, Malásia, Indonésia, Índia, América do Norte e América do Sul. Essa planta vem sendo utilizada há mais de dois mil anos pela tradicional medicina popular, por suas propriedades terapêuticas e nutricionais. Isso se deve à presença de compostos bioativos, tais como a escopoletina, um composto fenólico derivado de cumarina, que controla o nível de serotonina no organismo, possui atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa e pró-apoptótica. O objetivo do presente trabalho foi identificar frações do fruto de noni, como fontes potenciais de quimiopreventivos, por meio do isolamento de compostos bioativos e o estudo bioguiado de citogenotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade, realizados em cultura de células normais e tumorais humanas e no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. As concentrações utilizadas variaram de 0 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluídas em dimetilsulfóxido. A partir da fração acetato de etila foi feito o isolamento de um composto por cromatografia em camada delgada, que foi identificado por meio de ressonância magnética nuclear, como sendo a isoescopoletina. O extrato bruto etanólico e as frações acetato de etila e n-hexânica exibiram efeito antiproliferativo contra linhagens celulares-tumorais humanas, podendo ser utilizadas com segurança em baixas concentrações. A fração acetato de etila não foi citogenotóxica para células HepG2, nem citotóxica para *A. nidulans* e mostrou efeito antimutagênico em todas as concentrações e pró-apoptótico nas concentrações 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nos tempos e tipos de tratamento empregados. Por outro lado, a fração n-hexânica induziu a proliferação de células HepG2, após 48 horas de exposição e mostrou efeito genotóxico nas maiores concentrações. Os resultados apresentados contribuem para a elucidação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dessas frações e na identificação preliminar de extratos complexos com atividade protetora do material genético, subsidiando a formulação de fitoterápicos, profiláticos e futuros estudos de identificação de compostos quimiopreventivos.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Isoescopoletina. Citogenotoxicidade. Mutagenicidade. Antimutagenicidade. Atividade pró-apoptótica.

Chemical isolation and assessment of bioactivity of fractions of the fruit of the noni (*Morinda citrifolia* L.)

ABSTRACT

Morinda citrifolia (Rubiaceae), popularly known as noni, is distributed in the tropical regions of Central and Southern Africa and throughout the Caribbean islands, Australia, China, Malaysia, Indonesia, India and North and South America. The plant has been used for more than two thousand years as folk medicine due to its therapeutic and nutritional qualities. The plant has several bioactive compounds, such as scopoletin, a phenolic compound derived from coumarin, which controls serotonin levels in the organism, with anti-inflammatory, antioxidant, anti-proliferation and pro-apoptotic activities. The objective of this current assay was to identify fractions of the noni fruit as potential chemoprevention sources by isolating bioactive compounds and by bio-guide study of cytogenotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity performed in the culture of human normal and tumor cells and in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Concentrations varied between 0 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluted in dimethyl sulfoxide. The isolation of a compound was performed from the fraction ethyl acetate by thin layer chromatography, identified as isoscooletin by nuclear magnetic resonance. Crude ethanol extract and ethyl acetate and n-hexane fractions revealed an anti-proliferation effect against human cell-tumor strains, which may be safely employed at low concentrations. The ethyl acetate fraction was not cytogenotoxic for HepG2 cells nor cytotoxic for *A. nidulans*, but had an antimutagenic effect in all concentrations and it was also pro-apoptotic at concentrations 25 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ at the times and types of treatment employed. On the other hand, n-hexane fraction triggered the proliferation of HepG2 cells after a 48h exposure and had a genotoxic effect at higher concentrations. Results are relevant for the elucidation of the cytotoxic and genotoxic effects of the fractions and in the preliminary identification of complex extracts as a protecting activity of genetic material as a supplement in the preparation of phytotherapeutic and prophylactic drugs and in future studies to identify chemoprevention compounds.

Keywords: Bioactive compounds. Isoscooletin. Cytogenotoxicity. Mutagenicity. Antimutagenicity. Pro-apoptotic activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	14
Figura 1. Eletromicrografia digitalizada de um conidióforo de <i>Aspergillus nidulans</i> com a nomenclatura das diferentes células especializadas.....	28
Figura 2. Ilustração esquemática do ciclo sexual, ascosporigênese, em <i>Aspergillus nidulans</i>	29
Figura 3. Planta <i>Morinda citrifolia</i> , Havaí: EUA	32
Figura 4. Fruto de noni, <i>Morinda citrifolia</i>	33
Figura 5. As estruturas químicas de subclasses com benzopirona, a estrutura base de cumarina (benzo- α -pirona) [A], e flavonoide (benzo- γ -pirona) estrutura [B].....	37
Figura 6. Estrutura química da escopoletina e da isoescopoletina.....	38
CAPÍTULO 2	54
Figura 1. Estrutura molecular da cumarina isoescopoletina	61
Figura 2. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) da doxorubicina	66
Figura 3. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato bruto etanólico dos frutos de <i>Morinda citrifolia</i> , após 48 de exposição.....	66
Figura 4. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) da fração n-hexânica dos frutos de <i>Morinda citrifolia</i> , após 48 de exposição	67
Figura 5. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) da fração acetato de etila dos frutos de <i>Morinda citrifolia</i> , após 48 de exposição.....	67
CAPÍTULO 3	81
Figura 1. Fases da germinação de conídios de <i>A. nidulans</i> e morfologia de malformados ..	91
Figura 2. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média \pm DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni	93
Figura 3. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média \pm DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni.....	94
Figura 4. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média \pm DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.....	95
Figura 5. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média \pm DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni.....	96

Figura 6. Microfotografias representativas do ensaio do cometa (aumento 200x). A: controle negativo; B: imagem do cometa mostrando a fragmentação do DNA em cauda (fração n-hexânica, 500 µg mL ⁻¹).....	97
Figura 7. Média do número de colônias por placa de <i>A. nidulans</i> , com conídios irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni.....	98
Figura 8. Porcentagem de conídios mortos de <i>A. nidulans</i> , irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni	99
Figura 9. Porcentagem de conídios malformados de <i>A. nidulans</i> , irradiados e não irradiados com UV, seguido de exposição às diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni	100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	14
Tabela 1. Principais características estruturais e exemplos de cada subtipo de cumarina....	38
CAPÍTULO 2	54
Tabela 1. Dados de RMN de ¹ H (300,06 MHz) e de ¹³ C (75,45 MHz), em CDCl ₃ , da cumarina isoescopoletina.....	62
Tabela 2. Concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular (IC ₅₀) de linhagens tumorais e normal humanas tratadas com extrato e frações de frutos de <i>Morinda citrifolia</i>	63
CAPÍTULO 3	81
Tabela 1. Interpretação dos resultados da análise de germinação de conídios de <i>A. nidulans</i>	92
Tabela 2. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.....	93
Tabela 3. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni.....	94
Tabela 4. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.....	95
Tabela 5. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni.....	96
Tabela 6. Média do número de colônias por placa de <i>A. nidulans</i> , a partir de conídios irradiados e não irradiados com UV (média±EPM), seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni.....	98
Tabela 7. Porcentagem de conídios mortos de <i>A. nidulans</i> irradiados e não irradiados com UV (média±EPM), seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni.....	99
Tabela 8. Porcentagem de conídios malformados de <i>A. nidulans</i> irradiados e não irradiados com UV (média±EPM) seguido de exposição às concentrações da fração acetato de etila de noni.....	100

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica.....	17
2.1. Biodiversidade e quimiodiversidade	17
2.2. Compostos bioativos: metabólitos secundários	18
2.3. Fitofármacos e suas aplicações	20
2.4. Nutrigenômica: nutracêuticos e alimentos funcionais	22
2.5. Genética toxicológica de plantas.....	24
2.6. Sistemas teste em genética toxicológica	25
2.7. <i>Aspergillus nidulans</i> como organismo teste.....	27
2.8. Câncer: um distúrbio multifatorial	29
2.9. Noni: características e aplicações.....	31
2.9.1. Características gerais e botânicas	31
2.9.2. Caracterização físico-química do fruto.....	33
2.9.3. Propriedades farmacológicas	34
2.9.4. Compostos isolados do fruto de noni.....	36
CAPÍTULO 2	54
Extrato bruto e frações do fruto de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) inibem a proliferação celular de linhagens tumorais humanas	54
ANEXO 1	72
CAPÍTULO 3	81
Citogenotoxicidade de frações de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) em células de hepatoma humano (HepG2) e antimutagenicidade em <i>Aspergillus nidulans</i>	81
ANEXO 2	107

CAPÍTULO 1
Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Desde o surgimento da vida no planeta, há cerca de 3,5 a 3,8 bilhões de anos atrás (ALMEIDA; BARRETO, 2010), a natureza tem desenvolvido uma enorme biodiversidade ao longo de sua história evolutiva, constituindo uma rica fonte de compostos bioativos, produzidos sob a forma de metabólitos secundários (BERNHOF, 2010), que representam a base para o desenvolvimento de inúmeros fitofármacos, com as mais diversificadas atividades farmacológicas (ALVES, 2001).

Os metabólitos secundários de plantas podem ser agrupados em quatro grandes classes: substâncias fenólicas, terpenos, glicosídeos e alcaloides (BOURGAUD et al., 2001), podendo sofrer oscilações durante o ano dependendo das condições do meio em que a planta está submetida (GLOBBO-NETO; LOPES, 2007). Apesar disso, inúmeros compostos bioativos têm sido isolados a partir de plantas (WINK, 2006).

Morinda citrifolia Linn. (Rubiaceae), conhecida popularmente como noni, é utilizada como planta medicinal há mais de 2.000 anos pelos nativos da Polinésia (WHISTLER, 1985). Além de apresentar amplo valor nutricional (SINGH et al., 1984), todas as partes da planta são utilizadas em preparos medicinais (BRUGGNECATE, 1992). Na medicina popular, o noni é indicado no tratamento de diabetes, hipertensão, infecções, artrite, asma, dores (SANG et al., 2002; CHAN-BLANCO et al., 2006), síndrome da imunodeficiência adquirida, úlceras gástricas, depressão, senilidade, má digestão, aterosclerose e até mesmo câncer (WANG et al., 2002; KAMIYA et al., 2004).

Inúmeros ensaios têm sido realizados e demonstraram a eficácia do noni em diversas situações, como a atividade antimicrobiana (ATKINSON, 1956); antiviral, frente o vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 (KAMATA et al., 2006); antioxidante (MOHD; ABDUL-HAMID; OSMAN, 2001); anti-inflamatória (MCKOY; THOMAS; SIMON, 2002) e antitumoral (HIRAZUMI et al., 1996; HIRAZUMI; FURUSAWA, 1999; WANG et al., 2002; GUPTA et al., 2013), demonstrando que o noni contém vários compostos funcionais e nutricionais (SINGH, 2013).

Os compostos fenólicos representam o maior grupo de compostos bioativos do fruto, incluindo antraquinonas, como o damnacantal e a escopoletina, um derivado de cumarina (WANG; SU, 2001). As cumarinas, da classe dos compostos fenólicos, são derivadas do metabolismo da fenilalanina (YU et al., 2005), desempenham papéis fundamentais na bioquímica e fisiologia da planta, com envolvimento nas ações dos reguladores de crescimento, controle da fotossíntese, além de defesa contra infecção (KOSTOVA, 2006).

A escopoletina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina, um derivado de cumarina, constitui um dos compostos mais representativos do noni (SAMOYLENKO et al., 2006). Sua atividade farmacológica envolve a capacidade de controlar o nível de serotonina no organismo (LEVAND; LARSON, 1979), atividade anti-inflamatória (KANG et al., 1999; KIM et al., 2004; DENG et al., 2007; MOON et al., 2007), antiproliferativa, por meio da indução de apoptose em células tumorais (YU et al., 2008), antioxidante (IKEDA et al., 2009), além do papel no envelhecimento celular, induzindo à autofagia, pela ativação da proteína p53 em fibroblastos de pulmão humano (NAM; KIM, 2015).

Outro composto fenólico, derivado de cumarinas, é a isoescopoletina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, que pode ser empregada como um potencial sequestrante de radicais livres para evitar doenças relacionadas à oxidação (LIU et. al., 2007). Além disso, inibe a proliferação de linhagens celulares de leucemia (CCRF-CEM) e linhagem resistente a múltiplas drogas (CEM/ADR5000) (ADAMS; EFFERTH; BAUER, 2006) e a proliferação do vírus da hepatite B em sistemas celulares (LI et. al., 2005).

A necessidade de investigação do biopotencial de extratos complexos do fruto de noni e a ausência de dados na literatura sobre a presença de substâncias mutagênicas e antimutagênicas nesses extratos, promove uma lacuna que carece de elucidação por meio de ensaios que atestem o emprego da planta de noni como fonte de compostos com importância biotecnológica e medicinal.

Apesar de vários estudos atestarem o potencial medicinal do noni nas suas diferentes formas de utilização, é necessário a realização de estudos que comprovem a ausência de toxicidade da planta e de seus metabólitos secundários, verificando ainda, a efetiva bioatividade dessas substâncias para formulação de fitofármacos e/ou fitoterápicos. Diante disso, os objetivos do presente trabalho foram: isolar compostos bioativos; avaliar o potencial antiproliferativo de frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.), em linhagens normais e tumorais humanas e, analisar a atividade antimutagênica, utilizando como parâmetros, a sobrevivência de conídios e a estimativa de conídios mortos e malformados no desenvolvimento vegetativo da linhagem *biAlmethG1* de *Aspergillus nidulans*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biodiversidade e quimiodiversidade

O Brasil possui imensa biodiversidade, representando cerca de 22% das espécies vegetais do mundo (FERRO et al., 2006; RODRIGUES, 2009). O território nacional abriga o maior número de espécies endêmicas, a maior floresta tropical (Floresta Amazônica), além da Mata Atlântica e do Cerrado. A riqueza biológica nacional também se manifesta na diversidade de ecossistemas, incluindo biomas continentais, ambientes marinhos e de influência marinha, fluvial e lacustre como mangues e restingas. De fato, herdamos “um berço esplêndido” (GANEM, 2010).

A biodiversidade ou diversidade biológica é definida por Arnt (2001), como “o cofre de um patrimônio químico inexplorado de fármacos, alimentos, fertilizantes, solventes, cosméticos, óleos e energia, além de moléculas, enzimas e genes”.

Segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB, biodiversidade ou diversidade biológica significa a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; incluindo, ainda, a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (CONABIO, 2015).

Desde o surgimento da vida no planeta, há cerca de 3,5 a 3,8 bilhões de anos atrás (ALMEIDA; BARRETO, 2010), a natureza tem desenvolvido uma enorme biodiversidade ao longo de sua história evolutiva. A diversidade biológica e de constituintes químicos é uma das mais ricas fontes de bioprospecção (BALICK; ELISABETSKY; LAIRD, 1996; CRAGG; NEWMAN, 1999; COX, 2001; COLEY et. al., 2003; NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009), o que levou à descoberta de muitas moléculas bioativas importantes como o taxol, a penicilina e o ácido salicílico (FARNSWORTH; BINGEL, 1977; STEVENSON; FRIEDMAN, 1999).

As plantas produzem compostos que contribuem para a saúde e sobrevivência humana. Mais de um terço dos medicamentos tem origem a partir de produtos sintetizados pelo metabolismo vegetal (SCHIMIDT et al., 2007). Aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2000).

A biodiversidade é entendida como uma “biblioteca genética” de valor inestimável, que tem sido preservada nos diversos ecossistemas naturais, onde apenas uma pequena parte de seus componentes tem sido estudada (GUERRA; NODARI, 2004). Estima-se, que até meados de 2000, apenas 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada. Mesmo assim, cerca de

140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo, de plantas superiores, já foram isolados e caracterizados (CALIXTO, 2000).

A variedade e a complexidade de compostos bioativos, oriundos de plantas ou demais organismos é o resultado de milhões de anos de evolução, como forma de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e ação de predadores. Portanto, a natureza, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, e os vegetais, constituem a maior parcela de contribuição na diversidade química registrada na literatura (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

2.2. Compostos bioativos: metabólitos secundários

Todo organismo vivo processa uma diversidade química de compostos para sua sobrevivência (HARBORNE, 1993). Segundo Marzzoco e Torres (2007), o metabolismo é definido como o conjunto total de transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado.

O metabolismo é dividido em: metabolismo primário, com substâncias que visam o crescimento e desenvolvimento do organismo, como hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas e lipídios; e metabolismo secundário, que inclui grupos de metabólitos que ajudam a aumentar a capacidade global de sobrevivência e a superar os desafios locais, permitindo interação com o meio (HARBORNE, 1993). Os metabólitos secundários são, muitas vezes, produzidos em uma fase subsequente ao crescimento, estando relacionado à sobrevivência da espécie (MARTIN; DEMAIN, 1978).

Alguns produtos resultantes do metabolismo secundário têm funções ecológicas, atuando como atrativo ou repelente de insetos; outros são pigmentos em flores e frutos, desempenhando papel essencial na reprodução vegetal por atrair animais; também possuem função protetora contra a ação de predadores, tornando a planta indigesta para os herbívoros ou venenosa e, também estão envolvidos no mecanismo de defesa das plantas contra fitopatógenos (GARCÍA; CARRIL, 2009). Portanto, a capacidade de sintetizar metabólitos secundários foi selecionada ao longo do processo evolutivo em diferentes espécies de plantas, à medida que esses compostos supriam suas necessidades (DE LUCA; ST PIERRE, 2000; DUDAREVA; PICHERSKY, 2000).

Os compostos bioativos produzidos por plantas apresentam efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos no homem e nos animais e são sintetizados como metabólitos secundários (BERNHOF, 2010), que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular,

além de possuírem atividades biológicas marcantes e, ao contrário dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; TYMOCZKO; LUBERT, 2008).

Há algum tempo, foram considerados como produtos de excreção vegetal. Sabe-se, portanto, que essas substâncias estão diretamente envolvidas nos diferentes mecanismos que permitem a adequação do seu produtor ao meio ambiente. Esses metabólitos despertam grande interesse, não apenas pela atividade biológica exercida pelas plantas em resposta aos estímulos ambientais, mas também, pela variada atividade farmacológica que possuem, apresentando importância comercial principalmente nas áreas farmacêutica, alimentar, agrônômica e cosmética (SIMÕES et al., 2007).

Os compostos bioativos em plantas são classificados de acordo com diferentes critérios, levando-se em consideração sua função clínica, por meio da avaliação do efeito farmacológico e toxicológico e, caracterização botânica baseada em famílias e gêneros de plantas produtoras desses compostos, pois espécies intimamente relacionadas podem produzir os mesmos compostos ou compostos semelhantes (BERNHOF, 2010).

Os metabólitos secundários de plantas, de acordo com suas vias biossintéticas, se agrupam em quatro grandes classes: substâncias fenólicas, terpenos, glicosídeos e alcaloides. Alguns metabólitos são comuns a todas as plantas, como os fenóis, envolvidos na síntese de lignina. No entanto, outros, como os alcaloides, são esparsamente distribuídos no reino vegetal, sendo muito específicos em alguns gêneros e espécies. Esta distribuição mais estreita, constitui a base para a quimiotaxonomia (BOURGAUD et al., 2001).

As substâncias fenólicas englobam uma variedade de compostos, todos apresentando um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. São quase universalmente presentes em todas as plantas e, geralmente, acumulam-se em todas as partes do vegetal. Incluem os flavonoides, taninos, ligninas e ácido salicílico (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). As plantas sintetizam uma grande variedade de produtos que contêm o grupo fenol, inclusive aminoácidos aromáticos que podem fazer parte do metabolismo primário (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os terpenos, ou terpenoides, constituem o maior grupo de metabólitos secundários. A via biossintética desses compostos os leva tanto ao metabolismo primário quanto ao secundário, uma vez que são essenciais para o crescimento e sobrevivência das plantas, como por exemplo as giberelinas, citocininas e o ácido abscísico (GARCÍA; CARRIL, 2009).

De acordo com o número de unidades de isopreno (cinco átomos de carbono) que possuem, são classificados em: monoterpenos (duas unidades de isopreno), sesquiterpenos (três

unidades de isopreno) e diterpenos (quatro unidades de isopreno). Uma única planta pode sintetizar muitos terpenos diferentes, em diferentes partes, em épocas diferentes e, ao longo de seu desenvolvimento (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Os glicosídeos são assim chamados, devido à referência de um enlace glicosídico que se forma quando uma molécula de açúcar se condensa com outra que contém um grupo hidroxila. Entre os grupos de glicosídeos estão: saponinas, glicosídeos cardiotônicos e glicosídeos cianogênicos (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os alcaloides, com grande importância farmacológica e medicinal, são compostos nitrogenados alcalinos que incluem a morfina, cocaína, cafeína, nicotina e a atropina (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). São encontrados em cerca de 20% das plantas vasculares, principalmente eudicotiledôneas herbáceas. São sintetizados a partir de lisina, tirosina e triptofano; outros, porém, como a nicotina, são derivados da ornitina (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Cerca de 50.000 estruturas químicas de compostos bioativos têm sido identificadas em plantas através de ressonância magnética nuclear (RMN) e análise de raios X. No entanto, segundo Wink (2006), uma vez que menos de 20% de todas as plantas tenham sido estudadas, é provável que o número real de compostos bioativos ou metabólitos secundários em plantas, supere 100.000 estruturas.

Além disso, a quantidade e a natureza química dos metabólitos secundários produzidos podem sofrer influência de inúmeros fatores, como a época de coleta, sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica, disponibilidade de macro e micronutrientes, altitude, poluição atmosférica, fase do desenvolvimento, além da indução por ataque de patógenos, sofrendo oscilações durante o ano (GLOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As plantas são, portanto, uma rica fonte de compostos bioativos. A diversidade de estruturas e propriedades químicas podem servir para o desenvolvimento de inúmeros fitofármacos, desempenhando as mais variadas atividades farmacológicas (ALVES, 2001).

2.3. Fitofármacos e suas aplicações

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define fitofármaco como substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, uma mistura de substâncias ativas de origem vegetal (OMS, 1998). As plantas, além de constituírem uma fonte de recursos na medicina popular, têm contribuído na obtenção de inúmeros fármacos, amplamente utilizados na

medicina clínica, como a rutina, colchicina, vincristina e o taxol (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

O processo de extração de princípios ativos de plantas teve início em 1803, quando o farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner isolou a morfina a partir de *Papaver somniferum*. Desde então, outras substâncias foram isoladas, e passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2001).

Desta forma, inúmeros fitoquímicos têm sido isolados a partir de plantas, sendo utilizados como base na obtenção de fitoterápico, medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente a matéria-prima vegetal com finalidade profilática ou curativa, não incluindo substâncias ativas isoladas (ANVISA, 2010) ou, um fitofármaco, que compreende a substância ativa, isolada a partir de material vegetal, incluindo misturas de substâncias ativas (OMS, 1998).

As diferentes substâncias químicas isoladas a partir de plantas, além de desempenharem atividades farmacológicas de interesse à medicina, podem também, desencadear efeitos adversos, como por exemplo o apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos, com efeitos hepatotóxicos. Além disso, ação tóxica renal e ocorrência de dermatites, que podem ser causadas por espécies vegetais contendo terpenos, saponinas, lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO et al., 2000).

Como parte inerente à pesquisa científica, é necessário que se faça a comprovação da identidade botânica da planta, análise da composição química das drogas obtidas a partir da matéria-prima vegetal, obtenção, identificação e análise dos princípios ativos e/ou extratos, a fim de avaliar possíveis efeitos tóxicos e/ou farmacológicos.

Alguns fatores atuam como incentivo ao estudo de plantas como fontes de novas substâncias com atividades farmacológicas, entre eles, destaca-se a imensa eficácia de alguns fitoquímicos com atividades antitumorais (CRAGG et al., 1993; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003) e, além disso, por ser considerado um *hotspot* mundial, o território brasileiro sustenta um alto nível de biodiversidade (MYERS et al., 2000), havendo a possibilidade de descoberta de novas substâncias, culminando com o desenvolvimento de novos fitofármacos (FOGLIO et al., 2006).

Segundo Yunes e Cechinel-Filho (2001), diversas metodologias estão disponíveis para obtenção de fármacos, incluindo as biotecnológicas, que tornaram possível a avaliação, em um único dia, de inúmeros compostos quanto às suas atividades biológicas e, a química computacional que correlaciona a estrutura molecular à atividade biológica.

Os vegetais, portanto, representam uma vasta fonte de moléculas a serem descobertas, não sendo apenas portadores de princípios ativos isolados, mas também de extratos. Independentemente do uso de substância isolada ou extratos, há a necessidade de avaliar os efeitos farmacológicos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Uma vez que poucas espécies tenham sido estudadas, é importante a realização de pesquisas multidisciplinares, permitindo um estudo completo das atividades biológicas de substâncias vegetais (FOGLIO et al., 2006).

2.4. Nutrigenômica: nutracêuticos e alimentos funcionais

A nutrição e a genética desempenham um papel fundamental na saúde humana, tendo relação com o desenvolvimento de doenças crônicas e/ou distúrbios multifatoriais como o câncer, osteoporose, diabetes e doenças cardiovasculares (IUFOST, 2012).

