

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
(PIB-S/0116/2013)
INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA E *MORINDA CITRIFOLIA* (NONI):
AÇÃO NA FUNÇÃO HEPÁTICA

Bolsista: Carlos Klinger Rodrigues Serrão
Orientadora: Prof^{fa} Dra Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira

MANAUS - AM
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA E *MORINDA CITRIFOLIA* (NONI):
AÇÃO NA FUNÇÃO HEPÁTICA

Bolsista: Carlos Klinger Rodrigues Serrão
Orientadora: Prof^{fa} Dra Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira

MANAUS - AM
2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Instituto de Ciências Biológicas e aos seus autores.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC e desenvolvida no Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Departamento de Ciências Fisiológicas com apoio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3. OBJETIVOS	9
3.1 OBJETIVOS GERAIS	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	10
4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	10
4.3 ANIMAIS	10
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	11
4.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA FUNÇÃO HEPÁTICA	11
4.5.1 Determinação da atividade de AST e ALT	11
4.5.2 Determinação da concentração de Proteínas Totais e Albumina	12
4.6 VIABILIDADE DE ENZIMAS HEPÁTICAS DO STRESS OXIDATIVO	12
4.6.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	12
4.6.2 Atividade da enzima catalase (CAT)	12
4.6.3 Proteção à Lipoperoxidação lipídica	13
4.7. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	13
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AST E ALT	14
5.2 VIABILIDADE DE ENZIMAS HEPÁTICAS DO <i>STRESS</i> OXIDATIVO	17
5.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	21
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. INTRODUÇÃO

Morinda citrifolia, popularmente conhecida como Noni, é uma das plantas medicinais mais tradicionais conhecidas e é utilizada na medicina popular há mais de 2000 anos (WHISTLER, 1985 *apud* WANG, 2002).

O uso fitoterápico dessa planta tem sido relatado tanto pela medicina popular quanto por pesquisas científicas, onde abrange diversas propriedades terapêuticas farmacológicas e nutricionais (POTTERAT, 2007). Na medicina alternativa é usada para diferentes tipos de doenças como a artrite, diabetes, pressão alta, dores em geral, doenças cardíacas, AIDS, câncer, senilidade, má digestão e dependência química (SOLOMON, 1999).

Por outro lado, pesquisas também têm relatado efeitos maléficos sobre o uso do Noni, tendo sido demonstrado em estudos com modelos experimentais e também na observação de casos clínicos de intoxicação alimentar em humanos relacionados ao consumo do suco dos frutos de Noni. Foi relatado hepatotoxicidade adversa associada ao consumo de Noni, sendo esse aspecto alvo de muitas controvérsias, devido o uso da planta ter sido associado com outras ervas e até mesmo medicamentos (STADLBAUER, *et al* 2005.; MRZLJAK, 2013; YU *et al.*,2011).

Nestes relatos de caso, os pacientes intoxicados estavam fazendo uso de medicamentos que produzem atividade hepatotóxica conhecida, como o fenobarbital (ANDRADE, *et al*, 2013; MOMM, 2008) e o paracetamol (LOPES *et al*, 2012; GOODMAN, *et al*, 2010) e concomitantemente faziam o uso do suco de Noni. A reprodução em modelo experimental utilizando fármacos como fenobarbital e o paracetamol e concomitante tratamento com o Noni auxiliará na compreensão e elucidação dos efeitos tóxicos relatados, de forma a esclarecer se o dano hepático demonstrado nos pacientes foi devido somente à ação do medicamento hepatotóxico, ao consumo de Noni ou pelo sinergismo da interação medicamentosa dos dois tratamentos.

No intuito de promover a pesquisa com bases farmacofisiológicas, este estudo vem ser um expoente para a linha científica de pesquisa de interação medicamento x planta medicinal, como a *Morinda citrifolia*, objetivando a investigação através de modelos experimentais as supostas implicações atribuídas ao consumo de Noni concomitante com o uso de medicamentos, de forma a elucidar a ação desta planta sobre o metabolismo hepático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O consumo de plantas medicinais no Brasil tem por característica o uso empírico e sem comprovação adequada das ações farmacológicas dos remédios que são produzidos por curandeiros, raizeiros, comerciantes e usuários. O uso indiscriminado e inadequado dessas plantas gera problemáticas como intoxicações, reações alérgicas, lesões em órgãos como fígado, rins e inclusive alterações morfológicas mais severas como coma, choque, carcinomas e até a morte. (PROTESTE, 2013).