Nesse sentido, a nutrigenômica compreende o estudo de como os nutrientes afetam os genes (sua influência na estrutura e expressão gênica) e, como os genes afetam a dieta (como o indivíduo responde ao que come), sendo este último, muitas vezes chamado de nutrigenética (EL-SOHEMY, 2007). Portanto, a nutrigenômica é o estudo da interação de componentes dietéticos com o genoma e as consequentes alterações na expressão gênica, refletindo na estrutura e função de proteínas e outros metabólitos (SUBBIAH, 2008).

Um dos principais objetivos da nutrigenômica é a prevenção do aparecimento e da progressão de doenças crônicas, por meio de estudos epidemiológicos e construção de evidências que estejam ligadas às vias metabólicas e às doenças, conduzindo a população à orientação nutricional personalizada (IUFOST, 2012). Em suma, esta ciência procura entender como os componentes da dieta interferem na expressão dos genes, e quais genes são induzidos e reprimidos diante de determinado nutriente (SANHUEZA; VALENZUELA, 2012).

As áreas da nutrigenômica e nutrigenética também estão intimamente relacionadas a uma área emergente, a metabolômica, envolvida na descoberta e desenvolvimento de biomarcadores de doenças (GERMAN; ROBERTS; WATKINS, 2003a; 2003b). Segundo Subbiah (2008), a metabolômica compreende o estudo de como as diferenças genéticas afetam o perfil metabólico do indivíduo, as vias e as funções metabólicas que possam influenciar a resposta do organismo aos nutrientes.

Muitas proteínas, enzimas, receptores, canais iônicos e hormônios estão envolvidos nos processos diários de ingestão, absorção, digestão, transporte, metabolismo e excreção. Variações nos genes que codificam proteínas podem afetar qualquer um desses processos e, portanto, alterar não somente a quantidade de proteína produzida, como também a qualidade de

sua função. Se uma variação genética conduz à produção ou à função alterada dessas proteínas, então o estado nutricional pode ser afetado (IUFOST, 2012).

As diferenças marcantes entre os indivíduos no que diz respeito às respostas aos fatores dietéticos têm incomodado os cientistas durante o último século. Apesar de haver uma base genética para algumas destas diferenças, avanços nessa área só foram possíveis após a conclusão do projeto genoma humano (VENTER et al., 2001); documentação de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em genes candidatos (ORDOVAS, 2006; ORDOVAS; KAPUT; CORELLA, 2007) com associação aos desequilíbrios metabólicos e, desenvolvimento de testes para avaliar o potencial nutrigenômico (SUBBIAH, 2010).

Estudos baseados em etnofarmacologia, fitoterapia e uso de suplementos alimentares têm fornecido fortes evidências da interação de nutrientes de origem vegetal com o genoma, causando alterações relevantes na expressão gênica (SHAY; BANZ, 2005; FENECH, 2008) e, a capacidade das variações genéticas em provocar diferentes respostas frente aos fatores dietéticos (STOVER, 2006).

O resveratrol, por exemplo, é um polifenol derivado de uvas, encontrado no vinho tinto, morango, mirtilo e amora, com propriedades benéficas para a saúde, tendo efeito anti-inflamatório, antitrombótico e antitumoral (GRONBAEK et al., 2000; PEDERSEN; JOHANSEN; GRONBAEK, 2003). Esta substância está associada à longevidade, uma vez que estimula a produção de proteínas nucleares e mitocondriais que retardam o processo de apoptose, ao mesmo tempo que aumenta a resistência às condições de estresse celular (SCARLATTI; SALA; SOMENZI, 2003).

Embora a nutrigenômica pareça ser uma ciência inovadora, os benefícios dos fatores dietéticos na promoção e melhoria da saúde e bem-estar já haviam sido sinalizados por Hipócrates há mais de 2.500 anos atrás, quando disse: “deixe o teu alimento ser o teu remédio” (EL-SOHAIMY, 2012).

Atualmente, com a criação de novos campos de estudo, surgiram os conceitos de nutracêutico, que corresponde ao alimento ou parte do alimento que proporciona benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de uma doença (TROTIER et al., 2010), e, alimento funcional, alimentos na forma comum, que suprem a necessidade de vitaminas, ácidos graxos, proteínas, carboidratos, entre outras substâncias necessárias à manutenção da saúde. A partir do momento em que o alimento funcional ajuda na prevenção/tratamento de doenças e outras desordens, passa a ser chamado de nutracêutico (KALRA, 2003).

Independentemente do uso do termo nutracêutico ou alimento funcional, o fato é que os nutrientes desempenham diferentes papéis ou funções nutricionais em cada indivíduo, conforme sua herança genética (VASCONCELOS, 2010).

2.5. Genética toxicológica de plantas

A genética toxicológica teve seu início na década de 1980, quando órgãos de saúde pública e agências ambientais foram despertados para a necessidade de avaliar o potencial mutagênico de agentes químicos, medicamentos e aditivos de alimentos antes de serem lançados no mercado (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

No nosso cotidiano, estamos constantemente expostos a diversas substâncias com potencial mutagênico e/ou carcinogênico, incluindo produtos de origem natural (vegetal ou animal) ou sintética. Entre essa imensa gama de substâncias potencialmente genotóxicas, estão os fármacos, cosméticos, corantes, conservadores de alimentos, derivados de petróleo, agroquímicos, drogas lícitas e ilícitas, além da poluição típica dos centros urbanos (GRISOLIA, 2005; TELESIL; MACHADO, 2008).

Os processos que afetam a base genética da vida participam da genotoxicidade e podem ser agrupados, basicamente em: mutagênicos, quando a alteração afeta estrutura físico-química do DNA (mutagenicidade); carcinogênicos, quando a alteração atinge o controle do ciclo celular (carcinogênese) e, teratogênico, quando a alteração se dá em nível orgânico, gerando distúrbios no desenvolvimento embrionário (teratogênese) (ERDTMANN, 2003).

A genética toxicológica estuda a capacidade de algumas substâncias em induzirem alterações genéticas nos organismos que sofreram exposição. Sendo assim, os ensaios de genotoxicidade têm por objetivo a detecção de mutágenos e carcinógenos; compreender os mecanismos de mutagênese e carcinogênese e, avaliar os riscos desses compostos à saúde humana (WASSON; MICKLELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008).

As plantas são conhecidas por conterem inúmeros compostos bioativos, de interesse farmacológico. Contudo, podem apresentar efeitos tóxicos, inclusive para o DNA (ALADE; IROBI, 1993; MARQUES et al., 2003). Desta forma, a investigação de plantas é relevante por dois motivos: primeiramente, como uma fonte de drogas quimioterápicas potentes e, secundariamente, como uma medida de segurança para o uso contínuo de plantas medicinais pela população (VERSCHAEVE et al., 2004). Portanto, é cada vez maior o enfoque de pesquisas na busca por compostos com atividade antigenotóxica, ou seja, com efeito protetor, seja em nível antimutagênico ou anticarcinogênico, especialmente os de origem natural. Sabe-se que, a maioria desses compostos estão presentes nos vegetais (FERGUSON; PHILPOTT;

KARUNASINGHE, 2004; GOMES, 2007), exibindo potentes efeitos protetores nas células dos organismos, com envolvimento em múltiplos mecanismos tais como: inibição de efeitos genotóxico, atividade antioxidante, inativação de substâncias mutagênicas, inibição da proliferação celular e modulação da transdução de sinal. Mecanismos esses atrelados integral ou parcialmente às diversas fases do processo de reparo do DNA (KOJIMA; KONISHI; KURODA, 1992).

2.6. Sistemas teste em genética toxicológica

A genética toxicológica avalia os efeitos genotóxicos em potencial, uma vez que são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Os testes regulatórios em genética toxicológica constituem-se de uma série de ensaios de mutagenicidade, bem definidos e selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações, uma vez que as mutações são frequentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento (RIBEIRO, 2003).

Diversos testes de curta duração estão disponíveis para a avaliação do potencial genotóxico de diferentes substâncias. Tais modelos são categorizados por lesão no DNA (alteração passível de reparo), mutação gênica (lesão já fixada) ou dano cromossômico (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

O teste de mutagenicidade em *Salmonella thyphimurium*, também conhecido como teste de Ames, é uma metodologia de triagem muito empregada para detecção de substâncias carcinogênicas genotóxicas, sendo validado em larga escala por diversos laboratórios. O ensaio emprega linhagens de *Salmonella* auxotróficas para histidina, apresentando diferentes mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio com ausência de histidina, a menos que ocorra mutação que lhe restaure a capacidade de síntese do aminoácido (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Os testes citogenéticos *in vitro* com células de mamífero são utilizados para detecção de alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas, microscopicamente visíveis (LIMA; RIBEIRO, 2003). A maioria das alterações detectadas por esse ensaio é encontrada em células tumorais, sendo relevantes na carcinogênese (HOZIER; APPLGATE; MOORE, 1992).

Outro ensaio recomendado para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos antes de entrarem no mercado, é o teste do micronúcleo *in vivo* com células hematopoiéticas de roedores (CHOY, 2001). Este ensaio é aconselhado na

detecção de agentes clastogênicos (que induzem quebras) e aneugênicos (que induzem segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al., 1994), que conduzirão a danos que aparecerão sob a forma de micronúcleo (RIBEIRO, 2003). Existem inúmeros protocolos para o emprego do teste, inclusive em células humanas (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

O teste do cometa apresenta suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros ensaios para detecção de substâncias genotóxicas. Este ensaio não é utilizado para detecção de mutações, mas sim de lesões genômicas, passíveis de correção que, podem resultar em mutação. Uma vez que os danos no DNA são frequentemente célula-tecido específicos, essa metodologia permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e, conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, sendo portanto, relevante para avaliação de compostos genotóxicos (GONTIJO; TICE, 2003).

A genética toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar diferentes tipos de alterações, como mutações de ponto, alterações cromossômicas e lesões, fatos correlacionados ao processo de carcinogênese. Mesmo assim, alguns carcinógenos, são destituídos da atividade mutagênica, seja em nível gênico ou cromossômico (RICHARD, 1994).

Ensaio que levam em consideração a recombinação mitótica, que também estaria envolvido na promoção do câncer, foram desenvolvidos (ANDRADE; LEHMANN, 2003), como o teste de Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas (SMART), em *Drosophila melanogaster*, que possibilita a detecção simultânea de mutações gênicas e alterações cromossômicas além de recombinação somática, com ênfase sobre eventos relacionados com recombinação homóloga (GRAF et al., 1984; WÜRGLER; VOGEL, 1986).

Além disso, as novas tecnologias em genômica funcional e proteômica, constituem instrumentos importantes na avaliação das interações gene-ambiente, sendo este tipo de estudo crucial no campo da mutagênese e carcinogênese ambiental, possibilitando a análise da expressão gênica para identificar as principais vias de genes com expressão alterada, que pode ser utilizada para revelar os eventos de regulação gênica envolvidos na resposta celular às lesões, no monitoramento de indivíduos expostos, na estimativa de risco ao desenvolvimento de neoplasias e definir o mecanismo de ação do agente genotóxico (SAKAMOTO-HOJO et al., 2003).

2.7. *Aspergillus nidulans* como organismo teste

Aspergillus possui espécies muito utilizadas em processos industriais, além de sua importância médica. *Aspergillus nidulans* possui um sistema genético bem caracterizado e amplamente utilizado em estudos sobre mutações e regulação genética, sendo empregado em testes de genotoxicidade e mutagenicidade, devido ao seu rápido crescimento em meios definidos, com resultados fenotipicamente identificáveis (ROCHA; AZEVEDO, 1986).

A. nidulans, também chamado *Emericella nidulans*, na sua forma sexuada ou teleomórfica, é uma das muitas espécies de fungos filamentosos do filo Ascomycota. Tem sido um organismo importante no estudo da biologia celular dos eucariotos (OSMANI; MIRABITO, 2004) por mais de 50 anos (MARTINELLI, 1994), sendo empregado em pesquisas sobre recombinação gênica e mapeamento de genes (POTENCORVO et al., 1953), reparo de DNA, mutação, controle do ciclo celular, tubulinas, cromatina, nucleocinese, patogênese, metabolismo (NIERMAN et al., 2005) e genética do desenvolvimento (MARTINELLI, 1994; TIMBERLAKE; CLUTTERBUCK, 1994). Sua ampla utilização em estudos de genética deve-se ao fato de apresentar ciclo de vida curto, haploidia e morfogênese bem definida (TIMBERLAKE; MARSHALL, 1988; MILLER, 1990).

O ciclo de vida compreende três fases distintas: a fase vegetativa, que engloba a germinação do esporo e o crescimento das hifas vegetativas, originando o micélio; a fase assexuada ou conidiogênese, que consiste na produção de esporos assexuados, os conídios, a partir de estruturas diferenciadas - os conidióforos; e a fase sexuada ou ascospogênese, que resulta na formação de esporos sexuados - os ascósporos, dentro dos cleistotécios, cercados por células de hülle (TIMBERLAKE; CLUTTERBUCK, 1994).

Cada uma destas fases constitui um programa de desenvolvimento regulado por grande número de genes em cascata, como ocorre na embriogênese de organismos mais complexos. Em linhas gerais, a germinação dos esporos é uma fase essencial no desenvolvimento do ciclo de vida de todos os fungos filamentosos. Três importantes passos podem ser distinguidos durante a germinação de esporos: ativação do esporo dormente em resposta às condições ambientais adequadas, crescimento isotrópico que envolve a absorção de água e a retomada de numerosas atividades metabólicas e crescimento polarizado que resulta na formação de um tubo germinativo a partir do qual se origina o novo micélio (D'ENFERT, 1997).

A fase vegetativa tem início com o rompimento da dormência do esporo, que ocorre na presença de água e uma fonte de carbono, como a glicose (TIMBERLAKE; CLUTTERBUCK, 1994). O esporo aumenta de volume com a embebição e, por mitose, forma o tubo vegetativo (YUILL, 1950), que apresenta crescimento apical, originando os septos. Após

um período de crescimento, o esporo emite um segundo tubo germinativo, com orientação oposta ao primeiro, assim como um terceiro, em seguida, perpendicular aos demais, porém, todos no plano horizontal. Essas hifas crescem formando uma colônia radial em culturas com meio sólido (PONTECORVO et al., 1953; AXELROD, 1972; ROCHA, 1997).

Segundo D'Enfert (1997), cada etapa da germinação é marcada por um conjunto de eventos morfogenéticos que reflete a expressão de grupos de genes e o tipo de influência que o ambiente pode exercer nessa fase. A embebição coincide com a ativação do metabolismo do esporo, com elevação da taxa respiratória e aumento dos níveis de ATP. A fase de brotamento do botão germinativo marca a ativação do ciclo celular, com a primeira mitose do núcleo original do conídio e o eixo que se estabelece nesse momento é o eixo diretor para o crescimento polarizado da fase seguinte.

A conidiogênese ou ciclo assexuado compreende a segunda fase do ciclo de vida de *A. nidulans*, formando estruturas chamadas conidióforos (Figura 1) que produzirão esporos assexuados, os conídios. O início do desenvolvimento dos conidióforos é marcado pela formação da célula-pé, constituída pela diferenciação de um intersepto da hifa vegetativa. A partir dessa célula, surge uma haste, que por sua vez, sofre uma dilatação na extremidade superior, dando origem à vesícula, da qual brotam cerca de 30-60 pequenas vesículas chamadas métulas. Os núcleos da vesícula sofrem sucessivas mitoses, até existirem núcleos suficientes para todas as métulas. Cada núcleo migra para uma métula, e destas, por brotamento, surgem as fiálides, responsáveis pela formação dos conídios, também por brotamento. Cada conídio que brota recebe um núcleo resultante da mitose do núcleo da fiálide que lhe deu origem (TIMBERLAKE; CLUTTERBUCK, 1994).

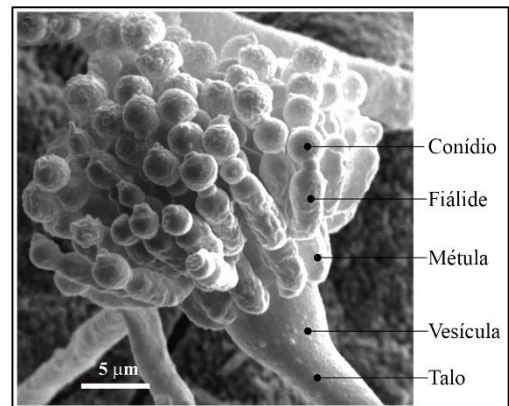


Figura 1. Eletromicrografia digitalizada de um conidióforo de *Aspergillus nidulans* com a nomenclatura das diferentes células especializadas (Peñalva et. al., 2012).

O ciclo sexual ou ascospogênese (Figura 2), tem início após 60 horas de crescimento da colônia e geralmente, a colônia pode ainda apresentar alguns conidióforos, causando o aparecimento das células de Hülle, de cor dourado brilhante que se formam ao redor de uma hifa ascógena, uma ponta de hifa que se dobra como um gancho (ROCHA, 1997). Além disso, dois eventos morfogenéticos ainda participam da diferenciação sexual, o desenvolvimento dos cleistotécios e a formação dos ascos.

Os cleistotécios são estruturas reprodutoras que abrigam em seu interior, os ascos, cada um com 8 ascósporos binucleados (PONTECORVO et al., 1953; BENJAMIN, 1955; YAGER, 1992). O desenvolvimento do cleistotécio ocorre através da modificação na ponta da hifa que se dobra como um gancho formando uma estrutura denominada de *crozier*. Em cada *crozier* dois núcleos haploides sofrem mitose seguida de fusão dos dois núcleos filhos, que entram em meiose, dando origem a quatro núcleos

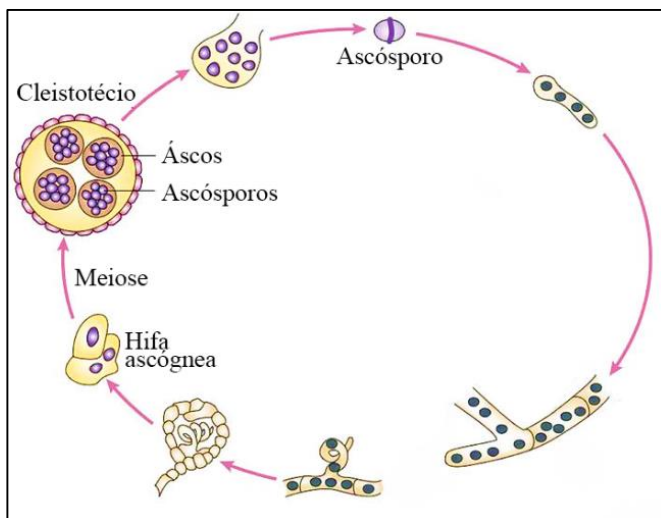


Figura 2. Ilustração esquemática do ciclo sexual, ascosporogênese, em *Aspergillus nidulans* (CASSELTON e ZOLAN, 2002, com modificações).

compartimento, o asco. Os núcleos sofrem então uma mitose pós-meiótica, originando oito ascósporos, cada um envolto por uma membrana. Após este processo, os núcleos dos ascósporos sofrem nova mitose, sem divisão celular, tornando-se binucleados (PONTECORVO et al., 1953; YAGER, 1992; CHAMPE; NAGLE; YAGER, 1994; BRAUS; KRAPPMANN; ECKERT, 2002). Os mesmos dois núcleos iniciais, repetem muitas vezes todo o processo chegando a produzir 400.000 ascósporos por cleistotécios (YAGER, 1992; CHAMPE; NAGLE; YAGER, 1994).

Segundo Sousa et al. (2009), o emprego de *A. nidulans* constitui uma alternativa eficaz, por se tratar de célula eucariótica com mecanismos celulares e genéticos mais complexos do que *Salmonella thyphimurium*, utilizado no teste de Ames. Mesmo com limitações na utilização deste fungo como alternativa a um mamífero, devido diferenças no ambiente molecular e interações genéticas, *A. nidulans* fornece uma rápida triagem das atividades biológicas de agentes, do mesmo modo como no teste de Ames.

2.8. Câncer: um distúrbio multifatorial

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que caracterizam-se pela perda de controle da proliferação celular e ganho da capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes (PINTO; FELZENSWALB, 2003). O câncer pode ser induzido por meio de fatores externos e internos, que podem atuar em conjunto ou em sequência (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

As células do corpo humano são equilibradas por meio dos processos de crescimento celular e apoptose. O desenvolvimento do câncer ocorre, quando esse equilíbrio é atrapalhado (RAVINDRAN; PRASAD; AGGARWAL, 2009), devido ao mal funcionamento de genes que controlam esses processos (CHANG et al., 2012). As razões pelas quais os genes que regulam o ciclo celular têm suas funções alteradas são complexas e multifatoriais, incluindo predisposições genéticas hereditárias, agentes físicos, químicos e biológicos (PINTO; FELZENSWALB, 2003).

A primeira evidência de substâncias cancerígenas (carcinógenos), foi observada em 1775, quando se atribuiu à fuligem a alta incidência de câncer de pele nos limpadores de chaminés. Desde então, inúmeros carcinógenos têm sido identificados, mais de 200 moléculas, sendo a maioria constituída por hidrocarbonetos policíclicos. A propriedade comum, inerente a todos os carcinógenos, é a capacidade de causar dano ao genoma celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011), afetando genes supressores de tumor, proto-oncogenes e genes relacionados ao sistema de reparo biológico (ACHATZ; MAKDISSI; ASHTON-PROLLA, 2013).

Os genes supressores de tumor codificam proteínas que, por meio da regulação de *checkpoints* celulares inibem a progressão do ciclo caso o DNA esteja danificado e, também, as proteínas que promovem apoptose em resposta às lesões não reparadas no DNA (SILVA, 2013). Os proto-oncogenes são genes relacionados aos processos de proliferação e diferenciação celular. Porém, quando ocorrem alterações nesses genes, eles tornam-se oncogenes, agora capazes de manter o estímulo permanente para a divisão celular (PINTO; FELZENSWALB, 2003). A maioria dos tumores têm mutações tanto em oncogenes como em genes supressores de tumor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Segundo Pinto e Felzenswalb (2003), a maioria dos carcinógenos é considerada pré-carcinógeno, ou seja, são compostos estáveis no pH fisiológico, sendo incapazes de interagir com o DNA. No entanto, essas substâncias são biotransformadas, por enzimas, em compostos hidrossolúveis e, portanto, passíveis de serem excretados. Os produtos gerados são extremamente eletrofílicos (característica comum dos carcinógenos ambientais) e irão reagir com centros nucleofílicos das células, como regiões do DNA, levando à formação de adutos que tendem a ser reparados. Caso a célula se replique antes do reparo ocorrer, esse aduto pode levar ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA, que pode ser uma mutação de ponto ou alterações cromossômicas, dependendo da quantidade e tipo de carcinógeno. Essas alterações, fazem com que a célula afetada tenha maiores chances de adquirir novas alterações, tendo efeito cumulativo, tornando-se uma célula neoplásica.

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese estão intimamente relacionados. A mutação, como consequência do dano no DNA, pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação de tumor. Isso se comprova pelo fato de genes específicos serem encontrados em neoplasias (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

O câncer é, portanto, o produto final resultante de processos complexos que se desenvolve em múltiplos estágios. Em cada um desses estágios, ocorrem alterações genéticas que não são corrigidas pelo sistema de reparo e provocam mutações, que conferem vantagem proliferativa às células e sua consequente expansão clonal (OLIVEIRA; BUSTOS; DELLAMANO, 2013).

Apesar da atuação de agentes carcinogênicos na promoção e desenvolvimento tumoral, inúmeros compostos bioativos de origem vegetal têm sido fonte de moléculas clinicamente úteis no tratamento de câncer (CRAGG; NEWMAN, 2005). O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese inclui antioxidantes, indutores de apoptose, inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo de drogas, que poderia levar à formação de radicais livres, inibidores da angiogênese (necessária para disseminação de tumores através das metástases), antagonistas de fatores de crescimento, hormônios e agentes reparadores de lesões no DNA (HALLIWEL, 1999; KELLOFF et al., 1999).

As plantas, portanto, podem ser utilizadas como recursos terapêuticos de várias formas: sob a forma de chás (planta medicinal), extrato bruto ou frações em pós, cápsulas e pílulas (fitoterápico) ou, substâncias isoladas (fitofármaco), desempenhando as mais variadas atividades farmacológicas, inclusive antitumoral (RATES, 2001), sendo consideradas como reservatório de um grande número de compostos orgânicos que têm sido amplamente utilizados como fonte para medicamentos. Entre as plantas medicinais está o noni, *Morinda citrifolia*, utilizado com fins terapêuticos, além de possuir amplo valor nutricional (MATHIVANAN et al., 2005).

2.9. Noni: características e aplicações

2.9.1. Características gerais e botânicas

Rubiaceae Juss. é a maior família de Gentianales, com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies, que corresponde a 66% do total da ordem (STRUWE, 2002). Estudos filogenéticos propuseram a divisão dessa família em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (BREMER, 1996; BREMER et al., 1999).

Espécies de Rubiaceae apresentam distribuição cosmopolita, sendo mais abundantes nas regiões tropicais, em ambos os hemisférios (TAYLOR et al., 2004). No Brasil, ocorrem

cerca de 130 gêneros e 1.500 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora, destacando-se como um importante componente das formações naturais (SOUZA; LORENZI, 2005), além, é claro, de apresentarem importância econômica, sendo empregadas na alimentação, ornamentação e na indústria farmacêutica (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

Morinda citrifolia Linn., conhecida popularmente como noni, pertencente à Rubiaceae, é uma das plantas medicinais mais populares na Polinésia, usada há mais de 2.000 anos (WHISTLER, 1985), com amplo valor nutricional e terapêutico (SINGH et al., 1984). Os polinésios utilizam toda a planta em seus preparos medicinais - raiz, caule, folhas e frutos (BRUGGNECATE, 1992). É uma planta nativa desde o sudeste da Ásia até a Austrália, sendo cultivada na Polinésia, Índia, Caribe, América Central e do Sul (DENG; WEST; JENSEN, 2010).

A denominação botânica do gênero (*Morinda*) é devido à união das palavras latinas *morus* (amora) e *indicus* (Índia), justificada pela semelhança ao fruto de *Morus alba* L. O nome da espécie indica que a folhagem da planta é similar a alguns tipos de citros (VEIGA et al., 2005).

A planta de noni é uma árvore pequena (3-10m), que cresce em regiões costeiras ao nível do mar (Figura 3) até áreas florestais acima de 1.300 metros, sendo geralmente encontrada em solo basáltico. Dependendo do local de cultivo, o noni não atinge uma copa típica e permanece com aspecto arbustivo (VEIGA et al., 2005).

As folhas medem de 15-30 cm de largura por 20-40 cm de comprimento, com coloração verde brilhante (WANG et al., 2002; CHAN-BLANCO et al., 2006), do tipo oposta ou alterna, com lâmina



Figura 3. Planta *Morinda citrifolia*, Havaí: EUA (Domínio Público).

ovalada, amplamente elíptica, oblonga ou oblongo-lanceolada (MATHIVANAN et al., 2005). As flores são brancas, pequenas e tubulares, agrupadas e inseridas no pedúnculo (MORTON; 1992; ROSS; 2001).

O fruto é ovoide (Figura 4), de cor verde a translúcido durante a maturação, medindo de 3-10 cm, podendo atingir até mais de 20 cm, com superfície em formatos poligonais e, quando maduro, possui cheiro e sabor desagradáveis (WANG et al., 2002; CHAN-BLANCO et al., 2006). As sementes são triangulares de cor marrom avermelhada, com uma espécie de saco de ar ligado a uma extremidade, a qual faz com que flutuem, o que poderia explicar, em parte, a ampla distribuição dessa planta nas ilhas polinésias (SWANHOLM; JOHN; SCHEUER, 1959).



Figura 4. Fruto de noni, *Morinda citrifolia* (Arquivo do autor).

2.9.2. Caracterização físico-química do fruto

O fruto contém 90% de água e os principais componentes da matéria seca, inclui sólidos solúveis, fibras e proteínas (CHAN-BLANCO et al., 2006). Em quantidade substancial, encontram-se os hidratos de carbono, com frações variáveis de sacarose, glicose e frutose (JENSEN et al., 2005) e seus principais aminoácidos são o ácido aspártico, ácido glutâmico e isoleucina (CHUNHIENG, 2003). Também é verificada elevada porcentagem de minerais, em torno de 8,4% da matéria seca, incluindo potássio, enxofre, cálcio e fósforo. As vitaminas encontradas em maior quantidade são o ácido ascórbico e provitamina A (CHAN-BLANCO et al., 2006).

Correia et al. (2011) realizaram a caracterização química e físico-química da polpa de noni. As análises mostraram que o teor de umidade, em torno de 91,9% está de acordo com os dados na literatura, os quais indicam que a água é o maior componente do fruto. Em relação aos lipídios, observou-se uma baixa porcentagem, em torno de 0,08%. O valor médio para o teor de proteína foi de 1,06%. No entanto, podem ocorrer variações conforme verificado por Shovic; Whistler (2001); Chunhieng (2003); West; Deng; Jensen (2011), em virtude de alterações no clima, solo, ponto de maturação e armazenamento de cada região.

O maior componente da matéria seca verificado por Correia et al. (2011), foram os hidratos de carbono. O conteúdo de cinzas variou de 0,4% a 2,1% em frutos secos, representando os minerais, em maiores quantidades, potássio, sódio e cálcio e, em menores quantidades, ferro, manganês e zinco. As fibras presentes na fina película do fruto estão em torno de 2%.

Nesse mesmo estudo, o valor energético do noni foi de 30,25 kcal x 100 g⁻¹ de polpa, com quase totalidade atribuída aos hidratos de carbono, que corresponderam a cerca de 83,58% das calorias contidas na polpa. Além disso, constatou-se que o noni é uma rica fonte de ácido ascórbico, um poderoso antioxidante que pode oferecer proteção contra algumas doenças e contra aspectos degenerativos do envelhecimento. Uma porção de 100 gramas do fruto de noni é suficiente para suprir o dobro do valor de referência de ingestão diária recomendada para um adulto. No entanto, nos frutos maduros, o teor de ácido ascórbico é diminuído.

Também foi identificado alto conteúdo de compostos fenólicos totais (216,67 mg x 100 g⁻¹), quando comparado com açaí, uva, graviola, goiaba, abacaxi, cupuaçu e maracujá, com exceção da acerola e da manga (KUSKOSKI et al., 2005). Os compostos fenólicos têm participação no sabor, coloração e na ação do produto como alimento funcional, notadamente correlacionado com a capacidade antioxidante (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

2.9.3. Propriedades farmacológicas

Diferentes partes da planta, incluindo os frutos, têm sido tradicionalmente empregados na medicina popular contra várias doenças, como diabetes, hipertensão, infecções, artrite, asma, dores e até mesmo câncer (SANG et al., 2002; CHAN-BLANCO et al., 2006).

O suco de noni, na medicina popular, é indicado como alternativa no tratamento de dores de cabeça, síndrome da imunodeficiência adquirida, úlceras gástricas, depressão, senilidade, câncer, má digestão e aterosclerose (WANG et al., 2002; KAMIYA et al., 2004). Estudos *in vitro* têm demonstrado algumas atividades biológicas, como a inibição da angiogênese, atividade antioxidante e inibição de tirosina-quinase. No entanto, a maioria dos ensaios foram realizados com extratos brutos ou frações de noni, havendo dificuldade na detecção do composto responsável pelas atividades descritas (ZIN; ABDUL-HAMID; OSMAN, 2002; SU et al., 2005).

Entre as atividades farmacológicas do noni, já descritas na literatura científica, destaca-se a atividade antimicrobiana (primeira atividade descrita), inibindo o crescimento de algumas espécies de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* e espécies de *Salmonella* e *Shigella* (ATKINSON, 1956). A atividade observada, segundo o autor, deve-se à presença de compostos fenólicos como a escopoletina e antraquinonas.

A atividade antiviral foi observada para o damnacantal, um componente extraído de noni, que atuou como inibidor da proteína acessória viral *vpr*, típica do vírus da

imunodeficiência adquirida tipo 1, que contribui com a parada do ciclo celular na fase G2 e apoptose (KAMATA et al., 2006).

A propriedade antioxidante dos extratos metanólico e acetato de etila foi avaliada por Mohd, Abdul-Hamid e Osman (2001). Os autores descobriram que os extratos apresentaram forte oxidação, comparado ao alfa-tocoferol, demonstrando potencial antioxidante quase três vezes maior que o do ácido ascórbico, tendo praticamente a mesma magnitude que o pó de semente de uva.

Mckoy, Thomas e Simon (2002), demonstraram a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso do fruto de noni, através da resposta inflamatória aguda induzida por um agente pró-inflamatório (bradimicina). Verificou-se, que com a administração oral do extrato, houve rápida inibição da formação de edema nas patas dos ratos utilizados como sistema teste.

O suco também demonstrou efeito hepático-protetor frente lesão induzida por tetracloreto de carbono, em ratos. Os resultados mostraram que o suco foi eficiente na proteção contra a toxicidade hepática induzida (MIAN-YING et al., 2008), evidenciando que não há relação entre o uso do suco de noni e a ocorrência de hepatite (EFSA, 2002), podendo ser utilizado como complemento natural eficaz de proteção hepática (WEST; JENSEN; WESTENDORF, 2006; WEST et al., 2006).

A atividade antitumoral relacionada ao efeito imunomodulador (capacidade de melhorar o sistema imune do indivíduo), foi descrita para o precipitado da fração etanólica do suco de noni, na qual foi encontrada uma substância rica em polissacarídeo composta por galactose, arabinose e ramnose, com efeito imunomodulador e antitumoral contra carcinoma de pulmão (HIRAZUMI et al., 1996; HIRAZUMI; FURUSAWA, 1999). Os autores sugeriram que o noni poderia suprimir o crescimento do tumor por meio da ativação do sistema imune do indivíduo.

Wang et al. (2002), demonstraram o efeito citotóxico do suco comercial em linhagens celulares de leucemia, cultivadas em várias concentrações. A citotoxicidade do suco foi de forma dose-dependente, induzindo necrose das linhagens tumorais em altas doses e, apoptose em concentrações mais baixas. Além disso, foi verificado o efeito sinérgico do suco com o agente antitumoral taxol, aumentando a eficiência do mesmo, pois quando administrado isoladamente, o taxol induziu baixa porcentagem de apoptose em células de leucemia mas, em conjunto com o suco, a porcentagem foi de 100%, indicando, segundo os autores, o uso terapêutico do suco em combinação com agentes antitumorais na tentativa de diminuir a dose de fármacos sintéticos e aumentando a função imunológica do organismo, criando uma alternativa no tratamento de câncer.

A atividade antitumoral com efeito sinérgico também é evidente no estudo realizado por Gupta et al. (2013), no qual o suco comercial induziu apoptose em linhagens HeLa e SiHa de câncer de colo uterino. O suco foi utilizado também em conjunto com o agente antitumoral cisplatina. Os resultados mostraram que em associação com o noni, a cisplatina demonstrou efeitos adicionais na indução de apoptose. Segundo os autores, essa indução ocorreu pelo aumento na produção da proteína p53, em 9% (tratamento com noni), 18% (tratamento com cisplatina) e 43% (noni + cisplatina) em células HeLa e 26% (tratamento com noni), 41% (tratamento com cisplatina) e 54% (noni + cisplatina).

Outra equipe de pesquisadores foi surpreendida com a indução da morfologia normal, em um tipo particular de célula encontrada em neoplasias humanas, que se multiplicam descontroladamente e tornam-se malignas. Essa indução ocorreu pela influência do damnacantal, uma antraquinona extraída a partir do extrato clorofórmico dos frutos (HIRAMATSU et al., 1993). Outro estudo mostrou que o suco comercial de noni levou à redução na formação de adutos no DNA em células do coração (30%), pulmão (41%), fígado (42%) e rim (80%), em ratos previamente tratados com o carcinógeno químico 7,12-dimetilbenzenoantraceno e, posteriormente tratados com o suco de noni (WANG; SU, 2001).

Em suma, o noni tem sido alvo de diversas pesquisas por suas propriedades nutracêuticas e terapêuticas, pela presença de vários compostos bioativos apresentando as mais variadas atividades farmacológicas de interesse para o desenvolvimento de medicamentos para as doenças humanas. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigação da bioatividade dos compostos isolados e/ou frações, elucidação de mecanismos de ação e realização de ensaios clínicos para comprovação de sua efetividade e ausência de toxicidade (SINGH, 2013).

2.9.4. Compostos isolados do fruto de noni

Segundo Singh (2013), cerca de 200 fitoquímicos têm sido identificados de diferentes estruturas e/ou órgãos da planta de noni e, esses fitoquímicos diferem muito dependendo da parte da planta. As principais classes de metabólitos isolados de noni incluem ácidos (octanoico e hexanoico) (FARINE et al., 1996), álcoois, fenóis, antraquinonas, cumarinas, glicosídeos, carotenoides, ésteres, flavonoides, iridoides, cetonas, lactonas, lignanas, nucleosídeos, terpenoides e esteróis. A maioria destes compostos têm sido isolados e identificados com o auxílio de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa e cromatografia gasosa (PAWLUS; KINGHORN, 2007).

Os principais compostos voláteis presentes no estágio maduro (cor âmbar claro) e demasiadamente maduro (cor marrom escuro), correspondem ao ácido octanoico (em torno de 70% do extrato total) e hexanoico (aproximadamente 8% do extrato total), sendo responsáveis pelo odor pronunciado do fruto de noni (PINO et al., 2010), conforme notas de odor de Arctander (1969).

Os compostos fenólicos representam o maior grupo de compostos bioativos do fruto de noni. Entre eles, as antraquinonas são as mais relatadas, incluindo damnacantal, morindona e morindina, além da cumarina escopoletina (WANG; SU, 2001). Dentre as antraquinonas, o damnacantal é destacado por sua atividade antitumoral e anti-HIV (KAMATA et al., 2006).

Pawlus et al. (2005), identificou e isolou um potente indutor de quinona redutase, a 2-metóxi-1,3,6-trihidróxi antraquinona, com potencial 40 vezes maior que o sulforafano, fitoquímico com atividade anticarcinogênica que estimula a produção de enzimas que desempenham papel crucial na desintoxicação por agentes cancerígenos (SEGEN'S MEDICAL DICTIONARY, 2012), porém sua concentração no fruto é muito baixa, mas seu potencial biológico faz dessa substância, uma biomolécula promissora na prevenção tumoral, ainda na fase de iniciação (PAWLUS et al., 2005). No entanto, alguns estudos mostraram que células em cultura são capazes de acumular quantidades de antraquinonas superiores aos níveis encontrados na planta, através da otimização das condições de cultivo, apresentando significativo potencial para a exploração comercial dessas substâncias (LUCILLA; JOHANNES, 1995; LUCILLA; MARC; JOHANNES, 1995; MARC et al., 2003).

As cumarinas, da classe dos compostos fenólicos, são derivadas do metabolismo da fenilalanina (YU et al., 2005). Isoladas em 1820 da planta cumaru, *Dipteryx odorata* Willd. (Fabaceae) (BRUNETON, 1999), são classificadas como membro das benzopironas, que consistem em um anel benzeno associado a um anel pirona (OJALA, 2001), conforme Figura 5.

As benzopironas são divididas em benzo- α -pironas e benzo- γ -pironas, das quais os flavonoides são os principais membros. Há quatro principais subtipos de cumarinas: as cumarinas simples, as furanocumarinas, as piranocumarinas e as cumarinas pirona-substituídas (KEATING; O'KENNEDY, 1997), conforme Tabela 1.

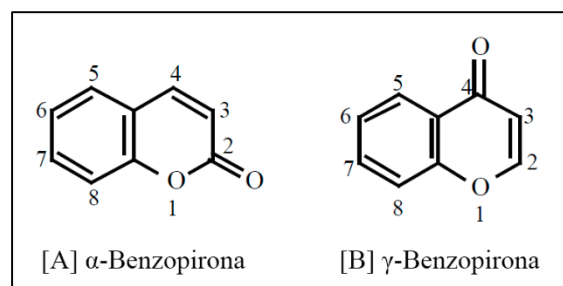
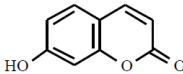
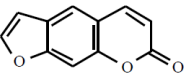
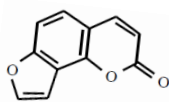
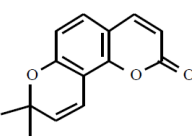
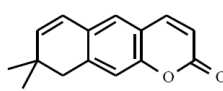
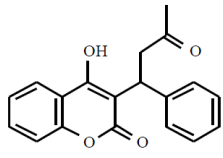


Figura 5. As estruturas químicas de subclasses com benzopirona, a estrutura base de cumarina (benzo- α -pirona) [A], e flavonoide (benzo- γ -pirona) estrutura [B] (LACY; O'KENNEDY, 2004).

Tabela 1. Principais características estruturais e exemplos de cada subtipo de cumarina (Lacy; O'Kenned, 2004).

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	EXEMPLOS
CUMARINAS SIMPLES	Hidroxilado, alcoxlado ou alquilado no anel benzeno	 7-Hidroxicumarina (Espocoletina)
FURANOCUMARINAS	Anel furano de 5 membros ligado ao anel benzeno. Linear ou Angular	 Psolareno  Agelicina
PIRANOCUMARINAS	Anel pirano de 6 membros ligado ao anel benzeno. Linear ou Angular	 Seselina  Xantiletina
CUMARINAS PIRONA-SUBSTITUÍDAS	Substituição no anel pirona, muitas vezes em posições 3-C ou 4-C.	 Warfarina

As cumarinas desempenham papéis fundamentais na bioquímica e fisiologia da planta, com envolvimento nas ações dos reguladores de crescimento, controle da fotossíntese, além de defesa contra infecção. Esses metabólitos são extremamente variáveis, devido os vários tipos de substituições em sua estrutura básica, que influencia em suas atividades biológicas (KOSTOVA, 2006).

A escopoletina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina (Figura 6), um derivado de cumarina, constitui um dos compostos mais representativos do noni, podendo ser utilizada como marcador no controle de qualidade de produtos à base de noni (SAMOYLENKO et al., 2006). Sua atividade farmacológica envolve a capacidade de controlar o nível de serotonina no organismo (LEVAND; LARSON, 1979), atividade anti-inflamatória (KANG et al., 1999; KIM et al., 2004; DENG et al., 2007; MOON et al., 2007), antiproliferativa, por meio da indução de apoptose em células tumorais (YU et al., 2008), antioxidante (IKEDA et al., 2009), além do papel no envelhecimento celular, induzindo à apoptose, pela ativação da proteína p53 em fibroblastos de pulmão humano (NAM; KIM, 2015).

Outro composto fenólico, derivado de cumarinas, é a isoescopoletina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina (Figura 6), identificada pela primeira vez no suco de noni por Liu et. al. (2007). A isoescopoletina é produto da demetilação de cumarina e, devido à sua forte atividade antioxidante, pode ser empregada como um potencial sequestrante de radicais livres para evitar doenças relacionadas à oxidação (LIU et. al., 2007). Além disso, inibe a proliferação de linhagens celulares de leucemia (CCRF-CEM) e linhagem resistente à múltiplas drogas (CEM/ADR5000) (ADAMS; EFFERTH; BAUER, 2006) e a proliferação do vírus da hepatite B em sistemas celulares (LI et. al., 2005).

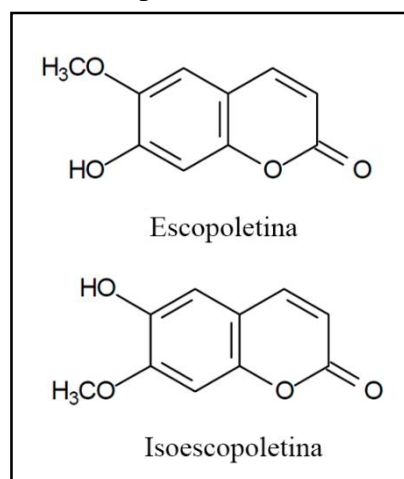


Figura 6. Estrutura química da escopoletina e da isoescopoletina.

3. Referências

- ACHATZ, M.I.W.; MAKDISSI, F.B.A.; ASHTON-PROLLA, P. Oncogenética. In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. **Oncologia para a Graduação**. São Paulo: Lemar, 2013. p. 173-187.
- ADAMS, M.; EFFERTH, T.; BAUER, R. Activity-Guided Isolation of Scopoletin and Isoscopoletin, the Inhibitory Active Principles towards CCRF-CEM Leukaemia Cells and Multi-Drug Resistant CEM/ADR5000 Cells, from *Artemisia argyi*. **Planta Medica**. v. 72, p. 862-864, 2006.
- ALADE, P.I.; IROBI, O.N. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 39, p. 171-174, 1993.
- ALMEIDA, J.A.C.; BARRETO, A.N.F. O tempo geológico e a evolução da vida. In: CARVALHO, I.S. (Ed.), **Paleontologia: Conceitos e Métodos**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010. p. 93-109.
- ALVES, H.M. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/divers.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer prevention and early detection facts and figures. Atlanta: **American Cancer Society**, 2013.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Orgs.) **Mutagenese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 281-307.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Disponível em <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103202-10>>. Acesso em 23 mar. 2015.
- ARCTANDER, S. **Perfume and flavor chemicals**. Copenhagen: Det Hoffensbergske Etablissement, 1969.
- ARNT, R. Tesouro Verde. **Exame**. Ano 35, n. 9, 2001.
- ATKINSON, N. Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. **Australian Journal of Experimental Biology**. v.34, p. 17-26, 1956.
- AXELROD, D.E. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**. v. 73, p. 181-184, 1972.
- BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A. **Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996.
- BENJAMIN, C.R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycology**. v. 47, p. 669-687, 1955.

- BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: BERNHOFT, A. (Ed.), **Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals**. Oslo: Novus Forlag, 2010. 255p.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; LUBERT, S. (2008), **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545p.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Review production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**. v. 161, p. 839-851, 2001.
- BRAUS, G. H.; KRAPPMANN, S.; ECKERT, S. E. Sexual development in ascomycetes: fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. **Molecular biology of fungal development**. p. 215-244, 2002.
- BREMER, B. Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. **Opera Botanica Belgica**. v. 7, p. 33-50, 1996.
- BREMER, B.; JANSEN, R.K.; OXELMAN, B.; BACKLUND, M.; LANTZ, H.; KIM, K.J. More characters and more taxa for a robust phylogeny-case study from the coffee family (Rubiaceae). **Systematic Biology**. v. 48, p. 413-35, 1999.
- BRUGGNECATE, J.T. **Native plants can heal your wounds**. Honolulu: Star-Bulletin Local News, 1992.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Hampshire: Intercept Ltda., 1999. p. 263-277.
- CALIXTO, J.B. Biopirataria. A diversidade biológica na mira da indústria farmacêutica. **Ciência Hoje**. v. 28, p. 36-43, 2000.
- CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v. 71, p. 58-65, 2000.
- CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Reviews Genetics**. v. 3, p. 683-697, 2002.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, p. 99-105, 1998.
- CHAMPE, S.P.; NAGLE, D.L.; YAGER, L.N. Sexual sporulation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.D. (Eds.), **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. p. 429-454.
- CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; 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.
- CHANG, C.; CHAN, H.; LIN, H.; WAY, T.; KAO, M.; SONG, M.; LIN, Y.; LIN, C. Rhein induces apoptosis in human breast cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012, p. 1-8, 2012.

CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 783p.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: CHOY, W.N. (Ed.), **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Marcel Dekker Inc, 2001, p. 93-113.

CHUNHIENG, T. **Développement de nouveaux neutraceutiques a partir de graines et fruits d'origine tropicale: application a la noix du Brésil *Bertholettia excelsa* et au fruit de Cambodge *Morinda citrifolia***. France: 2003. 181f. Thèse (Docteur) - Université de Nancy, France, 2003.

COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 170-7, 2006.

COLEY, P.D.; HELLER M.V.; AIZPRUA, R.; ARAUZ, B.; FLORES, N.; CORREA, M.; GRUPTA, M.; SOLIS, P.N.; ORTEGA-BARRIA, E.; ROMERO, L.I. Using ecological criteria to design plant collection strategies for drug discovery. **Frontiers in Ecology and the Environment**. v. 1, p. 421-8, 2003.

CONABIO, Comissão Nacional de Biodiversidade, 2015. <<http://portal.cnm.org.br/v4/v11/institucional/documento.asp?iId=33851>>. Acesso em: 17 mar 2015.

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, p. 609-615, 2011.

COX, P.A. Ensuring equitable benefits: the Falealupo covenant and the isolation of anti-viral drug prostratin from a Samoan medicinal plant. **Pharmaceutical Biology**. v. 39, p. 33-40, 2001.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**. v. 17, p. 153-163, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 72-79, 2005.

CRAGG, G.M.; SCHEPARTZ, S.A.; SUFFNEZ, M.; GREVER, M.R. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the lager-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**. v. 56, p. 1657-1668, 1993.

D'ENFERT, C. Fungi spore germination: insights from the molecular genetics of *A. nidulans* and *N. crassa*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 21, p. 163-172, 1997.

DE LUCA, V.; ST PIERRE, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**. v. 5, p. 168-173, 2000.

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

DENG, S.; WEST, B.J.; JENSEN, J.C. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**. v. 122, p. 267-270, 2010.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**. v. 122, 627-633, 2000.

EFSA - EUROPEAN COMMISSION SCIENTIFIC COMMITTEE OF FOOD, 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food of Tahitian Noni Juice. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out151_en.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2013.

EL-SOHEMY, A. Nutrigenetics. **Forum of Nutrition Home**. v. 60, p. 25-30, 2007.

EL-SOHAIFY, S.A. Functional foods and nutraceuticals modern approach to food Science. **World Applied Sciences Journal**. v. 20, p. 691-708, 2012.

ERDTMANN, B.A. Genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422p.

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

FARNSWORTH, N.R.; BINGEL, A.S. Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants by pharmacological screening. IN: WAGNER H.; WOLFF, P. (Eds.), **New Natural products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**. Berlin: Springer, 1977. p. 1-22.