O aumento no consumo de remédios à base de plantas tem sido estimulado por vários fatores, incluindo a noção de que todos os produtos à base de plantas são seguros e eficazes e falta de regulamentação por órgãos competentes como o Food and Drug Administration (FDA) e a ANVISA (PAK, *et al* 2004).

A espécie vegetal conhecida popularmente como Noni, cientificamente reconhecida por *Morinda citrifolia*, da família botânica *Rubiaceae*, é uma das plantas medicinais mais tradicionais da medicina popular e tem sido usada há mais de 2000 anos (WHISTLER, 1985 *apud* WANG, 2002). Este vegetal é identificado pelo seu tronco reto, grandes folhas verdes, brilhantes e elípticas, flores brancas tubulares, sendo seu distintivo o fruto amarelado de formato ovóide, com aspecto que lembra uma granada. Quando maduros, os frutos apresentam gosto e odor desagradáveis (WANG, 2002).

Há um crescente interesse no uso popular do fruto de *Morinda citrifolia*, que foi promovido por várias publicações populares, incluindo a imprensa, que atuou informando, ou melhor, desinformando o público sobre as propriedades terapêuticas supostamente cientificamente comprovadas.

Estudos recentes sobre produtos comerciais têm mostrado que os fabricantes de produtos à base de Noni estão promovendo uma série de alegações terapêuticas. Essas afirmações são baseadas no uso tradicional dessa planta por países como a Polinésia, e fragmentos de estudos científicos recentes (MCCLATCHEY, 2002). A população leiga, influenciada pela mídia e pelo consumismo acaba sendo alvo dos interesses econômicos dessas empresas e acabam utilizando muitas vezes drogas que não tem sua segurança completamente esclarecida.

Em 2003, foi aprovado pela Comissão Européia, considerar o sumo do fruto Noni como um alimento novo, por ter uma variedade de nutrientes. Porém estudos toxicológicos em cultura de tecidos, animais experimentais e estudos clínicos

demonstraram que o consumo do fruto também pode possuir efeitos tóxicos (Commission E, 2003.). No Brasil, segundo a ANVISA, o uso do Noni como fitoterápico e alimento não é regulamentado (ANVISA, 2007) devido a quantidade de publicações que demonstram que a segurança quanto ao seu uso é questionável (WEST, *et al.*, 2006).

Em relação a pesquisa científica, estudos relataram diferentes propriedades farmacológicas do Noni em modelos experimentais. Foi demonstrado que o extrato de Noni possui atividade anti-inflamatória na modulação de células envolvidas na resposta imunológica e inibição de fatores promotores como mediadores lipídicos e protéicos (OKUSADA, 2011; KIM, *et al* 2005; LI, *et al* 2003; SONG, *et al* 2010; SERAFINI, *et al* 2011). Também é relatado atividade anti-carcinogênica, anti-angiogênica, antiviral e atividade de modulação na expressão gênica de fatores da proliferação celular tumoral (MCCLATCHEY, 2002.; AKIHISA, *et al* 2012; CLAFSHENKEL, *et al* 2012; BEH, *et al*, 2012; NUALSANIT, *et al* 2012.). Estudos fitoquímicos têm demonstrado importante atividade antioxidante devido a presença de diferentes compostos fenólicos principalmente presentes nos frutos de Noni como glicósidos, antraquinonas e alcalóides (ZHANG, *et al*, 2013; PIARU, 2012; KUMAR, 2012.).

Além dos efeitos benéficos atribuídos ao consumo de Noni, tem sido relatado em diversas publicações vários problemas associados ao consumo dessa planta. Foi relatado hepatotoxicidade adversa associada ao consumo de Noni, sendo esse aspecto alvo de muitas controvérsias, visto que os pacientes faziam uso de medicamentos como o paracetamol e o fenobarbital, que poderiam ter promovido o dano hepático ou sua interação com os componentes químicos de *Morinda citrifolia* (YU *et al.*, 2011; MRZLJAK, 2013.; MILLONIG, 2005).