FENECH, M. Genome health, nutrigenomics and nutrigenetics: diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 1365-1370, 2008.

FERGUSON, L.R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**. v. 198, p. 147-159, 2004.

FERRO, A.F.P.; BONACELLI, M.B.M.; ASSAD, A.L.D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão e Produção**. v. 13, p. 489-501, 2006.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**. v. 7, 2006.

GANEM, R.S. **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília: Edições Câmara, 2010. 437p.

GARCÍA, A.A.; CARRIL, E.P.U. **Metabolismo secundário de plantas. Reduca (Biologia). Serie Fisiologia Vegetal**. v. 2, p. 119-145, 2009.

GERMAN, J.B.; ROBERTS, M.A.; WATKINS, S.M. Genomics and metabolomics as markers for the interaction of diet and health: lessons from lipids. **The Journal of Nutrition**. v. 133, p. 2078S-2083S, 2003a.

GERMAN, J.B.; ROBERTS, M.A.; WATKINS, S.M. Personal metabolomics as a next generation nutritional assessment. **The Journal of Nutrition**. v. 133, p. 4260-4266, 2003b.

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, F.S. Carotenoides: uma possível proteção contra o desenvolvimento do câncer. **Revista de Nutrição**. v. 20, p. 537-548, 2007.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 247-280.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Molecular Mutagenesis**. v. 6, p. 153-188, 1984.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**. Brasília: UNB, 2005. 392p.

GRONBAEK, M.; BECKER, U.; JOHANSEN, D.; GOTTSCHAU, A.; SCHNOHR, P.; HEIN H.O.; JENSEN, G.; SORENSEN, T.I. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. **Annals of Internal Medicine**. v. 133, p. 411-419, 2000.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 13-23.

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.

HALLIWELL, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. **Nutrition Reviews**. v. 57, p. 104-113, 1999.

HAYASHI, M.; TICE, R.R.; MACGREGOR, J.T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D.H.; KIRSCH-VOLDERS, M.; OLESON, F.B.JR.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleous assay. **Mutation Research**. v. 312, p. 293-304, 1994.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. London: Academic Press, 1993, 318p.

HIRAMATSU, T.; IMOTO, M.; KOYANO, T.; UMEZAWA, K. Induction of normal phenotypes in RAS transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. **Cancer Letters**. v. 73, p. 161-166, 1993.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E.; CHOU, S.C.; HOKAMA, Y. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice. **Proceedings of the Western Pharmacological Society**. v.39, p. 7-9, 1996.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity. **Phytotherapeutic Research**. v.13, p. 380-387, 1999.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152 p.

HOZIER, J.; APPLGATE, M.; MOORE, M.M. *In vitro* mammalian mutagenesis as a model for genetic lesions in human cancer. **Mutation Research**. v. 270, p. 201-209, 1992.

IKEDA, R.; WADA, M.; NISHIGAKI, T.; NAKASHIMA, K. Quantification of coumarin derivatives in noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. **Food Chemistry**. v. 113, p. 1169-1172, 2009.

IUFOST, International Union of Food Science and Technology. **Nutrigenomics**. Scientific Information Bulletin (SIB), 2012. Disponível em: <<http://www.iufost.org/iufostftp/IUF.SIB.Nutrigenomics.pdf>>. Acesso em: 23 mar 2015.

JENSEN, C. J.; WEST, B.; OGDEN, R.V.; STORY, S.P. A method for freeze concentrating *Morinda citrifolia*. **United States Patent**. 6.855.354, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Kanabara Koogan, 2011. 332p.

KALRA, E.K. Nutraceuticals definition and introduction. **American Association of Pharmaceutical Sciences**. v. 5, p. 27-28, 2003.

KAMATA, M.; WU, R.P.; AN, D.S.; SAXE, J.P.; DAMOISEAUX, R.; PHELPS, M.E.; HUANG, J.; CHEN, I.S. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 348, p. 1101-1106, 2006.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.52, p. 5843-5848, 2004.

KANG, T.H.; PAE, H.O.; JEONG, S.J.; YOO, J.C.; CHOI, B.M.; JUN, C.D.; CHUNG, H.T.; MIYAMOTO, T.; HIGUCHI, R.; KIM, Y.C. Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituents from *Artemisia feddei*. **Planta Medica**. v. 65, p. 400-403, 1999.

KEATING, G.; O'KENNEDY, R. The Chemistry and Occurrence of Coumarins. In: O'KENNEDY, R.; THORNES, R.D. (Eds.), **Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action**. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 23-66.

KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; BOONE, C.W.; MALONE, W.A.; HAWK, E.T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J.A.; KOPELOVICH, L.; ALI, I.; VINER, J.L.; SIGMAN, C.C. Progress in cancer chemoprevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 889, p.1-13, 1999.

KIM, H.J.; JANG, S.I.; KIM, Y.J.; CHUNG, H.T.; YUN, Y.G.; KANG, T.H.; JEONG, O.S.; KIM, Y.C. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS stimulated cell line, Raw 264.7 cells. **Fitoterapia**. v. 75, p. 261-266, 2004.

KOJIMA, H.; KONISHI, H.; KURODA, Y. Combined mutagenicity of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**. v. 266, p. 171-180, 1992.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as antioxidants. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 365-374, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 726-732, 2005.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 3797-3811, 2004.

LEVAND, O.; LARSON, H.O. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. **Planta Medica**. v. 36, p. 186-187, 1979.

LI, H.; ZHOU, C.X.; PAN, Y.; GAO, X.; WU, X.; BAI, H.; ZHOU, L.; CHEN, Z.; ZHANG, S.; SHI, S.; LUO, J.; XU, J.; CHEN, L. ZHENG, X.; ZHAO, Y. Evaluation of Antiviral Activity of Compounds Isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus*. **Planta Medica**. v. 71, p. 1128-1133, 2005.

LIU, C.; XUE, Y.; YE, Y.; YUAN, F.; LIU, J.; SHUANG J. Extraction and Characterization of Antioxidant Compositions From Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Agricultural Sciences in China**, v. 6, p. 1494-1501, 2007.

LIMA, P.L.; RIBEIRO, L.R. Teste de mutação gênica em células de mamífero (mouse lymphoma assay). In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 113-149.

LUCILLA, B.; JOHANNES, T. Increased anthraquinone production by *Morinda citrifolia* in a two-phase system with Pluronic F-68. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 17, p. 353-358, 1995.

LUCILLA, B.; MARC, H.; JOHANNES, T. Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Journal of Biotechnology**. v. 39, p. 149-155, 1995.

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

MARC, S.; ANNE-MARIE, K.; RIANNE, L.; JUANITA, H.J.V.; JOBIEN, C.W.; GEORGE, J.W.; ANTON, F.C. Regulation of anthraquinone biosynthesis in cell cultures of *Morinda citrifolia*. **Journal of Plant Physiology**. v. 160, p. 607-614, 2003.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 736p.

- MARQUES, R.C.P.; MEDEIROS, S.R.B.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGNEZ-LIMA, L.F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research**. v. 536, p. 117-120, 2003.
- MARTIN, J.F.; DEMAINE, A.L. The filamentous fungi. In: SMITH, J.E.; BERRY, D.R. (Eds.), **Developmental Mycology**. London: Edward Arnold, 1978.
- MARTINELLI, S.D. *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R., (Eds.), **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. p. 33-58.
- MATHIVANAN, N.; SURENDIRAN, G.; SRINIVASAN, K.; SAGADEVAN, E.; MALARVIZHI, K. Review on the current scenario of noni research: taxonomy, distribution, chemistry, medicinal and therapeutic values of *Morinda citrifolia*. **International Journal of Noni Research**. v. 1, p. 1-16, 2005.
- MCKOY, M.L.G.; THOMAS, E.A.; SIMON, O.R. Preliminary investigation of the antiinflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (noni). **Pharmacological Society**. v. 45, p. 76-78, 2002.
- MIAN-YING, W.; DIANE, N.; GARY, A.; JARAKAE, J.; BRETT, W. Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (noni). **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 63, p. 59-63, 2008.
- MILLER, B.L. The developmental genetics of asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. **Seminars on Developmental Biology**. v. 1, p. 207-219, 1990.
- MOHD, Z.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**. v.78, p. 227- 231, 2001.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24, p. 105-111, 2001.
- MOON, P.D.; LEE, B.H.; JEONG, H.J.; AN, H.J.; PARK, S.J.; KIM, H.R.; KO, S.G.; UM, J.Y.; HONG, S.H.; KIM, H.M. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. **European Journal of Pharmacology**. v. 555, p. 218-225, 2007.
- MORTON, J.F. The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some its "colourful" relatives. **Ecological Botany**. v. 46, p. 241-256, 1992.
- MYERS, N.; MILTTERMEIER, R.A.; MILTTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAM, H.; KIM, M.M. Scopoletin has a potential activity for anti-aging via autophagy in human lung fibroblasts. **Phytomedicine**. v. 22, p. 362-368, 2015.
- NIERMAN, W.C.; MAY, G.; KIM, H.S.; ANDERSON, M.J.; CHEN, D.; DENNING, D.W. What the *Aspergillus* genomes have told us. **Medical Mycology**. v. 43, p. 3-5, 2005.
- NICOLAOU, K.C.; CHEN, J.S.; DALBY, S.M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 2290-303, 2009.

OJALA, T. **Biological Screening of Plant Coumarins**. Helsinki: University of Helsinki, Helsinki, 2001. 62p. PhD (Thesis) - Division of Pharmacognosy. Department of Pharmacy. Faculty of Science University of Helsinki, Helsinki, 2001.

OLIVEIRA, M. BUSTOS, S.; DELLAMANO, M. Chemical and physical carcinogens. In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. (Eds.), **Oncologia para graduação**. São Paulo: Lemar, 2013, p. 54-61.

ORDOVAS, J.M. Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 83, p. 443S-446S, 2006.

ORDOVAS, J.M.; KAPUT, J.; CORELLA, D. Nutrition in the genomics era: cardiovascular disease risk and the mediterranean diet. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 51, p. 1293-1299, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, 1998.

OSMANI, S.A.; MIRABITO, P.M. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetic Biology**. v. 41, p. 401-410, 2004.

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 and Pharmacology**. v. 59, p. 1587-1609, 2007.

PAWLUS, A.D.; SU, B.N.; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Natural Products**. v. 68, p. 1720-1722, 2005.

PEDERSEN, A.; JOHANSEN, C.; GRONBAEK, M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. **Gut**. v. 52, p. 861-867, 2003.

PEÑALVA, M.A.; GALINDO, A.; ABENZA, J.F.; PINAR, M.; CALCAGNO-PIZARELLI, A.M.; HERBERT N. ARST-JR, H.N.; PANTAZOPOULOU, A. Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. **Cellular Logistics**. v. 2, p. 1-13, 2012.

PINO, J.A.; MÁRQUEZ, E.; QUIJANO, C.E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 183-187, 2010.

PINTO, L.F.R.; FELZENSWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 29-48.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; CHEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. v. 5, p. 141-238, 1953.

RATES, S.M.K. Plants as a source of drugs. **Toxicicon**. v.39, p. 603-613, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 858p.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**. v. 11, p. 495-510, 2009.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173-198.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 21-27.

RICHARD, A.M. Application of SAR methods to non-congeneric databases associated with carcinogenicity and mutagenicity: Issues and approaches. **Mutation Research**. v. 305, p.73-97, 1994.

ROCHA, C.L.M.S.C. **Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para a conidiogênese em *Aspergillus nidulans***. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 203p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

ROCHA, C.L.M.S.C.; AZEVEDO, J.L. Use of the methG1 reversion system of *Aspergillus nidulans* for the detection of mutagenicity of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine. **Revista Brasileira de Genética**. v. 9, p. 393-405, 1986.

RODRIGUES, M.G. **A pesquisa para a Conservação da Biodiversidade no Brasil: a ecologia a partir de um enfoque interdisciplinar**. Campinas: UNICAMP, 2009. 270p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Política Científica e Tecnológica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ROSS, I.A. **Medicinal plants of the world**. Totowa: Humana Press, 2001. 623p.

SAKAMOTO-HOJO, E.T.; MELLO, S.S.; CARDOSO, R.S.; PASSOS, G.A.S. Utilização de genômica funcional e proteômica em mutagênese. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 309-329.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 201-219.

SAMOYLENKO, V.; ZHAO, J.; DUNBAR, D.C.; KHAN, I.A.; RUSHING, J.W.; MUHAMMAD, I. New constituents from Noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 6398-6402, 2006.

SANG, S.; WANG, M.; HE, K.; LIU, G.; DONG, Z.; BADMAEV, V.; ZHENG, Q.Y.; GHAI, G.; ROSEN, R.T.; HO, C.T. Chemical components in Noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.) In: HO, C.T.; ZHENG, Q.Y. (Eds.), **Quality Management of Nutraceuticals**. Whashington: American Chemical Society Symposium, 2002. p. 134-150.

SANHUEZA, J.C.; VALENZUELA, A, B. Nutrigenomics: revealing molecular aspects of a personalized nutrition. **Revista Chilena de Nutrición**. v. 39, p. 71-85, 2012.

SCARLATTI, F.; SALA, G.; SOMENZI, G. Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. **The FASEB Journal**. v. 17, p. 2339-2341, 2003.

SEGEN'S MEDICAL DICTIONARY, 2012. Disponível em: sulphoraphane. Acesso em: 31 mar. 2015.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**. New York: Springer, 2001. p. 1-39.

SHAY, N.F.; BANZ, W.J. Regulation of gene transcription by botanicals: novel regulatory mechanisms. **Annual Review of Nutrition**. v. 25, p. 297-315, 2005.

SCHIMIDT, B.M.; RIBNICKY, D.M.; LIPSKY, P.E.; RASKIN, I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. **Nature Chemical Biology**. v. 3, p. 360-366, 2007.

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

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. **Oncologia para a Graduação**. São Paulo: Lemar, 2013. p. 112-121.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2007. 1102p.

SINGH, D.R. *Morinda citrifolia* (noni): a review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Global Journal of Hematology and Endocrinology**. v. 1 p. 55-69, 2013.

SINGH, Y.; IKAHIHIFO, T.; PANUVE, M.; SLATTER, C. Folk medicine in Tonga: A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynecological conditions and disorders. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 12, p. 305-25, 1984.

SOUSA, G.D.; ZUCCHI, T.D.; ZUCCHI, F.D.; MILLER, R.G.; ANJOAS, R.M.A.; POLI, P.; ZUCCHI, T.M.A.D. *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect the genotoxic effects of mercury fumes on eukaryotes. **Genetics and Molecular Research**. v. 8, p. 404-413, 2009.

SOUZA, V.C.; LORENZI H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 768p.

STEVENSON, W.G.; FRIEDMAN, P.L. In: HENNEKENS, C.H. (Eds.), **Clinical trials in cardiovascular disease**. Philadelphia: WB Saunders Co, 1999. p. 217-230.

STOVER, P.J. Influence of human genetic variation on nutritional requirements. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 83, p. 436S-442S, 2006.

STRUWE L. Gentianales (Coffees, Dogbanes, Gentians and Milkweeds). **Encyclopedia of life sciences**, 2002. Disponível em: <<http://gentian.rutgers.edu/reffiles/Struwe%202002%20ELS%20Gentianales.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

SU, B.N.; PAWLUS, A.D.; JUNG, H.A.; 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.

SUBBIAH, R.M.T. Review: Understanding the Nutrigenomic Definitions and Concepts at the Food-Genome Junction. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**. v. 12, p. 229-235, 2008.

SUBBIAH, M.T.R. Application of Nutrigenomics in Skin Health Nutraceutical or Cosmeceutical? **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**. v. 3, p. 44-46, 2010.

SWANHOLM, C.E.; ST JOHN, H.; SCHEUER, P.J. A survey of alkaloids in Hawaiian plants. **Pacific Science**. v.13, p. 295-305, 1959.

TAYLOR, C.M.; STEYERMARK, J.A.; DELPRETE, P.G.; VICENTINI, A.; CORTÉS, R.; ZAPPI, D.; PERSSON, C.; COSTA, C.B.; ANUNCIACÃO, E.A. Rubiaceae. In: STEYERMARK, J.A.; STEYERMARK, J.S.; BERRY, P.E.; HOLST, B.K. (Eds.), **Flora of the Venezuelan Guayana**. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2004. p. 497-848.

TELESIL, M.; MACHADO, F.A. A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. **Revista Saúde e Biologia**. v.3, p. 40-49, 2008.

TIMBERLAKE, W.E.; CLUTTERBUCK, A.J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. (Eds.), **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. p. 383.

TIMBERLAKE, W.E.; MARSHALL, M.A. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. **Trends in Genetics**. v. 4, p. 162-169, 1988.

TROTTIER, G.; BOSTRÖM, P.J.; LAWRENTSCHUK, N.; FLESHNER, N.E. Nutraceuticals and prostate cancer prevention: A current review. **Nature Reviews Urology**. v. 7, p. 21-30, 2010.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella thyphimurium* (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 81-108.

VASCONCELOS, F.A.G. The Science of nutrition in transit: from nutrition and dietetics to nutrigenomics. **Revista de Nutrição**. v. 23, p. 935-945, 2010.

VEIGA, R.F.A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENAÇOLLI, S.L.J.; TOMBOLATO, A.F.; COSTA, A.A. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **O Agrônomo**. v. 57, p. 20-21, 2005.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; LI, P.W.; MURAL, R.J., SUTTON, G.G.; SMITH, H.O.; YANDELL, M.; EVANS, C.A.; HOLT, R.A.; GOCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R.M.; HUSON, D.H.; WORTMAN, J.R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C.D.; ZHENG, X.H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P.D.; ZHANG, J.; GABOR-MIKLOS, G.L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A.G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V.A.; ZINDER, N.; LEVINE, A.J.; ROBERTS, R.J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A.E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T.J.; HIGGINS, M.E.; JI, R.P.; KE, Z.; KETCHUM, K.A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G.V.; MILSHINA, N.; MOORE, H.M.; NAIK, A.K.; NARAYAN, V.A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D.B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZAHNG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; NA, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M.L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y.H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N.N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J.F.; GUIGÓ, R.; CAMPBELL, M.J.; SJOLANDER, K.V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y.H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of human genome. *Science*. v. 291, p. 1304-1351, 2001.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; TAYLOR, J.L.S.; ELGORASHI, E.E.; MAES, A.; VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; VAN STADEN, J. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicology in vitro*. v. 18, p. 29-35, 2004.

YAGER, L.N. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. In: BENNET, J.W.; KLICH, M.A. (Ed.), **Aspergillus: biological and industrial applications**. Massachusetts: Butterworth, 1992. p. 19-42.

YU, H.; LI, S.; HUANG, M.T.; HO, C.T. Antiinflammatory constituents in noni (*Morinda citrifolia*) fruits. In: HO, C.T.; SIMON, J.E.; SHAHIDI, F.; SHAO, Y. (Eds.), **Dietary Supplements**, Washington: American Chemical Society, Symposium Series, 2008, p. 179-190, 2008.

YU, J.; WANG, L.; WALZEM, R.L.; MILLER, E.G. Antioxidant activity of *Citrus* limonoids, flavonoids and coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 2009-2014, 2005.

YUILL, E. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*, **Transactions of the British Mycological Society**. v. 33, p. 324-331, 1950.

YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argus, 2001. 523p.

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.Y.; WEST, B.; 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.

WASSON, G.R.; MICKLELVEY-MARTIN, V.J.; DOWNES, C.S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**. v. 23, p. 153-162, 2008.

WEST, B. J.; DENG, S.; JENSEN, C. J. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni pure. **Food Research International**. v. 44, p. 2295-2301, 2011.

WEST, B.J.; JENSEN, C.J.; WESTENDORF, J. Noni juice is not hepatotoxic. **World Journal of Gastroenterology**. v. 12, p. 3616-3619, 2006.

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.

WINK, M. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. **Advances in Phytomedicine**. v. 3, p. 251-268, 2006.

WHISTLER, W.A. Traditional and herbal medicine in the Cook Islands. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 13, p. 239-80, 1985.

WÜRGLER, F.E.; VOGEL, E. *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: DE SERRES, F.J (Ed.), **Chemical mutagens, principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1986. p. 1-72.

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.

CAPÍTULO 2

Extrato bruto e frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) inibem a proliferação celular de linhagens tumorais humanas

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Food Chemistry* (Anexo 1).

Extrato bruto e frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) inibem a proliferação celular de linhagens tumorais humanas

David Teixeira Guidoti^{1*}, Daniela Granella Gomes Guidoti¹, Adriano Lopes Romero², Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz³, Mary Ann Foglio³, João Ernesto de Carvalho³, Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha¹

¹Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

³Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Endereço correspondência: Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, PGB - Bloco G-80, Sala 201, Tel.: 55 17 3011 1750, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Autor para correspondência: davidguidoti@live.com

Resumo

Inúmeras bioatividades têm sido atribuídas ao noni (*Morinda citrifolia*), inclusive a atividade antitumoral. Mais de 200 fitoquímicos têm sido isolados de diversas partes da planta. No presente trabalho, isolou-se a isoescopoletina a partir da fração acetato de etila e, foi avaliado o efeito antiproliferativo do extrato bruto etanólico e das frações acetato de etila e n-hexânica dos frutos (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em oito linhagens tumorais humanas (U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCI-H40, PC-3, OVCAR-03 e K562), além da linhagem não tumoral HaCat. Os resultados evidenciaram que o extrato bruto etanólico mostrou atividade antiproliferativa específica para a linhagem OVCAR-03. A fração acetato de etila foi citostática contra todas as linhagens testadas (IC_{50} de 7,3 a 82,0) e citocida para OVCAR-03. A fração n-hexânica foi a mais bioativa, citostática sobre todas as linhagens (IC_{50} de 0,59 a 25,2). Concentrações superiores a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da fração n-hexânica foram citocidas sobre todas as linhagens. Ambas as frações constituem uma fonte promissora para o isolamento de compostos quimiopreventivos podendo ser empregadas com segurança em baixas concentrações.

Palavras-chave

Isoescopoletina; Anticâncer; Antiproliferativo; Quimioprevenção; Compostos bioativos

Abstract

Several bio-activities, including anti-tumor activity, have been attributed to noni (*Morinda citrifolia*) and more than 200 phyto-chemicals have been isolated from several parts of the plant. Isoscopoletin was isolated from the ethyl acetate fractions and the anti-proliferation effect of the crude ethanol extract and of ethyl acetate and n-hexane extract of the fruits (0.25; 2.5; 25 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was assessed in eight human tumor strains (U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCI-H40, PC-3, OVCAR-03 and K562), and in the non-tumor HaCat strain. Results showed that the crude ethanol extract had an anti-proliferation factor specific to the strain OVCAR-03. The ethyl acetate fraction was cytostatic against all tested strains (IC_{50} 7.3 - 82.0) and cytotoxic for OVCAR-03. The n-hexane fraction was more bio-active and cytostatic for all strains (IC_{50} 0.59 - 25.2). Concentrations over 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the n-hexane fraction were cytotoxic for all strains. The two fractions are a promising source for the isolation of chemo-preventive compounds and may be safely used in low concentrations.

Keywords

Isoscopoletin; Anticancer; Anti-proliferation; Chemo-prevention; Bioactive compounds.

Highlights

- A isoscopoletina é o composto majoritário e pode ser isolado da fração acetato de etila de frutos de noni;
- As doses citotóxicas do extrato bruto e fração acetato de etila são seletivas para a linhagem OVCAR-03, não citotóxica para a linhagem celular normal HaCat, mesmo em concentrações maiores;
- A fração n-hexânica é citotóxica para células tumorais e normais, sendo segura em concentrações menores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- O extrato bruto etanólico e as frações acetato de etila e n-hexânica são fontes promissoras para isolamento de quimiopreventivos.

1. Introdução

As plantas são utilizadas pela humanidade desde a antiguidade, na alimentação, cura de doenças e na agricultura (Viegas Jr; Bolzani e Barreiro, 2006). Além de fornecerem proteínas, lipídios e hidratos de carbono, constituem uma fonte de substâncias com atividades farmacológicas (Vasconsuelo e Boland, 2007).

Morinda citrifolia L. (Rubiaceae), popularmente conhecida como noni, é uma planta nativa da Ásia e Polinésia que tem sido tradicionalmente empregada com fins terapêuticos (Wang et al., 2002) contra várias doenças como diabetes, hipertensão, infecções, artrite, asma, dores, câncer (Sang et al., 2002; Chan-Blanco, Vaillant, Perez, Reynes, Brillouet e Brat, 2006), síndrome da imunodeficiência adquirida, úlceras gástricas, depressão, senilidade e aterosclerose (Wang et al., 2002; Kamiya, Tanaka, Endang, Umar e Satake, 2004).

Diversas atividades farmacológicas têm sido atribuídas ao noni, como a atividade antibacteriana (Atkinson, 1956), antiviral (Kamata et al., 2006), antioxidante (Mohd, Abdul-Hamid e Osman, 2001), anti-inflamatória (Mckoy, Thomas e Simon, 2002) e antitumoral (Hiramatsu, Imoto, Koyano e Umezawa, 1993; Wang e Su, 2001; Wang et al., 2002; Gupta, Banerje, Pathak, Sharma, Singh, 2013).

Segundo Singh (2013) cerca de 200 fitoquímicos têm sido isolados e identificados de diferentes partes da planta de noni. Os mais importantes compostos identificados no fruto incluem substâncias fenólicas, como o damnacantal e a escopoletina, ácidos orgânicos, vitaminas e aminoácidos (Chan-Blanco et al., 2006). Entre esses compostos, a escopoletina, um derivado de cumarina, é um dos compostos mais representativos no noni, apresentando atividades antimicrobianas e anti-inflamatória, além de atividade antioxidante bem elucidada (Deng, Palu, West, Su, Zhou e Jensen, 2007).

Os compostos bioativos, típicos de plantas, são aqueles que provocam alguma atividade farmacológica ou tóxica no homem e nos animais (Bernhoft, 2010). São produzidos sob a forma de metabólitos secundários, geralmente apresentam baixo peso molecular e, encontram-se em baixas concentrações, sendo produzidos por determinados grupos de plantas, com atividades biológicas marcantes (Berg, Tymoczko e Lubert, 2008).

Entre as atividades biológicas, a antitumoral é relatada para compostos de origem vegetal desde 1950 (Cragg e Newman, 2005). Desde então, inúmeros agentes antitumorais, obtidos a partir de plantas, têm sido empregados no tratamento contra o câncer (Rocha, Lopes e Schwartzmann, 2001).

Por suas propriedades nutracêuticas e terapêuticas, o noni tem sido alvo de pesquisas na busca por novos compostos bioativos que poderão servir como base para o desenvolvimento

de medicamentos. Além disso, ensaios devem ser realizados a fim de comprovar sua eficiência e ausência de toxicidade de seus isolados e/ou frações (Singh, 2013). Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi isolar compostos bioativos e identificar frações com atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais humanas, contribuindo para a elucidação dos efeitos citotóxicos dessas frações e, subsidiando o uso de novos compostos aliados aos tratamentos quimioterápicos e formulação de fitoterápicos e profiláticos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Vegetal

Frutos de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), em estágio imaturo, provenientes do sítio São José, município de Urânia, São Paulo, Brasil (20°15.375'S; 50°36.806'W, 460 metros de altitude), foram coletados no verão, em janeiro de 2014. O clima da região é tropical com estação seca (classificação climática de Köppen-Geiger: Aw). Material testemunho foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUM), Maringá, Paraná, Brasil sob número 28153.

2.2. Extração e Isolamento Químico

Os frutos frescos de *Morinda citrifolia* (6 kg), foram triturado em liquidificador doméstico e submetidos, inicialmente, à extração exaustiva com etanol absoluto (3 L) em temperatura ambiente (28°C), por sete dias, seguido de filtração. O extrato etanólico foi particionado em n-hexano (50 mL) e acetato de etila (50 mL). Ambas as frações foram combinadas, separadamente, e concentradas em evaporador rotativo à 40°C, para eliminação dos solventes extratores, rendendo ao final 3,0 e 2,5g de extrato, respectivamente.

O extrato n-hexânico (2,5g) foi submetido à cromatografia em coluna (\varnothing 20 mm) sílica gel 60 (30g), com granulometria 70-230 mesh, eluída com n-hexano e gradientes de mistura de n-hexano/EtOAc (1%; 2%; 3%; 4%; 5% e 10%), resultando em 95 frações. Para o extrato EtOAc (1,5g) foi realizado procedimento semelhante, porém, a coluna foi eluída com gradientes de concentração de n-hexano/EtOAc (50%; 60%; 70%; 80%; 90% e EtOAc 100%), resultando em 80 frações.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de alumínio cobertas de sílica-gel 60 UV254 com 0,20 mm de espessura, adquiridas da Merck, como fase estacionária, utilizando n-hexano 100% e/ou n-hexano/EtOAc em diferentes proporções, como fase móvel. A fração n-hexânica foi preparada para CCD nas proporções de n-hexano/EtOAc (20%; 10%; 5% e n-hexano 100%), semelhantemente os frascos da fração EtOAc foram

preparados nas proporções n-hexano/EtOAc (50%; 60% e 70%). As frações foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico. Os tubos da fração n-hexânica FH-1 (1-4) e FH-2 (54-55 e 62-65) e da fração EtOAc FA-1 (30-35), foram unidos entre si, separadamente, e analisados por ressonância magnética nuclear (RMN).

2.3. Espectrometria de RMN

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetro Gemini 300P-Varian Instrumentos (300,06 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou o CDCl_3 (δ 7,27). Os solventes utilizados foram todos deuterados. Os sinais obtidos foram caracterizados, conforme recomendação da AUREMN, como: s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto, quint. = quinteto, sept = septeto, m = multiplete, dd = duplo duplete, dt = duplo tripleto, dq = duplo quarteto. As constantes de acoplamento (J) foram citadas em Hertz. Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P-Varian Instrumentos (75,45 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou o CDCl_3 (δ 77,00). O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN de ^{13}C , com o auxílio das técnicas de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (90 e 135, onde CH_3/CH = sinal positivo, CH_2 = sinal negativo e C_0 = ausente).

2.4. Análise da atividade antiproliferativa *in vitro*

A atividade antiproliferativa dos extratos etanólico, n-hexânico e acetato de etila foi avaliada em oito linhagens celulares tumorais humanas, gentilmente cedidas pelo National Cancer Institute (Frederick, MA, USA): U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-03 (ovário); K562 (leucemia) e HaCat (queratinócitos imortalizados, linhagem não tumoral).

As linhagens foram crescidas em meio contendo 5 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL), suplementado com 5% de soro bovino fetal e adição de gentamicina (50 mg mL^{-1}). As células foram dispostas em placas contendo 96 poços ($10 \mu\text{L}$ células/poço) e expostas às concentrações das amostras dissolvidas em DMSO/RPMI (0,25; 2,5; 25 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$), a 37°C com 5% de CO_2 atmosférico, por 48 horas. A concentração final de DMSO não afeta a viabilidade celular. Foi utilizado a doxorrubicina como controle positivo.

As células foram então fixadas com ácido tricloroacético 50% e a proliferação celular determinada por quantificação espectrofotométrica (570 nm) do conteúdo de proteína celular, empregando o teste sulforradamina B (Monks, Scudiero e Skehan, 1991). A concentração que inibe 50% do crescimento (IC_{50}) foi determinada pela curva-resposta de cada linhagem celular, por meio de análise de regressão não-linear pelo software ORIGIN 7.5.

Se $T > C$, existiu estimulação do crescimento celular. Se $T \geq T_0$, mas $> C$, existiu uma atividade citostática e a fórmula utilizada será $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. Se $T < T_0$, existiu atividade citocida e a fórmula utilizada será $100 \times [(T-T_0)/T_0]$. T = média das células tratadas, C = controle das células e T_0 = controle das células no dia de adição das amostras. Também é possível subtrair o resultado obtido de 100%, obtendo-se a porcentagem de inibição de crescimento (IC). As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Extração Química

A separação cromatográfica do extrato n-hexânico resultou no isolamento de duas frações, FH-1 e FH-2, em que ambas apresentaram apenas um composto na CCD, utilizando vários sistemas de eluentes diferentes. Enquanto que na fração acetado de etila, foi possível isolar apenas uma fração, FA-1, que se apresentou pura na análise de CCD.

A partir da análise dos dados de RMN de 1H e ^{13}C , foi possível identificar a fração FH-1 como sendo um éster de ácido graxo; a fração FH-2 como ácido octanoico, isolado anteriormente de noni por Farine et al. (1996) e Sang et al. (2002) e a fração FA-1 como a cumarina isoescopoletina (Figura 1), isolada de noni por Liu et al. (2007).

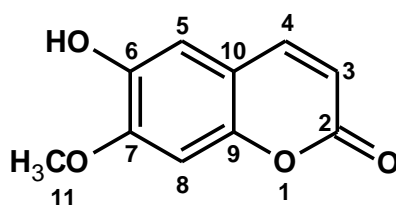


Figura 1. Estrutura molecular da cumarina isoescopoletina.

Os deslocamentos químicos de RMN de 1H e ^{13}C da cumarina isoescopoletina, apresentados na Tabela 1, são concordantes com dados da literatura (Zhao et al., 2014; Liu et al., 2007; El-Bassuony e Abdel-Hamid, 2006).

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz) e de ^{13}C (75,45 MHz), em CDCl_3 , da cumarina isoescopoletina.

No.	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	No.	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> em Hz)
1			7	143,9	
2	161,3		8	103,0	6,93 (<i>sl</i>)
3	111,4	6,28 (<i>d</i> , 9,3)	9	150,2	
4	143,2	7,61 (<i>d</i> , 9,3)	10	113,3	
5	107,2	6,86 (<i>sl</i>)	11	56,3	3,96 (<i>s</i>)
6	149,6				

A isoescopoletina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, foi isolada da fração acetato de etila (FA-1). Liu et. al. (2007) a isolaram pela primeira vez, também, na fração EtOAc, a partir do suco fermentado do fruto de noni. Os autores a descrevem como um pó branco amorfo, com ponto de fusão de 185 a 187°C, classificada como composto fenólico, derivado de cumarina, resultante da demetilação de cumarina e, devido à sua forte atividade antioxidante, pode ser empregada como um potencial sequestrante de radicais livres para evitar doenças relacionadas à oxidação.

As principais classes de metabólitos isolados de noni incluem ácidos orgânicos (octanoico e hexanoico) (Farine, Legal, Moreteau e Quere, 1996), álcoois, fenóis, antraquinonas, cumarinas, glicosídeos, carotenoides, ésteres, flavonoides, iridoides, cetonas, lactonas, lignanas, nucleosídeos, terpenoides e esteróis. A maioria destes compostos têm sido isolados e identificados com o auxílio de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa e cromatografia gasosa (Pawlus, Su, Keller e Kinghorn, 2007).

Os principais compostos voláteis presentes no estágio maduro (cor âmbar claro) e demasiadamente maduro (cor marrom escuro), correspondem ao ácido octanoico (em torno de 70% do extrato total) e hexanoico (aproximadamente 8% do extrato total), sendo responsáveis pelo odor pronunciado do fruto de noni (Pino, Márquez, Quijano e Castro, 2010), conforme notas de odor de Arctander (1969). No presente trabalho verificou-se a presença de ácido octanoico no fruto imaturo, mesmo sendo majoritário em frutos com maior grau de maturação.

Vários dos glicosídeos isolados por Wei, Ho e Huang (2011), apresentaram ácidos graxos hidrolisáveis, como o ácido octanoico, ácido hexanoico e álcool, como o 3-metil-3-buten-1-ol. Estes isolados, a partir de glicosídeos de noni, incluem um éster de ácido graxo de trissacarídeo, 2,6-di-O-(β -D-glucopiranosil)-1-Hexanoil- β -D-glucopiranosídeo e dois ésteres de ácidos graxos de dissacarídeo, 6-O-(β -D-glucopiranosil)-1-O-hexanoil-D-glucopiranosídeo

e 6-O-(β -D-glucopiranosil)-1-O-octanoil- β -D-glucopiranosideo. Os ésteres de ácidos graxos de sacarídeos são os precursores destes ácidos e ésteres no fruto de noni. Eles também são os principais contribuintes para o aroma do fruto maduro. Os autores identificaram trinta e três ésteres no suco de noni, mostrando que os ésteres de ácidos octanoico e hexanoico são os ésteres majoritários identificados.

3.2. Atividade Antiproliferativa

O extrato bruto etanólico e as frações acetato de etila e n-hexânica dos frutos de *Morinda citrifolia* foram submetidos à avaliação da atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais humanas e na linhagem celular não tumoral humana HaCat (queratinócitos imortalizados), utilizando como controle positivo a doxorrubicina, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular (IC₅₀) de linhagens tumorais e normal humanas tratadas com extrato e frações de frutos de *Morinda citrifolia*

Tratamentos	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)								
	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H40	PC-3	OVCAR-03	K562	HaCat
Doxorrubicina	<0,025	<0,025	<0,025	0,02782	0,02666	0,09014	<0,025	<0,025	0,15463
Extrato EtOH	>250	>250	2,5	>250	>250	>250	<0,025	>250	>250
Fração n-Hex	24,7	9,0	3,7	25,2	1,6	25,0	0,59	3,5	23,3
Fração AcOEt	38,6	28,9	39,8	82,0	39,0	72,6	7,3	35,2	48,1

Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); K562 (leucemia). Linhagem não tumoral humana: HaCat (queratinócitos imortalizados).

O extrato bruto etanólico mostrou seletividade e foi ativo em concentrações menores que $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a linhagem OVCAR-03 (ovário), inibiu ainda em 50% a proliferação da linhagem NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos) na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme Figura 3.

Candida et al. (2014) testaram o extrato etanólico de frutos de *Morinda citrifolia*, mostrando que houve a diminuição da atividade celular com inibição de 45% da taxa de proliferação celular da linhagem de melanoma B16-F10 na concentração de 10 mg mL^{-1} , tratadas por 48h. Em contrapartida, o presente trabalho mostrou que concentrações menores que $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibem a proliferação celular da linhagem tumoral de ovário humano OVCAR-03, no mesmo tempo de tratamento.

Hirazumi, Furusawa, Chou e Hokama (1996) e Hirazumi e Furusawa (1999) identificaram no precipitado da fração etanólica do suco de noni, uma substância rica em polissacarídeos composta por galactose, arabinose e ramnose, que apresentou efeito imunomodulador e antitumoral contra carcinoma de pulmão.

No presente trabalho, a concentração $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto etanólico não apresentou efeito citostático contra nenhuma das demais linhagens testadas. Thani, Vallisuta, Siripong e Ruangwises (2010), utilizando extratos etanólico, aquoso e metanólico das folhas frescas também não observaram efeitos antiproliferativos significativos em todas as linhagens celulares testadas: KB (carcinoma epidermoide humano), Hela (carcinoma cervical humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e Vero (célula de rim de macaco verde africano), com IC_{50} de 103 a valores maiores que $600 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A fração n-hexânica apresentou efeito citostático sobre todas as linhagens testadas, com IC_{50} de 0,59 a $25,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4), evidenciando que é a fração mais bioativa, sendo mais seletiva para a linhagem OVCAR-03 (ovário), seguida das linhagens: NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); K562 (leucemia); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos) e MCF-7 (mama) que apresentaram atividade antiproliferativa em concentrações menores que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em concentrações menores que $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, a atividade citostática desta fração foi observada nas linhagens: U251 (glioma); PC-3 (próstata) e 786-0 (rim). Concentrações superiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostram efeito citocida sobre todas as linhagens testadas.

A fração acetato de etila apresentou atividade citostática contra todas as linhagens testadas com IC_{50} de 7,3 a $82,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando maior seletividade para a linhagem OVCAR-03 (ovário), onde também apresentou atividade citocida, evidente na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando ainda, leve efeito citocida para a linhagem MCF-7 (mama), conforme Figura 5.

Nesta fração foi isolado a isoescopoletina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, identificada pela primeira vez por Liu et al. (2007), também na fração EtOAc, a partir do suco fermentado do fruto de noni. A isoescopoletina inibe a proliferação de linhagens celulares de leucemia (CCRF-CEM) e linhagem resistente à múltiplas drogas (CEM/ADR5000) com IC_{50} de 2,6 a $4,6 \mu\text{M}$, respectivamente (Adams, Efferth e Bauer, 2006) e a proliferação do vírus da hepatite B em sistemas celulares, nas concentrações 4 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Li et. al., 2005). Portanto, pode-se atribuir a esse composto majoritário, presente na fração EtOAc, conforme dados cromatográficos preliminares, a atividade antiproliferativa seletiva e citocida encontrada contra a linhagem OVCAR-03 e MCF-7.

Além de extratos e frações do fruto, outras partes de *Morinda citrifolia* têm demonstrado atividade antiproliferativa contra diversas linhagens antitumorais, como demonstrado por Thani et al. (2010), que analisaram o efeito antiproliferativo do extrato diclorometano de folhas frescas de noni, indicando melhor efeito contra células KB (carcinoma epidermoide) e HeLa (carcinoma cervical), com IC₅₀ de 21,67 e 68,50 µg mL⁻¹, respectivamente. Os autores ainda avaliaram o efeito antiproliferativo do extrato diclorometano de folhas secas de noni, revelando IC₅₀ de 39,00 µg mL⁻¹ contra as células KB.

Também foi demonstrado por Wang et al. (2002), o efeito citotóxico do suco comercial de *Morinda citrifolia* em linhagens celulares de leucemia, em várias concentrações, levando-as à necrose. Além disso, foi observado o efeito sinérgico do suco com o agente antitumoral taxol, aumentando sua eficiência quando administrado em conjunto com o suco, induzindo 100% das linhagens de leucemia à apoptose, representando uma alternativa no tratamento de câncer.

O efeito sinérgico também foi evidente no estudo realizado por Gupta et al. (2013), no qual o suco, em conjunto com o agente antitumoral cisplatina, induziu apoptose em linhagens HeLa e SiHa de câncer de colo uterino, de forma mais eficiente, pelo aumento na produção da proteína p53.

Outra descoberta significativa foi observada no trabalho de Hiramatsu et al. (1993), no qual houve indução da morfologia normal, em um tipo particular de célula encontrada em neoplasias humanas que se multiplica desordenadamente e torna-se maligna. Segundo os autores, essa indução ocorreu pela influência do damnacantal, antraquinona extraída a partir do extrato clorofórmico dos frutos de *Morinda citrifolia*.

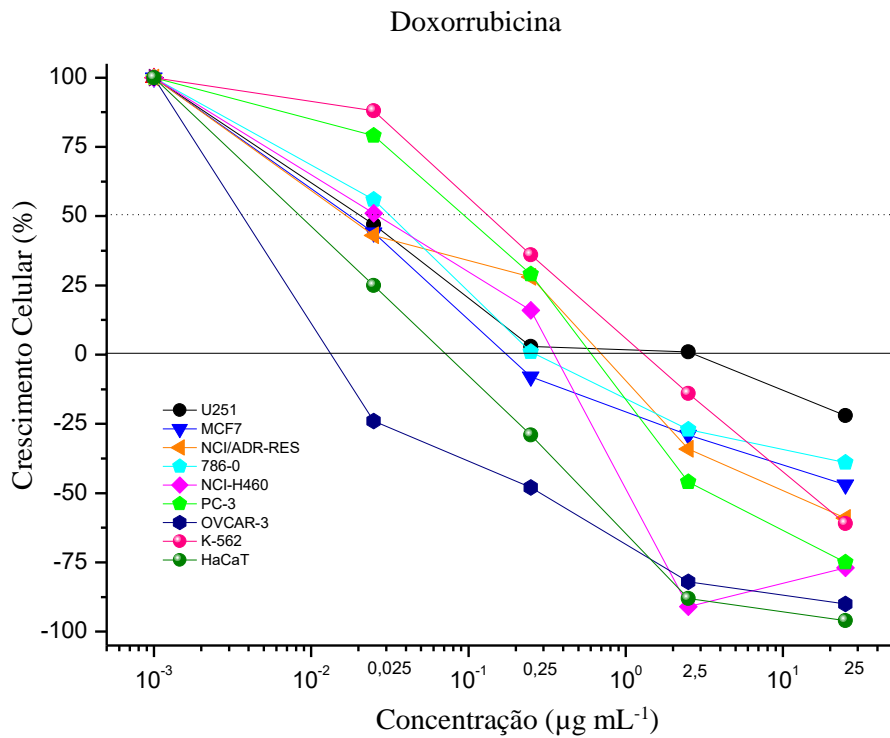


Figura 2. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹) da doxorubicina (controle positivo).

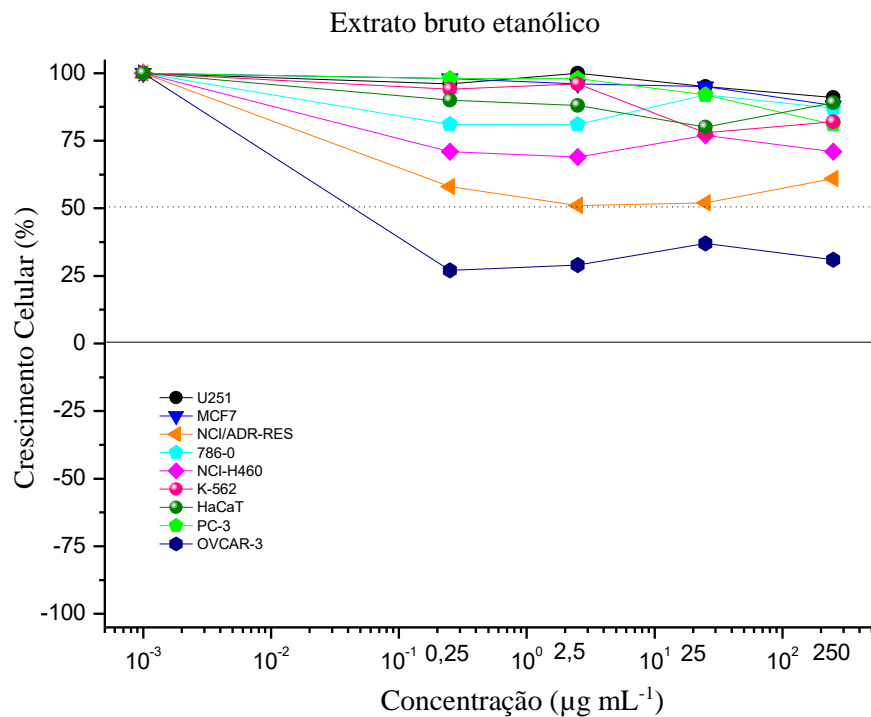


Figura 3. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹) do extrato bruto etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia*, após 48 de exposição.

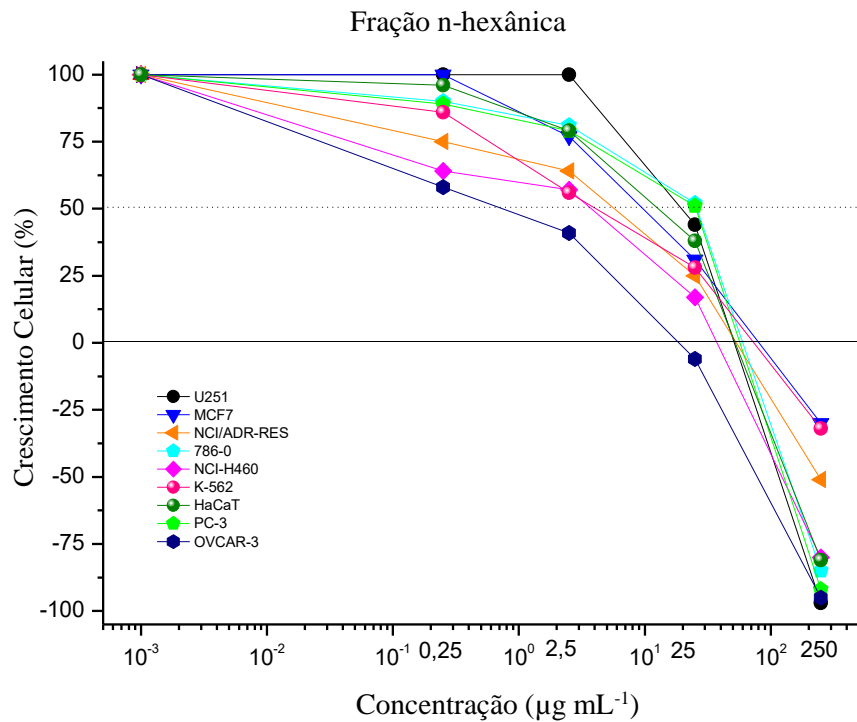


Figura 4. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹) da fração n-hexânica dos frutos de *Morinda citrifolia*, após 48 de exposição.

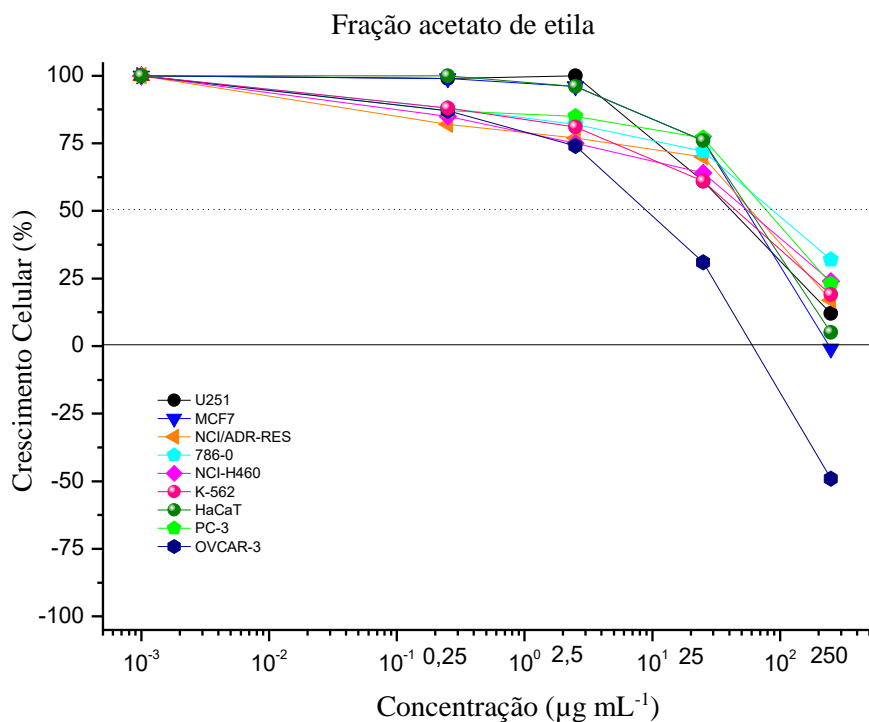


Figura 5. Porcentagem de crescimento celular das linhagens tumorais e normal humana, em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹) da fração acetato de etila dos frutos de *Morinda citrifolia*, após 48 de exposição.