STADLBAUER *et al* (2005) relata dois casos de hepatotoxicidade por *Morinda citrifolia*, o primeiro é sobre um homem de 29 anos de idade com hepatite tóxica anterior associada a pequenas doses de paracetamol que desenvolveu insuficiência hepática sub-aguda após o consumo de 1,5 L de suco de Noni por mais de 3 semanas e que necessitou de transplante hepático com urgência. O segundo relato discute sobre uma mulher de 62 anos de idade, sem evidência de doença hepática anterior que desenvolveu um episódio de hepatite aguda auto-limitada após o consumo de 2 L de suco de noni durante mais de 3 meses. Em 2008, a mesma autora e sua equipe relatam o caso de um homem branco de 43 anos de idade, diagnosticado com um glioblastoma que passou por cirurgia, radiação e quimioterapia. O paciente começou a

beber suco de Noni na dose 20 mL duas vezes por dia e após 3 semanas, houve elevação drástica das enzimas transaminases TGO e TGP, indicando dano hepático. A autora aponta os efeitos hepatotóxicos devido a presença de antraquinonas no suco.

YU *et al* (2011) apresenta um caso de um menino previamente saudável de 14 anos de idade, que apresentou hepatotoxicidade aguda após o consumo de suco de Noni. MRZLJAK, *et al* (2013) apresenta um caso de uma mulher de 38 anos de idade que desenvolveu lesão hepática aguda associada com o consumo de suco de noni e que também estava sob terapia anticonvulsivante utilizando o medicamento fenobarbital.

O paracetamol é um antiinflamatório não-esteróide derivado do p-aminofenol, utilizado como analgésico e antipirético. Esse medicamento sofre extenso metabolismo hepático, e os seus catabólitos podem provocar quadros reativos lesivos às células do fígado. A droga segue uma trilha metabólica clássica através do metabolismo de segunda passagem, sofrendo sulfatação ou glicuronização. Uma pequena percentagem sofre oxidação através do citocromo P-450. Este último caminho criará um composto eletrofílico reativo, chamado NAPQI, ou N-acetil-p-benzoquinona imina. O que ocorre nas doses elevadas é que essas vias metabólicas estão completamente saturadas, levando a maior parte da metabolização para a oxidação. Quando o NAPQI se acumula acaba por se ligar a moléculas protéicas do hepatócito, causando lesão direta nos tecidos (DANTAS, 2013; PARANÁ, 2011).

O fenobarbital é um derivado do ácido barbitúrico que atua no receptor GABA, bloqueando a entrada de cálcio nas terminações pré-sinápticas, inibindo a transmissão do neurotransmissor glutamato. É uma droga utilizada como anticonvulsivante hipnótico e sedativo. O fenobarbital, por ser um auto-indutor de enzimas microsossomais do sistema P-450, aumenta a sua própria metabolização e a biotransformação de outras drogas administradas concomitantemente, sendo a hepatotoxicidade um dos efeitos colaterais mais severos (MOMM, 2008).

Através do estudo em modelo experimental, este trabalho pretende promover a elucidação das interações medicamentosas no metabolismo hepático de *Morinda citrifolia* concomitante com o tratamento com paracetamol ou fenobarbital, conforme observações clínicas, de forma a esclarecer se o dano hepático demonstrado nos pacientes foi devido somente à ação do medicamento hepatotóxico, ao consumo de Noni ou devido a interação medicamentosa dos dois tratamentos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a atividade hepática do extrato aquoso do fruto de *Morinda citrifolia* em camundongos BALB-C, e sua resposta interativa entre o uso crônico com medicamentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar função hepática através de ensaios bioquímicos do soro sanguíneo de camundongos tratados com *Morinda citrifolia* e a interação medicamentosa com paracetamol e fenobarbital.

- Avaliar a atividade das enzimas hepatoprotetoras com o uso crônico do extrato aquoso do fruto de *Morinda citrifolia* e a interação medicamentosa com paracetamol e fenobarbital.

- Realizar análise macroscópica do fígado dos animais tratados com Noni e confeccionar lâminas histológicas para avaliação microscópica do tecido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos de Noni (*Morinda citrifolia*) foram colhidos em árvores localizadas no bloco ICB – UFAM nas proximidades do laboratório de Histologia, bloco C, no horário de 14 às 15 horas da tarde, e transportados ao laboratório Planta-piloto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF-UFAM). Foram coletados 8 kg de frutos de Noni com boas características externas de qualidade e de aspecto variado quanto ao tamanho.