4. Conclusão

Com base na comparação dos tratamentos com a linhagem de células não tumoral humana, HaCat (queratinócitos imortalizados), ficou evidente para o extrato bruto etanólico que as doses citostáticas são seletivas para a linhagem tumoral OVCAR-03 (ovário), não sendo citotóxica inclusive para a linhagem celular normal HaCat, mesmo em concentrações maiores, assim como a fração acetato de etila. Contudo, a fração n-hexânica é citocida tanto para células tumorais quanto células normais, porém é segura sendo utilizada em concentrações de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pois nessa concentração já apresenta efeitos antiproliferativos para todas as linhagens testadas.

A partir do fracionamento por cromatografia de coluna foi possível isolar a isoescopoletina e, por essa apresentar-se como composto majoritário, com base na cromatografia de camada delgada preliminar, pode-se atribuir a esse composto a ação antiproliferativa.

Portanto, vários compostos têm sido identificados no fruto de noni, com potencial antiproliferativo, podendo agir independentemente, sinergicamente a outros compostos presentes nos extratos e/ou frações, ou mesmo auxiliando a potencialização de quimioterápicos tradicionais, como demonstrado por alguns estudos.

A quimiodiversidade presente no fruto de noni reflete nos diferentes motivos de ação biológica, podendo ter múltiplas vias de ação no metabolismo celular, resultando na proteção biológica pela via de reparo, no controle da programação genética ou mesmo na morte celular programada e/ou modulação do sistema imunológico.

Baseado nos resultados apresentados no presente trabalho, concluímos que o extrato bruto etanólico e as frações acetato de etila e n-hexânica dos frutos de *Morinda citrifolia* são fontes promissoras de compostos bioativos com potencial antiproliferativo em baixas concentrações.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo financiamento e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Paulínia, São Paulo e Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, Paraná, pelo suporte técnico. Ao Dr. Elnatan Bezerra de Souza da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Ceará, Brasil, pela confirmação botânica do espécime utilizado e, ao Sr. Paulo César Batista por ceder os frutos de noni.

Referências

- Adams, M., Efferth, T., & Bauer, R. (2006). Activity-Guided Isolation of Scopoletin and Isoscapoletin, the Inhibitory Active Principles towards CCRF-CEM Leukaemia Cells and Multi-Drug Resistant CEM/ADR5000 Cells, from *Artemisia argyi*. *Planta Medica*, *72*, 862-864.
- Arctander, S. (1969). *Perfume and flavor chemicals*. Copenhagen: Det Hoffensbergske Etablissement.
- Atkinson, N. (1956). Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. *Australian Journal of Experimental Biology*, *34*, 17-26.
- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. In: A. Bernhoft (Ed.), *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals* (pp.11-17). Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Lubert, S. (2008). *Bioquímica*. (6ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Candida, T., França, J. P., Chaves, A. L. F., Lopes, F. A. R., Gaiba, S., Sacramento, C. K., Ferreira, L. M., & França, L. P. (2014). Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. *Acta Cirúrgica Brasileira*, *29*, 10-14.
- Chan-Blanco, Y., Vaillant, F., Perez, A. M., Reynes, M., Brillouet, J. M., & Brat, P. (2006). The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 645-654.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*, 72-79.
- Deng, S., Palu, A. K., West, B. J., Su, C. X., Zhou, B. N., & Jensen, J. C. (2007). Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *Journal of Natural Products*, *70*, 859-862.
- El-Bassuony, A. A., & Abdel-Hamoid, N. M. (2006). Antibacterial coumarins isolated from *Launaea resedifolia*. *Chemistry of Plant Raw Materials*, *1*, 65-68.
- Farine, J. P., Legal, L., Moreteau, B., & Quere, J. L. L. (1996). Volatile compounds of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry*, *41*, 433-438.
- Gupta, R. K., Banerjee, A., Pathak, S., Sharma, C., & Singh, N. (2013). Induction of mitochondrial-mediated apoptosis by *Morinda citrifolia* (Noni) in human cervical cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *14*, 237-242.
- Hiramatsu, T., Imoto, M., Koyano, T., & Umezawa, K. (1993). Induction of normal phenotypes in RAS transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Letters*, *73*, 161-166.

- Hirazumi, A., Furusawa, E., Chou, S. C., & Hokama, Y. (1996). Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice. *Proceedings of the Western Pharmacological Society*, 39, 7-9.
- Hirazumi, A., & Furusawa, E. (1999). An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumor activity. *Phytotherapeutic Research*, 13, 380-387.
- Kamata, M., Wu, R.P., An, D.S., Saxe, J.P., Damoiseaux, R., Phelps, M.E., Huang, J., & Chen, I.S. (2006). Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348, 1101-1106.
- Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M., & Satake, T. (2004). Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 5843-5848.
- Li, H., Zhou, C. X., Pan, Y., Gao, X., Wu, X., Bai, H., Zhou, L., Chen, Z., Zhang, S., Shi, S., Luo, J., Xu, J., Chen, L., Zheng, X., & Zhao, Y. (2005). Evaluation of Antiviral Activity of Compounds Isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus*. *Planta Medica*, 71, 1128-1133.
- Liu, C., Xue, Y., Ye, Y., Yuan, F., Liu, J., & Shuang, J. (2007). Extraction and Characterization of Antioxidant Compositions From Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni). *Agricultural Sciences in China*, 6, 1494-1501.
- Mckoy, M. L. G., Thomas, E. A., & Simon, O. R. (2002). Preliminary investigation of the antiinflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (noni). *Pharmacological Society*, 45, 76-78.
- Mohd, Z., Abdul-Hamid, A., & Osman, A. (2001). Antioxidative activity extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*, 78, 227- 231.
- Monks, A., Scudiero, D., & Skehan, P. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 757-766.
- Pawlus, A. D., Su, B. N., Keller, W. J., & Kinghorn, A. D. (2005). An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Natural Products*, 68, 1720-1722.
- Pino, J. A., Márquez, E., Quijano, C. E., & Castro, D. (2010). Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 183-187.
- Rocha, A. B., Lopes, R. M., & Schwartzmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1, 364-369.
- Sang, S., Wang, M., He, K., Liu, G., Dong, Z., Badmaev, V., Zheng, Q. Y., Ghai, G., Rosen, R. T., & Ho, C. T. (2002). Chemical components in Noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). In: C. T. Ho, & Q. Y. Zheng (Eds.), *Quality Management of Nutraceuticals* (pp. 134-150). Whastington: American Chemical Society Symposium.

- Singh, D. R. (2013). *Morinda citrifolia* (noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. *Global Journal of Hematology and Endocrinology*, *1*, 55-69.
- Thani, W., Vallisuta, O., Siripong, P., & Ruangwises, N. (2010). Anti-proliferative and antioxidant activities of Thai Noni/Yor (*Morinda citrifolia* Linn.) leaf extract. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *41*, 482-489.
- Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, *172*, 861-875.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V. S., & Barreiro, E. J. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, *29*, 326-337.
- Wang, M. Y., & Su, C. (2001). Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (noni). *Annals of the New York Academy of Sciences*, *952*, 161-168.
- Wang, M. Y., West, B., Jensen, C. J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. K., & Anderson, G. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, *23*, 1127-1141.
- Wei, G., Ho, C., & Huang, A. S. (2011). Analysis of Volatile Compounds in Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L.) Juice by Steam Distillation-Extraction and Solid Phase Microextraction Coupled with GC/AED and GC/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, *19*, 33-29.
- Zhao, D., Zhao, Q., Liu, L., Chen, Z., Zeng, W., Lei, H., & Zhang, Y. (2014) Compounds from *Dryopteris fragrans* L. Schott with Cytotoxic Activity. *Molecules*, *19*, 3345-3355.

ANEXO 1

Food Chemistry

Author information pack

Description

Food Chemistry publishes original research papers dealing with the advancement of the **chemistry** and **biochemistry** of **foods** or the analytical methods/ approach used. All papers should focus on the novelty of the research carried out.

Topics include:

- Chemistry relating to major and minor **components of food**, their nutritional, physiological, sensory, flavour and microbiological aspects;
- **Bioactive constituents** of foods, including antioxidants, phytochemicals, and botanicals. Data must accompany sufficient discussion to demonstrate their relevance to food and/or food chemistry;
- Chemical and biochemical composition and structure changes in molecules induced by processing, distribution and domestic conditions;
- **Effects of processing** on the composition, quality and safety of foods, other biobased materials, by-products, and processing wastes;
- Chemistry of **food additives, contaminants**, and other agro-chemicals, together with their metabolism, toxicology and food fate.

Analytical papers related to the microbiological, sensory, nutritional, physiological, authenticity and origin aspects of food. Papers should be primarily concerned with new or novel methods (especially instrumental or rapid) provided adequate validation is described including sufficient data from real samples to demonstrate robustness. Papers dealing with significant improvements to existing methods, or data from application of existing methods to new foods, or commodities produced in unreported geographical areas, will also be considered.

- Methods for the determination of both major and minor components of food especially nutrients and non-nutrient bioactive compounds (with putative health benefits) will be considered.
- Results of method inter-comparison studies and development of food reference materials for use in the assay of food components;
- Methods concerned with the chemical forms in food, nutrient bioavailability and nutritional status;

- General authentication and origin [e.g. Country of Origin Labelling (COOL), Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI), Certificate of Specific Character (CSC)] determination of foods (both geographical and production including commodity substitution, and verification of organic, biological and ecological labelling) providing sufficient data from authentic samples should be included to ensure that interpretations are meaningful.

Food Chemistry will not consider papers that focus on purely clinical or engineering aspects without any contribution to chemistry; pharmaceutical or non-food herbal remedies; or survey/surveillance data. Papers on therapeutic application of food compounds/isolates for treatment, cure or prevention of human diseases will not be considered for inclusion in Food Chemistry.

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including no more than 6 tables - additional tables and figures can be submitted as supplementary material). Research papers should not contain more than 40 references.

2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Review articles should not contain more than 80 references.).

3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. These papers should not contain more than 30 references.

5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. Book reviews.

Preparation

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript.

Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal and email addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text, figures and tables should be submitted as separate files. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all

affiliations with a lower case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be

included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and

personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf. Accessed 14.02.11.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/usecitation-style/food-chemistry>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to

the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

CAPÍTULO 3

Citogenotoxicidade de frações de noni (*Morinda citrifolia* L.) em células de hepatoma humano (HepG2) e antimutagenicidade em *Aspergillus nidulans*

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (Anexo 2).

Citogenotoxicidade de frações de noni (*Morinda citrifolia* L.) em células de hepatoma humano (HepG2) e antimutagenicidade em *Aspergillus nidulans*

David Teixeira Guidoti^{1*}, Daniela Granella Gomes Guidoti¹, Adriano Lopes Romero², Mariana Salvado Pinhão³, Maria João Silva³, Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha¹

¹Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

³Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

Endereço correspondência: Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, PGB - Bloco G-80, Sala 201, Tel.: 55 17 3011 1750, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Autor para correspondência: davidguidoti@live.com

Resumo

Entre as plantas medicinais descobertas pelos antepassados da Polinésia, o noni, *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae), vem sendo utilizado há mais de dois mil anos pela tradicional medicina popular da região. Na farmacopeia, principalmente o fruto, folha e raiz, têm sido utilizados para prevenir e curar várias doenças, além do câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida, devido aos seus valores terapêuticos e nutricionais. Apesar das vantagens terapêuticas, alguns constituintes de plantas apresentam efeitos potencialmente tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Assim, a investigação de plantas é relevante na busca por drogas quimioterápicas potenciais e como uma medida de segurança para o seu uso pela população. O presente trabalho avaliou o potencial citotóxico e genotóxico das frações acetato de etila e n-hexânica do fruto de noni (2,5, 10, 25, 100, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em células de hepatoma humano (HepG2) e a atividade antimutagênica da fração acetato de etila (2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando como parâmetros, os testes de sobrevivência associado a análise do desenvolvimento vegetativo em *Aspergillus nidulans*. A fração acetato de etila não mostrou efeito citotóxico, pelo ensaio MTT, nem genotóxico, pelo teste do cometa, em nenhuma das concentrações testadas, indicando o uso seguro desta fração. Por outro lado, a fração n-hexânica induziu a proliferação de células HepG2, após 48 horas de exposição e, mostrou efeito genotóxico nas maiores concentrações. A fração acetato de etila demonstrou efeito antimutagênico em todas as concentrações e pró-apoptótico nas maiores. Os resultados apresentados contribuem para a elucidação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dessas frações e na identificação preliminar de extratos complexos, com atividade protetora do material genético, subsidiando a formulação de fitoterápicos, profiláticos e futuros estudos de identificação de compostos quimiopreventivos.

Palavras-chave

Ensaio do Cometa; Apoptose; Controle da Germinação; Quimioprevenção; Metabólitos secundários

Abstract

The *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae), also known as noni, is a medicinal plant used by the ancient inhabitants of the Polynesian Islands for more than two thousand years. The pharmacopeia lists the fruit, leaves and roots as a cure and a prophylaxis for several diseases, including cancer and acquired immunodeficiency syndrome, because of its therapeutic and nutritional qualities. In spite of several therapeutic assets, certain qualities of the plant may be potentially toxic, mutagenic, carcinogenic and teratogenic. An investigation on the plant is relevant for potential chemotherapeutic drugs and as a safe measure for the populations that use it as a medicine. Current thesis evaluated the cytotoxic and genotoxic potential of ethyl acetate and n-hexane fractions of the fruit of the noni (2.5; 10, 25, 100, 250 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on human hepatoma cells (HepG2). It also assesses the antimutagenic activity of ethyl acetate (2.5, 25 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), using as parameters, on survival tests associated to an analysis on the vegetative development of *Aspergillus nidulans*. The ethyl acetate fraction did not reveal any cytotoxic effect by MTT, nor any genotoxic effect by the comet assay in any of the concentration under analysis, which proved the safe use of the fraction. On the other hand, n-hexane fraction triggered the proliferation of cells HepG2 after 48 hours of exposure and demonstrated genotoxic effect in higher concentrations. The ethyl acetate fraction had an antimutagenic effect in all concentrations and a pro-apoptotic effect in the highest ones. Results contribute towards the elucidation on cytotoxic and genotoxic effects of the fractions and in the preliminary identification of complex extracts with the protecting activity of genetic material. The plant may be used in the preparation of phytotherapeutics and prophylactic medicines on the identification of chemo-preventive compounds.

Keywords

Comet assay; Apoptosis; Control of Germination; Chemo-prevention; Secondary metabolites.

Highlights

- A fração acetato de etila de noni não apresentou citogenotoxicidade, mas, efeito antimutagênico em todas as concentrações e pró-apoptótico, nas concentrações 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$;
- A fração n-hexânica de noni aumentou a viabilidade celular em baixas concentrações, sendo genotóxica nas concentrações 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- A fração acetato de etila é segura, quanto a toxicidade e danos no material genético, contudo, a fração n-hexânica pode ser cautelosamente utilizada em concentrações limítrofes a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo ambas fontes promissoras de quimiopreventivos.

1. Introdução

As plantas com potencial medicinal têm sido amplamente empregadas no tratamento de doenças na medicina popular [1]. Entre essas plantas, *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae), conhecida como noni, é indicada no tratamento de inúmeras doenças [2,3], além do câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida [4,5]. Mais de 200 fitoquímicos têm sido isolados de diferentes partes da planta de noni [6], sendo os compostos fenólicos, o maior grupo de compostos bioativos do fruto [7].

É inegável que as plantas fornecem uma rica fonte de compostos que constituem a base para formulação de medicamentos que contribuem para a saúde e sobrevivência humana [8]. No entanto, apesar das vantagens terapêuticas, alguns constituintes de plantas apresentam efeitos potencialmente tóxicos, carcinogênicos e teratogênicos [9-15]. Assim, a investigação de plantas é relevante na busca por drogas quimioterápicas potentes e, como uma medida de segurança para o seu uso pela população [16].

O ensaio do cometa é amplamente utilizado para avaliação da genotoxicidade [17], pois quantifica lesões primárias e potencialmente reversíveis no DNA, que podem se tornar mutações, caso não sejam reparadas [18]. Este ensaio pode ser empregado para o *screening* de compostos com potencial genotóxico desconhecido, para complementar testes de genotoxicidade positiva *in vitro* [17].

Além disso, com a adição de enzimas lesão-específica como a glicosilase formamidopirimidina (FPG), é possível identificar se o DNA sofreu danos oxidativos. Essa enzima tem a capacidade de quantificar purinas oxidadas, por meio da conversão dessas purinas em quebras de cadeias simples (passíveis de identificação pelo ensaio do cometa), por meio da excisão de bases [19].

Além do ensaio do cometa, devido seu rápido crescimento e por possuir um sistema genético bem caracterizado, várias espécies de *Aspergillus* têm sido empregadas em estudos sobre mutações, regulação gênica e genotoxicidade [20], além de pesquisas sobre recombinação gênica, reparo de DNA, controle do ciclo celular, tubulinas, cromatina, nucleocinese, patogênese, metabolismo [21] e genética do desenvolvimento [22,23].

Por possuir um sofisticado mecanismo de regulação da expressão de genes que coordenam a germinação, sua análise é um instrumento de observação do efeito de diversos fatores sobre os mecanismos de regulação da germinação [24,25], constituindo uma alternativa eficaz na triagem das atividades biológicas de agentes [26].

Ao longo do tempo, diversas partes da planta de noni têm sido amplamente utilizadas na medicina popular na prevenção ou cura de enfermidades [27]. No entanto, ensaios devem

ser realizados a fim de atestar sua efetividade e ausência de toxicidade de seus isolados e/ou frações [6].

Tradicionalmente, o noni tem se destacado como uma potencial fonte de compostos e frações de interesse biotecnológico e medicinal, não somente no tratamento e cura de doenças, mas na promoção de homeostasia e qualidade de vida. Nesse último contexto, a literatura carece de informações com relação à atividade antimutagênica de compostos e extratos que previnam lesões que comprometam o material genético. Além disso, a citotoxicidade e genotoxicidade de plantas com potencial medicinal, necessitam serem investigadas. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivos: avaliar o potencial citotóxico e genotóxico das frações acetato de etila e n-hexânica do fruto de noni em células de hepatoma humano (HepG2); e a atividade antimutagênica do extrato mais ativo biologicamente, acetato de etila, utilizando como parâmetros, os testes de sobrevivência de conídios associado à análise do desenvolvimento vegetativo em *Aspergillus nidulans*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

Frutos de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), em estágio imaturo, provenientes do sítio São José, município de Urânia, São Paulo, Brasil (20°15.375'S; 50°36.806'W, 460 metros de altitude), foram coletados no verão, em janeiro de 2014. O clima da região é tropical com estação seca (classificação climática de Köppen-Geiger: Aw). Material testemunho foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUM), Maringá, Paraná, Brasil sob número 28153.

2.2. Obtenção das frações

Os frutos frescos de *Morinda citrifolia* (6 kg), foram triturados em liquidificador doméstico e submetidos, inicialmente, à extração exaustiva com etanol absoluto (3 L) em temperatura ambiente (28°C), por sete dias, seguido de filtração. O extrato etanólico foi particionado em n-hexano, 50 mL x 3 (3g) e acetato de etila, 50ml x 3 (2,5g). Ambas as frações foram combinadas, separadamente, e concentradas em evaporador rotativo a 40°C, para eliminação dos solventes extratores.

2.3. Cultura de células

A linhagem celular de hepatocarcinoma (HepG2) foi obtida da Coleção de Cultura Tipo Americana (ATCC, n.º HB8065), que exhibe funções típicas de hepatócitos. As células

foram mantidas em cultura semanalmente em meio DMEM-F12, contendo L-Glutamax e tampão HEPES (25 mM), suplementado com 15% de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBSi), 1% de penicilina/estreptomicina (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e 10 mg mL^{-1} de estreptomicina) e 1,5% de anfotericina B (0,25 mg mL^{-1}), a 37°C, 5% de CO_2 . O meio de cultura celular e os suplementos foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.4. Avaliação da Citotoxicidade - Ensaio MTT

As células HepG2 foram mantidas em 96 poços (1×10^4) por 24 horas. Para o tratamento das células, amostras do extrato foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparo da solução estoque e então, foram sequencialmente diluídas em PBS (Invitrogen).

As células foram expostas por 24 ou 48 horas às concentrações de cada extrato de noni (2,5 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O controle negativo constou apenas de meio de cultura. Após a exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e o ensaio MTT foi realizado de acordo com métodos padronizados.

Resumidamente, 100 μL de solução MTT (Calbiochem) (0,5 mg mL^{-1} , concentração final no meio de cultura), foram adicionados à cada cultura celular durante três horas, a 37°C. Células com metabolismo ativo são capazes de converter o tetrazólio amarelo MTT em cristais de formazan púrpura, que são dissolvidos pela adição de 100 μL de DMSO durante 30 minutos, sob agitação (após remoção da solução de MTT).

A intensidade da coloração da solução foi quantificada por espectrofotômetro, a 540 nm (filtro de referência 690 nm), utilizando um espectrofotômetro Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Waltham, MA, EUA). A viabilidade celular relativa, expressa como a porcentagem de células viáveis, foi estimada como a razão entre a média de absorbância de células tratadas e do controle, assumindo que a absorbância média do controle negativo representa 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como o valor médio (\pm DP) de três ensaios independentes em cada condição de tratamento.

2.5. Avaliação da Genotoxicidade - Ensaio do cometa

As células HepG2 foram mantidas por 24 horas em poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço. As células foram então expostas por 24 horas a diferentes concentrações de extratos (2,5 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O controle positivo constou de 5 mM etil-metanossulfonato por 1 hora.

O ensaio do cometa foi realizado segundo Collins [28], com modificações para determinar o total de danos ao DNA [29]; o dano oxidativo ao DNA foi determinado pela adição da enzima glicosilase formamidopirimidina (FPG), lesão-específica.

Após o tempo de exposição, as suspensões celulares recuperadas (cerca de 4000 células), foram embebidas em 120 μL de agarose 0,8% LMP e espalhadas em lâminas microscópicas, previamente revestidas com NMP agarose (1%), como quatro repetições de sílica (cerca de 10 mL cada). Após solidificação do gel, as células foram imersas por 1 hora em solução de lise a frio (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA.2H₂O, 10 mM Tris, pH 10) à qual se adicionou 10% de DMSO e 1% de Triton X-100 antes da utilização.

As lâminas foram então lavadas (2 x 10 minutos) com tampão de enzima (HEPES 40 nM, KCl 100 nM, EDTA 0,5 mM, BSA 0,2 mg mL⁻¹, pH 8) e os géis foram tratados com 7,5 mL de cada FPG (em tampão de enzima) ou apenas tampão de enzima por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese a frio (300 nM de NaOH, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM, pH 13) por 40 minutos para permitir o desenrolamento do DNA e aumentar a expressão de sítios alcalino-lábeis. A eletroforese foi realizada durante 30 minutos a 0,7 V cm⁻¹, 300 mA, 4°C. As lâminas foram neutralizadas em PBS e colocadas para secar à temperatura ambiente antes de realizar a coloração com brometo de etídio (0,06 μg μL^{-1}).

Para cada tratamento, 100 nucleoides randomicamente selecionados (50 de cada gel), foram analisados utilizando microscópio de imagem epifluorescente - Axioplan 2, com câmara de alta resolução (Microscópio Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha).

A pontuação do cometa foi realizada com o software Imager 2.2 (MetaSystems, Altlussheim, Alemanha). A porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides foi registrada como uma medida do total de quebra das cadeias de DNA. Dois ensaios foram realizados, cada um com dois géis replicados por condição de tratamento.

2.6. Avaliação da Antimutagenicidade em *Aspergillus nidulans*

Para análise da atividade antimutagênica, foi empregada a fração mais ativa biologicamente. Devido a polaridade do solvente empregado, acetato de etila, permitir a extração de metabólitos secundários de maior bioatividade, os testes preliminares de antimutagênese foram realizados com essa fração, utilizando-se dois parâmetros: avaliação da sobrevivência e análise da germinação de conídios de *Aspergillus nidulans*.

2.6.1. Linhagem e meios de cultura

A linhagem utilizada foi a *biA1methG1* (*biA1* (I) requisito para biotina e *methG1* (IV) requisito para metionina), de conídios com coloração verde, crescimento e esporulação normal, gentilmente cedida pela Universidade de Glasgow, Escócia. O crescimento da linhagem foi feito em meio completo (MC) sólido, preparado conforme Pontecorvo et al. [24] e Clutterbuck [30], incubada a 37°C por cinco dias.

2.6.2. Concentrações

A fração acetato de etila (EtOAc) dos frutos de noni, foram diluídas em DMSO para obtenção das concentrações 2,5, 25 e 250 µg mL⁻¹. A padronização das concentrações foi determinada em ensaios de sobrevivência na linhagem *biA1methG1* de *Aspergillus nidulans*, com base nas concentrações utilizadas em testes de atividade antiproliferativa em linhagens celulares humanas normais e neoplásicas, adotadas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas, São Paulo - CPQBA-UNICAMP.

2.6.3. Suspensão de esporos e controles

Foram coletados conídios de colônias de cinco dias cultivadas em meio completo sólido a 37°C em Tween 80 (0,01%) e, filtrados em lã de vidro. Metade do volume do filtrado foi submetido a irradiação com luz UV por dez segundos (0,24 mJ/cm²). Para o controle negativo, foi utilizada água destilada; o controle positivo, também com água destilada, foi irradiado com luz UV.

2.6.4. Ensaio de sobrevivência

As suspensões de conídios ($\approx 1000 \times 10^4$ conídios mL⁻¹), irradiados e não irradiados, foram tratadas com as diferentes concentrações da fração EtOAc por duas horas e diluídos para ≈ 1000 conídios mL⁻¹. Após o tempo de tratamento, 100 µL de suspensão de cada condição foram inoculados em dez placas de vidro (90x15 mm), contendo MC sólido e incubadas a 37°C, por 72h em câmara de germinação tipo BOD, em delineamento de blocos casualizados com três repetições. Em seguida, foi realizada a contagem macroscópica das colônias para a estimativa de sobrevivência dos conídios irradiados e não irradiados.

2.6.5. Ensaio de germinação: análise de conídios mortos e malformados

As suspensões de conídios ($\approx 500 \times 10^4$ esporos mL^{-1}) irradiados e não irradiados foram inoculadas em MC líquido na presença e ausência de cada concentração da fração EtOAc (2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), não sendo necessário o emprego de diluições. Em seguida, 100 μL de suspensão de cada condição foram transferidas para lâminas de microscopia em câmara úmida e incubados a 37°C por sete horas.

Após sete horas de incubação, três lâminas de cada condição, foram analisadas em microscópio óptico, com aumento final de 200x, por meio de captura de imagem (Canon EOS Rebel 3TI), com adaptador SLR/DSLR NDPL-2 (2x), para microscópio binocular. Em cada leitura foram analisados, randomicamente, 200 conídios e, calculadas as porcentagens de conídios germinados, mortos e malformados.

2.6.6. Interpretação de resultados

No ensaio da germinação, a estimativa de sobrevivência considera vivos, os conídios em botão e germinados; e mortos, apenas os conídios dormentes e embebidos; a estimativa de malformados, considera os conídios com morfologia e crescimento anormal do segundo tubo de germinação (Figura 1).

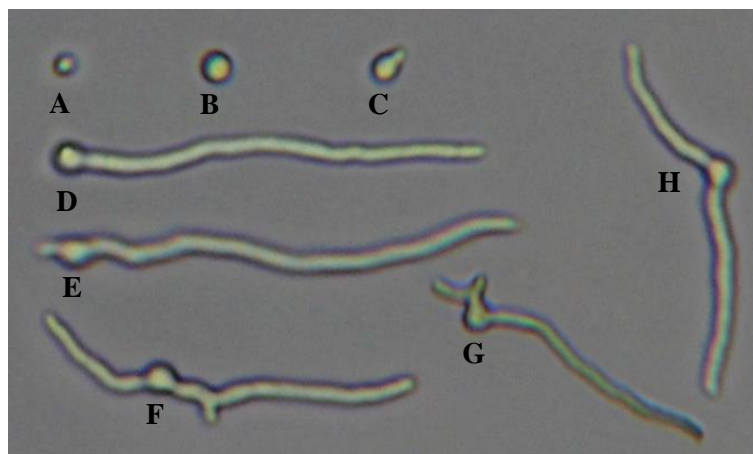


Figura 1. Fases da germinação de conídios de *A. nidulans* e morfologia de malformados. Aumento de 100x com adaptador SLR/DSLR NDPL-2 (2x). **A.** Dormente; **B.** Embebido; **C.** Botão; **D e E.** Germinados; **F, G e H.** Malformados.

A interpretação dos resultados da análise de germinação de conídios de *A. nidulans* leva em consideração duas situações: (1) análise na ausência de irradiação UV para mutação espontânea e (2) análise na presença de irradiação UV para mutação induzida. Os resultados podem ser interpretados conforme possibilidades mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Interpretação dos resultados da análise de germinação de conídios de *A. nidulans*.

Resultado Observado	Indicação
↑ n.º mortos e mantém n.º de malformados	Substância citotóxica
↑ n.º mortos e ↑ n.º de malformados	Substância citogenotóxica
↑ n.º mortos e ↓ n.º de malformados	Substância pró-apoptótica
↓ n.º mortos e ↑ n.º de malformados	Substância anti-apoptótica
↓ n.º mortos e ↓ n.º de malformados	Substância pró-reparo

↑ = aumenta; ↓ = diminui.

A análise dos conídios não irradiados indicará citotoxicidade, quando os valores médios de sobrevivência forem menores do que o controle negativo e, mutagenicidade, quando os valores médios de conídios malformados dos tratamentos, forem maiores que os encontrados no controle negativo.

A proteção da substância teste é evidenciada quando os valores médios de sobrevivência dos conídios irradiados em tratamento apresentarem resultados maiores que o controle positivo (irradiado), se houver reparo e, resultados menores que o controle positivo, se houver apoptose. Para isto, a média de malformados deve ser menor que a média do controle irradiado.

Portanto, a substância teste é considerada mutagênica, quando a média de conídios malformados for superior à média do controle positivo, e antimutagênica, quando a média de conídios malformados for inferior à média do controle positivo. Quando constatado, na análise de conídios irradiados, uma diminuição da porcentagem de malformados e, concomitantemente, um aumento na média de conídios mortos, em comparação com o controle positivo, há um indicativo de que a substância teste é pró-apoptótica.

2.7. Análise estatística

A análise estatística dos resultados de citotoxicidade e genotoxicidade foi realizada utilizando o software SPSS - Statistics 20.0. A normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foram testadas através dos testes Shapiro-Wilk's e Levene's, respectivamente. Ambos resultados foram analisados por meio de ANOVA (one-way) e, quando pertinente, pelo teste de Tukey. Os resultados dos ensaios de sobrevivência e germinação foram submetidos à comparação de médias, utilizando como referência o erro padrão da média (EPM), conforme Graveter e Wallnau [31] e analisados por meio de ANOVA (one-way).

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da citotoxicidade

Após 24 horas de exposição à fração acetato de etila de noni, a viabilidade celular foi levemente diminuída, de forma constante, atingindo 74% dos valores do controle na maior concentração testada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após 48 horas, um aumento moderado na viabilidade celular foi observado na concentração $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, diminuindo nitidamente nas concentrações maiores que $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2 e Figura 2). Contudo, não houve diminuição estatisticamente significativa, da viabilidade celular, independentemente do período de exposição (24 ou 48 horas).

Tabela 2. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Viabilidade \pm DP (%)	
	24h	48h
0	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
2,5	87,62 \pm 9,79	111,00 \pm 24,02
10	90,27 \pm 17,99	113,77 \pm 31,18
25	93,55 \pm 10,83	122,98 \pm 42,69
100	74,09 \pm 1,68	90,41 \pm 17,03
250	75,19 \pm 11,54	73,71 \pm 24,58
500	75,93 \pm 16,08	58,40 \pm 12,68
SDS 0,1%	7,18 \pm 1,21	5,39 \pm 1,14

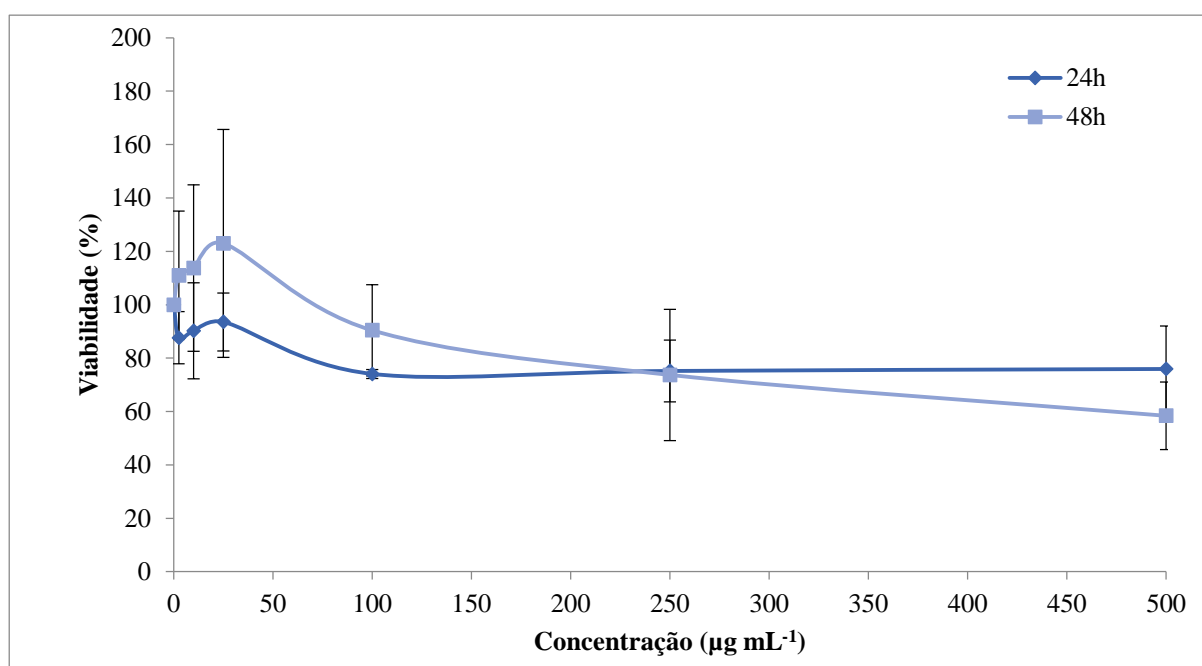


Figura 2. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.

Após 24 horas de exposição das células à fração n-hexânica de noni, a viabilidade celular não variou, quando comparado aos valores do controle. Após 48 horas, a viabilidade das células expostas aumentou em baixa concentração, permanecendo constante nos valores de 120-130% para concentrações acima de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3 e Figura 3). Um único dado, a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 horas de exposição), foi significativamente diferente do controle (ANOVA one-way, com o teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 3. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Viabilidade \pm DP (%)	
	24h	48h
0	100,00 \pm 0.00	100,00 \pm 0.00
2,5	85,47 \pm 11.63	118,25 \pm 22.93
10	85,59 \pm 4.85	116,02 \pm 17.81
25	88,29 \pm 7.88	135,53 \pm 52.73
100	79,10* \pm 4.20	128,15 \pm 31.47
250	94,93 \pm 1.89	135,98 \pm 46.20
500	101,50 \pm 5.72	125,04 \pm 40.73
SDS 0,1%	7,18 \pm 1.21	5,55 \pm 0.99

*Significativamente diferente do controle (ANOVA one-way, com teste de Tukey, $p < 0,05$).

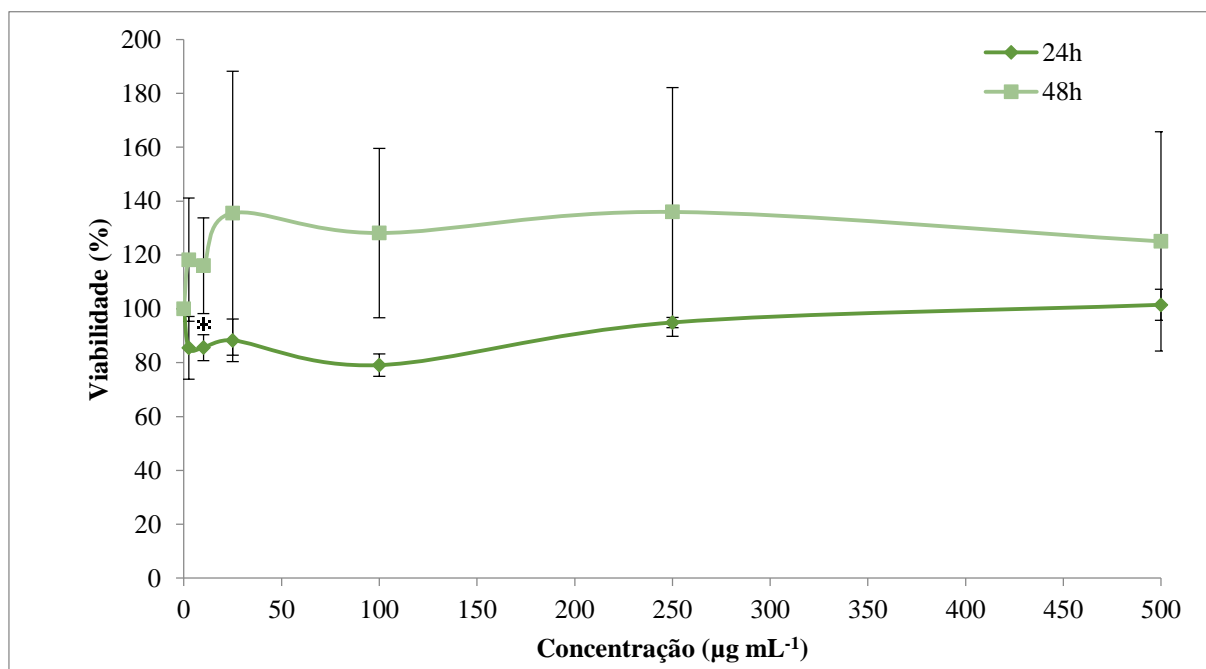


Figura 3. Porcentagem de células HepG2 vivas (viabilidade relativa) (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni. *Significativamente diferente do controle (ANOVA, one-way, com teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.1. Avaliação da genotoxicidade

Similarmente aos resultados obtidos na avaliação de citotoxicidade, o ensaio do cometa também não revelou nenhum indício de genotoxicidade para a fração acetato de etila de noni em células HepG2 (Tabela 4 e Figura 4).

Tabela 4. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DNA em cauda \pm DP (%)	
	Sem FPG	Com FPG
0	6,80 \pm 1,57	7,34 \pm 2,58
2,5	8,28 \pm 3,37	7,93 \pm 2,86
10	7,81 \pm 2,57	7,34 \pm 1,95
25	6,51 \pm 1,96	7,42 \pm 0,64
100	9,14 \pm 4,12	5,31 \pm 2,09
250	7,89 \pm 2,85	8,13 \pm 2,15
500	8,92 \pm 2,86	8,09 \pm 2,00
EMS 5 mM	30,99 \pm 2,49	36,27 \pm 7,02

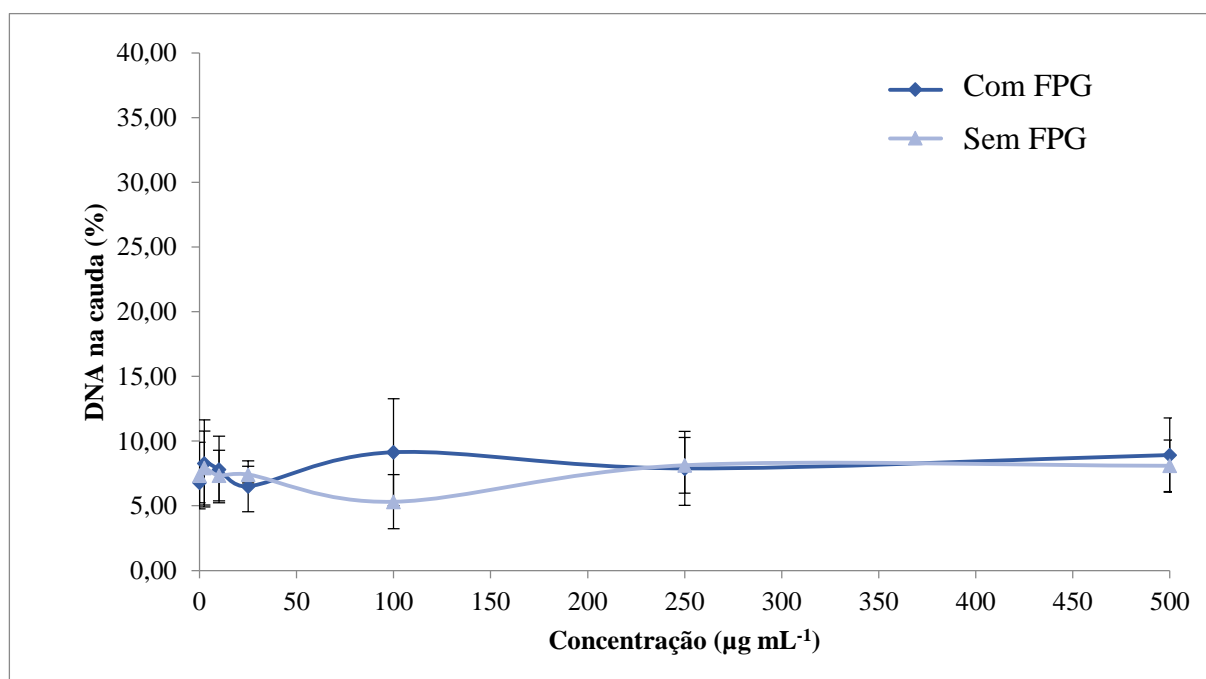


Figura 4. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média±DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração acetato de etila de noni.

A fração n-hexânica de noni, por outro lado, foi capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo no nível de danos ao DNA (Tabela 5 e Figuras 5 e 6) nas duas maiores concentrações testadas (250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A indução de danos oxidativos ao DNA não foi observada, dado que o tratamento com FPG não aumentou o nível de danos no DNA nessas concentrações.

Tabela 5. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média \pm DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DNA na cauda \pm DP (%)	
	Sem FPG	Com FPG
0	9,07 \pm 3,27	9,33 \pm 4,19
2,5	8,82 \pm 1,52	10,9 \pm 4,37
10	7,26 \pm 1,81	11,31 \pm 5,54
25	8,85 \pm 2,2	15,24 \pm 5,07
100	13,5 \pm 3,95	12,49 \pm 2,84
250	21,73* \pm 9,1	19,45 \pm 4,17
500	29,28* \pm 9,01	28,04* \pm 9,71
EMS 5 mM	30,99 \pm 2,49	36,27 \pm 7,02

*Significativamente diferente do controle (ANOVA e Tukey, $p < 0,05$).

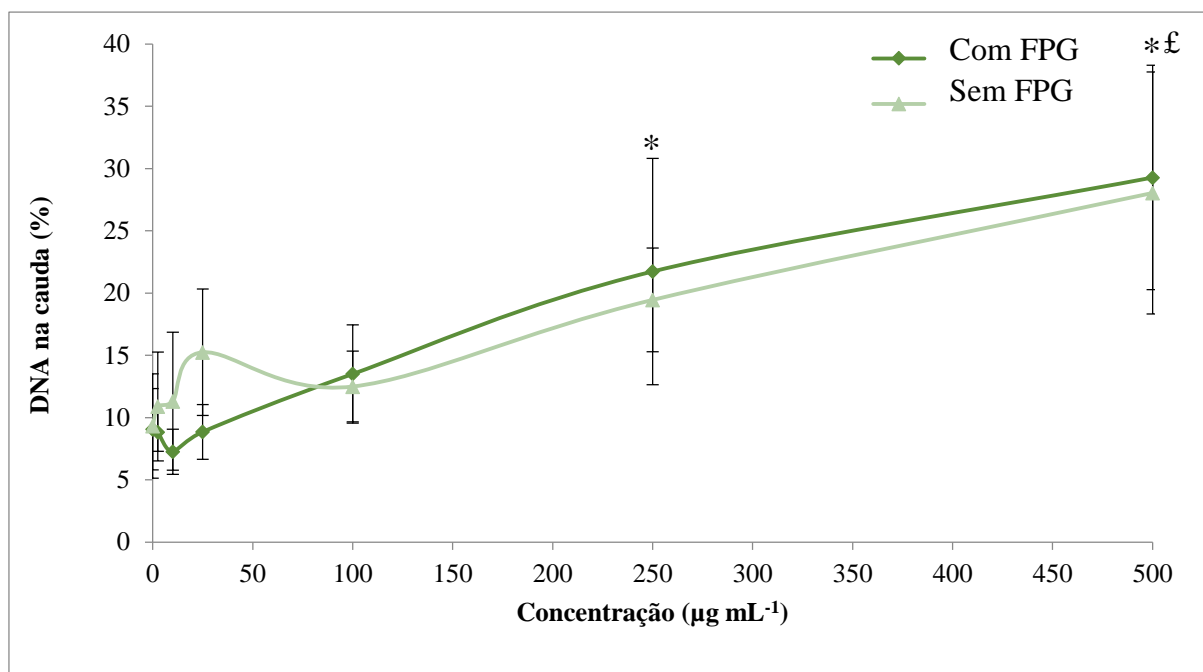


Figura 5. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides no ensaio do cometa em células HepG2 (média \pm DP) em resposta ao tratamento com as concentrações da fração n-hexânica de noni. * e £: significativamente diferente do controle após 24 e 48 horas de exposição, respectivamente (ANOVA com Tukey, $p < 0,05$).

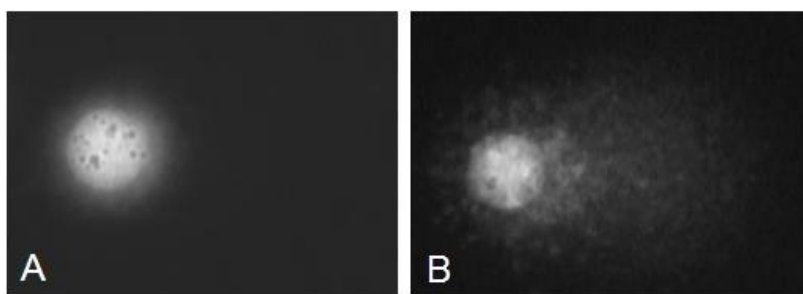


Figura 6. Microfotografias representativas do ensaio do cometa (aumento 200x). A: controle negativo; B: imagem do cometa mostrando a fragmentação do DNA em cauda (fração n-hexânica, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A ausência de citotoxicidade e genotoxicidade também foi apresentada por outros trabalhos. Westendorf et al. [32], não identificaram hepatotoxicidade, genotoxicidade ou presença de antraquinonas genotóxicas do extrato do suco de noni, preparado com acetato de etila. Semelhantemente West, Su e Jensen [33], verificaram que o fruto de noni sem sementes, também não diminui a viabilidade de células HepG2, além de não ter sido observado toxicidade e nenhum outro efeito adverso. O extrato aquoso de sementes de noni também não mostrou efeito tóxico, citotóxico, nem causaram danos primários no DNA, segundo West et al. [34].

3.1. Avaliação da antimutagenicidade

3.1.1. Análise de sobrevivência

Conforme resultados apresentados na Tabela 6 e Figura 7, houve uma pequena diminuição da viabilidade em resposta as concentrações 25 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Embora estatisticamente não significativos, estes números indicam uma discreta indução à morte dos conídios tratados. Esta análise isoladamente não define tratar-se de citotoxicidade, que seria um efeito negativo da substância-teste ou de indução a apoptose, que seria um efeito positivo se matasse seletivamente conídios com danos genéticos.

Um resultado inesperado foi o aumento da viabilidade observado no controle DMSO, utilizado como solvente da fração acetato de etila. Este aspecto protetor poderia justificar o aumento da viabilidade da concentração $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, na qual a quantidade de fração acetato de etila seria insuficiente para induzir a morte como ocorreu nas concentrações maiores, no qual o efeito protetor do DMSO foi superado pelo efeito pró-morte da fração em teste.

O DMSO é um solvente crioprotetor utilizado usualmente em culturas de diversos tipos celulares de bactérias a células humanas, quando estocadas em baixíssimas temperaturas, protegendo de diversas formas as células, preservando sua integridade e viabilidade para culturas futuras [35].

Um dos efeitos protetores, hoje já identificados, é a inibição da indução à apoptose nas condições desfavoráveis das baixíssimas temperaturas [36]. Sendo assim, considerando esta propriedade do DMSO, esta interpretação dos resultados da sobrevivência poderia ser justificada.

Nos tratamentos com conídios irradiados, observou-se uma redução muito grande da sobrevivência, embora não significativa, após tratamento com fração acetato de etila (25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em relação ao controle positivo. Esse aumento muito acentuado, quando comparado ao grupo não irradiado, corrobora a hipótese de apoptose, pois nesse grupo temos danos genéticos previamente obtidos pela exposição a UV, que justificam um efeito mais ostensivo de um sistema protetor pró-apoptose. Neste grupo, repetiu-se o efeito protetor do DMSO na concentração 2,5 da fração, corroborando também, a interpretação feita para os resultados do grupo não irradiado.

Tabela 6. Média do número de colônias por placa de *A. nidulans*, a partir de conídios irradiados e não irradiados com UV (média \pm EPM), seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Viabilidade \pm EPM	
	não irradiado	irradiado
0	79,9 \pm 14,9	30,5 \pm 5,8
2,5	91,0 \pm 6,1	42,9 \pm 11,4
25	75,9 \pm 7,7	17,2 \pm 3,2
250	71,7 \pm 16,0	17,1 \pm 2,3
DMSO 0,7%	90,4 \pm 6,1	-

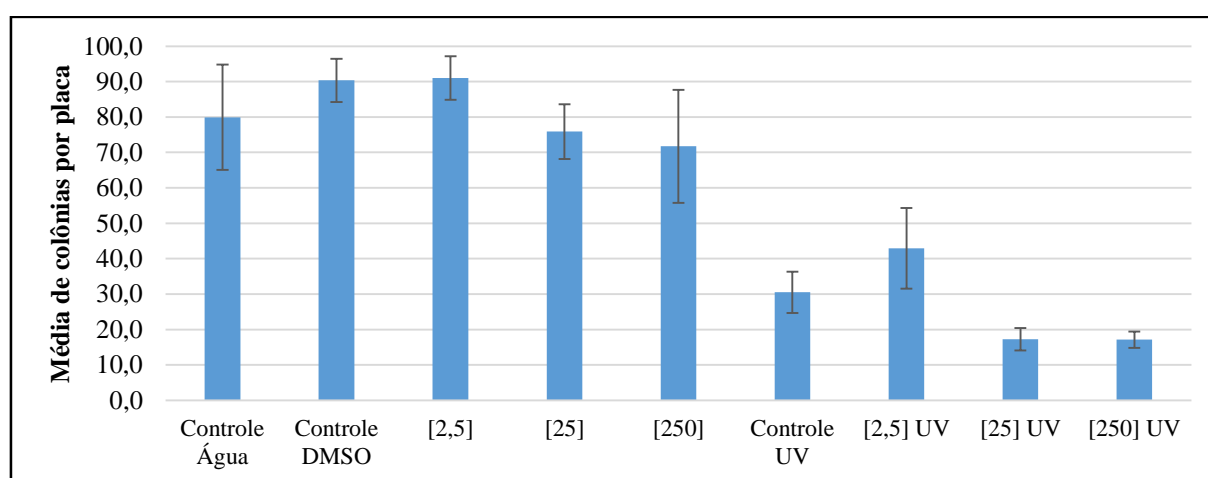


Figura 7. Média do número de colônias por placa de *A. nidulans*, com conídios irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni.

3.1.2. Estimativa de mortos e malformados

Após 7 horas de exposição à fração acetato de etila de noni, assim como no teste de sobrevivência, no grupo não irradiado foi observado um aumento na morte de conídios nas concentrações de 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em relação ao controle negativo, embora somente o primeiro tenha sido estatisticamente significativo. Neste grupo, da mesma forma que ocorreu na análise de sobrevivência, a concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o controle DMSO promoveram uma diminuição do número de conídios mortos, embora com resultados não significativos, conforme observa-se na Tabela 7 e Figura 8.

Corroborando os resultados do teste macroscópico de sobrevivência, no grupo irradiado houve um aumento significativo da morte de conídios nas concentrações 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em relação ao controle positivo. Da mesma forma, na concentração 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve diminuição estatisticamente significativa de mortos, provavelmente motivada pelo efeito protetor do DMSO (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

Tabela 7. Porcentagem de conídios mortos de *A. nidulans* irradiados e não irradiados com UV (média \pm EPM), seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidade \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	9,8 \pm 0,9	31,2 \pm 1,4
2,5	9,0 \pm 3,0	23,7* \pm 0,8
25	14,2* \pm 1,0	42,2* \pm 1,6
250	11,2 \pm 0,9	39,8* \pm 2,2
DMSO 0,5%	10,0 \pm 1,1	-

*Significativamente diferente dos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

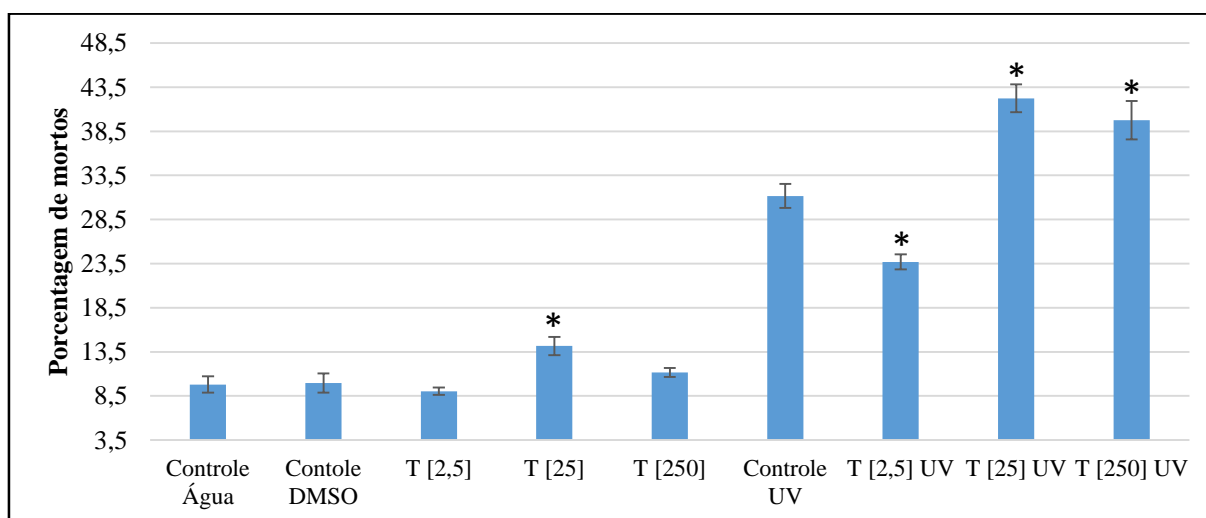


Figura 8. Porcentagem de conídios mortos de *A. nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com as diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni. *Significativamente diferente dos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

A estimativa de conídios malformados, após 7 horas de exposição à fração acetato de etila de noni, mostrou uma diminuição da média de conídios malformados em relação ao controle no grupo não irradiado, embora o único dado estatisticamente significativo foi observado na concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em que o número de malformados é 64% menor que o encontrado no controle negativo.

Uma significativa redução do número médio de conídios malformados também foi observada nos tratamentos, após irradiação com ultravioleta, sendo a concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a mais bioativa, com redução de 62,74% em relação ao controle positivo, seguida das concentrações 250 e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (54,9 e 45,1%), conforme dados da Tabela 8 e Figura 9.

Tabela 8. Porcentagem de conídios malformados de *A. nidulans* irradiados e não irradiados com UV (média \pm EPM) seguido de exposição às concentrações da fração acetato de etila de noni.

Concentração da fração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Malformação \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	2,5 \pm 0,3	5,1 \pm 0,3
2,5	0,9* \pm 0,5	2,8* \pm 0,3
25	1,1 \pm 0,6	1,9* \pm 0,3
250	1,4 \pm 0,3	2,3* \pm 0,6
DMSO 0,5%	1,9 \pm 0,3	-

*Significativamente diferente dos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

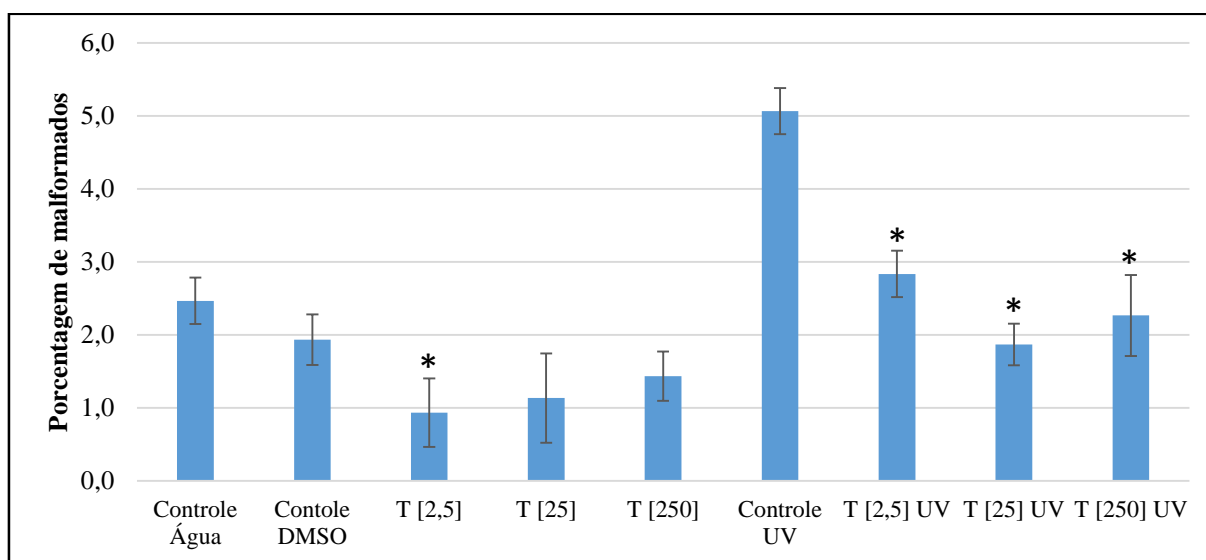


Figura 9. Porcentagem de conídios malformados de *A. nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de exposição às diferentes concentrações da fração acetato de etila de noni. *Significativamente diferente dos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

Substâncias como o damnacantal, uma antraquinona isolada da fração clorofórmica de *Morinda citrifolia* apresenta ação pró-apoptótica descrita por Kamata et al. [37]. A literatura, tem mostrado ainda, sua atividade antifúngica contra *Candida albicans*, o que explicaria a diminuição de colônias e o aumento de conídios mortos nos ensaios em que os conídios foram previamente irradiados, caso esse composto esteja presente nessa fração. Hiramatsu et al. [41], verificaram uma indução da morfologia normal, em um tipo particular de célula encontrada em neoplasias humanas que se multiplica desordenadamente e torna-se maligna. Segundo os autores, essa indução ocorreu pela influência do damnacantal.

A escopoletina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina, um derivado de cumarina, constitui um dos compostos mais representativos do noni [38]. Sua atividade farmacológica envolve a antiproliferativa, por meio da indução de apoptose em células tumorais [39], e induz à autofagia, pela ativação da proteína p53, em fibroblastos de pulmão humano [40]. Esta ação justificaria a apoptose como fator de eliminação, eliminando seletivamente os conídios comprometidos geneticamente.

Vários outros compostos presentes no fruto de noni, possuem atividade antiproliferativa como a escopoletina, mencionada anteriormente, e a isoescopoletina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, presente na fração acetato de etila do fruto de noni [42], que inibe a proliferação de linhagens celulares de leucemia (CCRF-CEM) e linhagem resistente à múltiplas drogas (CEM/ADR5000) [43] e a proliferação do vírus da hepatite B em sistemas celulares [44]. Além disso, a isoescopoletina, devido à sua forte atividade antioxidante, pode ser empregada como um potencial sequestrante de radicais livres para evitar doenças relacionadas à oxidação [42].

Os radicais livres são responsáveis por diversos danos oxidativos às células, inclusive danos no DNA, podendo ocasionar o câncer. A propriedade antioxidante dos extratos metanólico e acetato de etila de noni foi avaliada por Mohd, Abdul-Hamid e Osman [45]. Os autores descobriram que os extratos apresentaram forte oxidação, comparado ao alfa-tocoferol, demonstrando potencial antioxidante quase três vezes maior que o do ácido ascórbico, tendo praticamente a mesma magnitude que o pó de semente de uva.

A atividade antimutagênica do suco comercial de noni, foi verificada por Franchi, et. al. [46], contra lesões induzidas por mitomicina C e doxorubicina, pelo teste de mutação somática e recombinação (SMART) em *Drosophila melanogaster*, mostrando que o suco apresentou efeito antimutagênico e antirrecombinagênico, dose-dependente, que segundo os autores, pode ser atribuída à forte atividade antioxidante e/ou neutralizadora de radicais livres do suco comercial de noni.

4. Conclusão

Os resultados do presente trabalho evidenciam que a fração acetato de etila não apresentou efeito citotóxico ou genotóxico nas condições e tempos de tratamento empregados. Por outro lado, a fração n-hexânica é capaz de induzir a proliferação de células HepG2, após 48 horas de exposição e, possui efeito genotóxico nas maiores concentrações testadas.

O ensaio de antimutagenicidade, corroborou através de seus parâmetros em células eucarióticas de *Aspergillus nidulans*, que a fração acetato de etila não é citotóxica ou genotóxica. Por outro lado, apresentou efeito pró-reparo, ao diminuir significativamente o número de malformados na menor concentração em que houve redução de mortos e efeito pró-apoptótico nas demais concentrações, aumentando significativamente o número de mortos e diminuindo o número de malformados, frente ao controle positivo.

Os resultados apresentados contribuem para a elucidação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dessas frações e, na identificação preliminar de extratos complexos com atividade protetora do material genético, subsidiando a formulação de fitoterápicos e profiláticos e, futuros estudos de identificação de compostos quimiopreventivos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo financiamento; Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, Paraná e ao Departamento de Genética Humana da Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Divisão de Toxicologia Genética, do Instituto de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, pelo suporte técnico. Ao Dr. Elnatan Bezerra de Souza da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Ceará, Brasil, pela confirmação botânica do espécime utilizado e, ao Sr. Paulo César Batista por ceder os frutos de noni.

5. Referências

- [1] J.M. Fachinetto, S.B. Tedesco, Atividade antiptoliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*, Rev. Bras. Plantas Med. 11 (2009) 360-367.
- [2] S. Sang, M. Wang, K. He, G. Liu, Z. Dong, V. Badmaev, Q.Y. Zheng, G. Ghai, R.T. Rosen, C.T. Ho, Chemical components in Noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.), in: C.T. Ho, Q.Y. Zheng (Eds.), Quality Management of Nutraceuticals, ASC Symposium Series 803, American Chemistry Society, Washington, 2002, pp.134-150.
- [3] Y. Chan-Blanco, F. Vaillant, A.M. Perez, M. Reynes, J.M. Brillouet, P. Brat, The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutical properties, J. Food Compos. Anal. 19 (2006) 645-654. doi:10.1016/j.jfca.2005.10.001.
- [4] M.Y. Wang, B. West, C.J. Jensen, D. Nowicki, C. Su, A.K. Palu, G. Anderson, *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research, Acta Pharmacol. Sin. 23 (2002) 1127-1141.
- [5] K. Kamiya, Y. Tanaka, H. Endang, M. Umar, T. Satake, Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation, J. Agric. Food. Chem. 52 (2004) 5843-5848. doi: 10.1021/jf040114k.
- [6] D.R. Singh, *Morinda citrifolia* (noni): a review of the scientific validation for its nutritional and therapeutical properties, Glob. J. Hematol. Endocrinol. 1 (2013) 55-69.
- [7] M.Y. Wang, C. Su, Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni), Ann. NY. Acad. Sci. 952 (2001) 161-168. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02737.x.
- [8] B.M. Schmidt, D.M. Ribnicky, P.E. Lipsky, I. Raskin, Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics, Nat. Chem. Biol. 3 (2010) 360-366. doi:10.1038/nchembio0707-360.
- [9] J.O. Moody, E.A. Ajaiyeoba, J.O. Adeboye, O.O. Ogundipe, Standardization and utilization of herbal medicines, in: Proceedings of First International Workshop on Herbal Medicinal Products, Ibadan, 1999, pp. 6-8.
- [10] A.B. Gadano, A.A. Gurni, M. Lopez Nigro, P. Gralli, A. Van Baren, G. Ferraro, M.A. Carballo, Cytogenetic effects of aqueous extracts of medicinal plant paico (*Chenopodium multifidum*), Pharm. Biol. 38 (2000) 7-12. doi: 10.1076/1388-0209(200001)3811-BFT007.
- [11] A.B. Gadano, A.A. Gurni, P. Lopez, G. Ferraro, M.A. Carballo, In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L., J. Ethnopharmacol. 81 (2002) 11-16. doi:10.1016/S0378-8741(01)00418-4.
- [12] A.B. Gadano, A.A. Gurni, M.A. Carballo, Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae Family, J. Ethnopharmacol. 103 (2006) 246-251. doi: 10.1016/j.jep.2005.08.043.
- [13] K.D. Effraim, T.W. Jacks, O.A. Sodipo, Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit, Afr. J. Biomed. Res. 6 (2001) 21-25. doi: 10.4314/ajbr.v6i1.54018.

- [14] R.O. Teixeira, M.L. Camparoto, M.S. Mantovan, V.E.P. Vicentini, Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays, *Genet. Mol. Biol.* 26 (2003) 551-555. doi: 10.1590/S1415-47572003000400021.
- [15] A.A. Paes-Leme, E.S. Motta, J.C.P. De Mattos, F.J.S. Dantas, R.J.A.C. Bezerra, A. Caldeira-Araujo, Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA, *J. Ethnopharmacol.* 102 (2005) 197-201. doi:10.1016/j.jep.2005.06.013.
- [16] L. Verschaeve, V. Kestens, J.L.S. Taylor, E.E. Elgorashi, A. Maes, L. Van Puyvelde, N. De Kimpe, J. Van Staden, Investigation of the antimutagenic effects of selected Southe African medicinal plant extracts, *Toxicol. in vitro.* 18 (2004) 29-35. doi: 10.1016/S0887-2333(03)00131-0.
- [17] G. Speit, H. Kojima, B. Burlinson, A.R. Collins, P. Kasper, U. Plappert-Helbig, Y. Uno, M. Vasquez, C. Beevers, M. De Boeck, P.A. Escobar, S. Kitamoto, K. Pant, S. Pfuhler, J. Tanaka, D.D. Levy, Critical issues with the *in vivo* comet assay: A report of the comet assay working group in the 6th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 783 (2015) 6-12. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.09.006.
- [18] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovanelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis.* 23 (2008) 143-151. doi: 10.1093/mutage/gem051.
- [19] A.R. Collins, Investigating Oxidative DNA damage and its repair using the comet assay, *Mutat. Res.* 681 (2009) 24-32.
- [20] C.L.M.S.C. Rocha, J.L. Azevedo, Use of the methG1 reversion system of *Aspergillus nidulans* for the detection of mutagenicity of the pyrrolizidine alkaloid interrimine, *Ver. Bras. Genet.* 9 (1986) 393-405.
- [21] W.C. Nierman, G. Way, H.S. Kim, M.J. Anderson, D. Chen, D.W. Denning, What the *Aspergillus* genomes have told us, *Med. Mycol.* 43 (2005) 3-5. doi: 10.1080/13693780400029049.
- [22] S.D. Martinelli, *Aspergillus nidulans* as an experimental organism, in: S.D. Martinelli, J.R. Kinghorn (Eds.), *Aspergillus: 50 years on*, Elsevier, New York, 1994, pp. 33-58.
- [23] W.E. Timberlake, A.J. Clutterbuck, Genetic regulation of conidiation, in: S.D. Martinelli, J.R. Kinghorn (Eds.), *Aspergillus: 50 years on*, Elsevier, New York, 1994, p. 383.
- [24] G. Pontecorvo, J.A. Roper, L.M. Chemmons, K.D. Macdonald, A.W.J. Bufton, The genetics of *Aspergillus nidulans*, *Adv. Genet.* 5 (1953) 141-238.
- [25] C. D'Enfert, Fungi spore germination: insights from the molecular genetics of *A. nidulans* and *N. crassa*, *Fungal Genet. Biol.* 21 (1997) 163-172. doi: 10.1006/fgbi.1997.0975.
- [26] G.D. Sousa, T.D. Zucchi, F.D. Zucchi, R.G. Miller, R.M. A. Anjos, P. Poli, T.M.A.D. Zucchi, *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect the genotoxic effects of Mercury fumes on eukaryotes, *Genet. Mol. Res.* 8 (2009) 404-413.

- [27] D. Krishnaiah, R. Nithyanandam, R. Sarbatly, Phytochemical constituents and activities of *Morinda citrifolia* L., in: R. Venketeshwer (Ed.), *Phytochemicals: A global perspective of their role in nutrition and health*, Intech, Croatia, 2012, pp. 127-150. doi: 10.5772/26094.
- [28] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249-261. doi: 10.1385/MB:26:3:249.
- [29] M. Pinto, P.M. Costa, H. Louro, M.H. Costa, J. Lavinha, S. Caeiro, M.J. Silva, Determining oxidative and non-oxidative genotoxic effects driven by estuarine sediment contaminants on a human hepatoma cell line, *Sci. Total Environ.* 478 (2014) 25-35. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.084.
- [30] A.J. Clutterbuck, *Aspergillus nidulans*, in: R.C. King (Ed.), *Handbook of Genetics*, Plenum Publishing, New York, 1974, pp. 447-510.
- [31] F.J. Gravetter; L. Wallnau, *Statistics for the Behavioral Sciences*, West Publishing Co, Wallingford, 1995, pp. 12-28.
- [32] J. Westendorf, K. Effenberger, H. Iznaguen, S. Basar, Toxicological and analytical investigations of noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 529-537. doi: 10.1021/jf062130i.
- [33] B.J. West, C.X. Su, C.J. Jensen, Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit, *J. Toxicol. Sci.* 34 (2009) 581-585. doi: 10.2131/jts.34.581.
- [34] B.J. West, C.J. Jensen, A.K. Palu, S. Deng, Toxicity and antioxidant tests of *Morinda citrifolia* (noni) seed extract, *Adv. J. Food Sci. Technol.* 3 (2011) 303-307.
- [35] B.J. Fuller, Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state, *Cryo Letters.* 25 (2004) 375-88.
- [36] V.P. Varma, L. Devi, N.K. Venna, C.L. Murthy, M.M. Idris, S. Goel, Ocular fluid as a replacement for serum in cell cryopreservation media, *PloS One.* 10 (2015) 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0131291.
- [37] M. Kamata, R.P. Wu, D.S. An, J.P. Saxe, R. Damoiseaux, M.E. Phelps, J. Huang, I.S. Chen, Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29 (2006) 1101-1106. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.158.
- [38] V. Samoylenko, J. Zhao, D.C. Dunbar, I.A. Khan, J.W. Rushing, I. Muhammad, New constituents from noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6398-6402. doi: 10.1021/jf060672u.
- [39] H. Yu, S. Li, M.T. Huang, C.T. Ho, Antiinflammatory constituents in noni (*Morinda citrifolia*) fruits, in: C.T. Ho, J.E. Simon, F. Shahidi, Y. Shao (Eds.), *Dietary Supplements*, American Chemical Society, Symposium Series, Washington, 2008, pp. 179-190. doi: 10.1021/bk-2008-0987.
- [40] H. Nam, M.M. Kim, Saopoletin has a potential activity for anti-aging via autophagy in human lung fibroblasts, *Phytomedicine.* 22 (2015) 362-368. doi: 10.1016/j.phymed.2015.01.004.

- [41] T. Hiramatsu, M. Imoto, T. Koyano, K. Umezawa, Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*, *Cancer Lett.* 73 (1993) 161-166. doi: 10.1016/0304-3835(93)90259-C.
- [42] C. Liu, Y. Xue, Y. Ye, F. Yuan, J. Liu, J. Shuang, Extraction and characterization of antioxidante compositions from fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni), *Agric. Sci. in China.* 6 (2007) 1494-1501. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60013-9.
- [43] M. Adams, T. Efferth, R. Bauer, Activity-guided isolation of scopoletin and isoscopoletin, the inhibitory active principles towards CCRF-CEM leukaemia cells and multi-drug resistant CEM/ADR5000 cells, from *Artemisia argyi*, *Planta Med.* 72 (2006) 862-864. doi: 10.1055/s-2006-947165.
- [44] H. Li, C.X. Zhou, Y. Pan, X. Gao, X. Wu, H. Bai, L. Zhou, Z. Chen, S. Zhang, S. Shi, J. Luo, J. Xu, L. Chen, X. Zheng, Y. Zhao, Evaluation of antiviral activity of compounds isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus*, *Planta Med.* 71 (2005) 1128-1133. doi: 10.1055/s-2005-873169.
- [45] Z. Mohd, A. Abdul-Hamid, A. Osman, Antioxidative activity extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf, *Food Chem.* 78 (2001) 227-231. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00402-2.
- [46] L.P. Franchi, N.N. Guimarães, L.R. Andrade, H.H.R. Andrade, M. Lehmann, R.R. Dohl, K.S. Cunha, Antimutagenic and antirecombinagenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *An. Acad. Bras. Cienc.* 85 (2013) 585-594. doi: 10.1590/S0001-37652013000200008.

ANEXO 2

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Author information pack

Description

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects.

The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Types of Paper

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are

published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts Letters to the Editor.

Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be up to 300 words of size.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in the printed version (unless you specify otherwise). Please indicate your preference for color: in print and on the Web, or on the Web only.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.