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Neste estudo, tentou-se reproduzir a utilização das espécies vegetais pela medicina popular na obtenção do extrato bruto. Os frutos e sementes foram secos em estufa a 40° C, e pulverizados utilizando moinho mecânico (Marca Tecnal®). O extrato foi obtido por maceração exaustiva, com auxílio de banho em lavadora ultrassônica (Marca Unique® modelo USC 2800A) durante 15 minutos. Foram utilizados aproximadamente 700g de frutos e cerca de 8 L de água destilada como solvente. O material foi separado em frascos de vidro âmbar, acondicionados em geladeira à 5° C. O material foi posteriormente liofilizado (Liofilizador Marca Virtis BenchTop® Modelo 2KBETS) para obtenção do extrato seco.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *BALB-C*, 15 machos e 15 fêmeas, pesando entre 20 a 30 g, oriundos do Biotério Central da UFAM. Os animais foram mantidos em grupos de 3 por gaiola de metal, em temperatura ambiente de $\pm 20^{\circ}$ C, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e ração padrão *ad libitum*. Todas as etapas desta pesquisa seguiram as normas internacionais de uso de animais em pesquisa pré-clínica. Este trabalho faz parte do projeto “*Screening* farmacológico de espécies vegetais e animais da Amazônia” e encontra-se sob análise do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFAM - protocolo 043/2011.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A resposta na interação entre os medicamentos e MC (*Morinda citrifolia*) foi avaliada de acordo com o método descrito por Ahmed et al. (2001), onde os animais foram divididos em grupos de 5 em cada gaiola:

Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais

Grupo	Tratamento por via oral (p.o)
Controle	Veículo (salina)
Paracetamol (P)	400 mg/kg
Fenobarbital (F)	100 mg/kg
<i>Morinda citrifolia</i> (MC)	400 mg/kg
Interação MC x F	MC e F com intervalo de 15 minutos
Interação MC x P	MC e P com intervalo de 15 minutos

Os animais foram tratados durante 14 dias consecutivos. Após 24 horas da última dose, todos os camundongos foram devidamente anestesiados em câmara com éter etílico e mortos por deslocamento cervical.

4.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA FUNÇÃO HEPÁTICA

As amostras de sangue foram recolhidas dos animais ainda vivos por punção do plexo orbicular e recolhidas em tubos de coleta sem anticoagulante e deixado coagular durante 30 minutos à temperatura ambiente. O soro foi separado por centrifugação a 4000 rpm durante 10 min e as amostras de soro foram armazenadas a -70 ° C até à sua utilização para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

4.5.1 Determinação da atividade de AST e ALT

Foram mensurados os marcadores enzimáticos do dano hepático, as enzimas transaminases aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (AST E ALT) utilizando kits comerciais Labtest Diagnóstica[®], por método cinético otimizado, conforme instruções disponíveis nos kits. A leitura foi feita em analisador automático Chem Well[®].

4.5.2 Determinação da concentração de Proteínas Totais e Albumina

As proteínas totais (PT) e a Albumina (ALB) foram estimadas utilizando-se kits laboratoriais Labtest Diagnóstica[®], através do método do Biureto para PT e verde de Bromocresol para ALB. A leitura foi feita em analisador automático Chem Well[®].

4.6 VIABILIDADE DE ENZIMAS HEPÁTICAS DO STRESS OXIDATIVO

Os fígados dos animais foram cirurgicamente excisados, limpos e pesados individualmente. Os órgãos foram divididos ao meio e pesados aproximadamente 0,5 g por amostra, o restante do material foi reservado. As amostras foram maceradas individualmente em gral de porcelana com auxílio de pistilo e adicionou-se 5 mL de tampão pirofosfato 100 mM e 1 mM de EDTA (pH 7,4). Cada amostra foi aliqüotada em tubos Falcon e centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min.

4.6.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi realizada conforme o método proposto por Nishikimi (1972). O método se baseia na conversão da redução do Nitroazul de tetrazólio (NBT) em Formazana indicando a presença do ânion superóxido. Inicialmente adicionou-se 80 µL de Fenazina Metilsulfato (PMS) (186 µM) e 20 µL NBT (300 µM), 13 µL de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e 2 µL do homogenato do fígado. Todas as soluções citadas foram feitas em tampão pirofosfato de sódio (pH 8.3 a 0,052 M). A microplaca foi incubada por 90 segundos e, logo após, foi adicionado o ácido acético para interromper a reação. A leitura foi feita em comprimento de onda de 560 nm (ChemWell[®] Awareness Technology) e os resultados obtidos foram expressos em U/mL.

4.6.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorbância ocasionado pela redução de H₂O₂ a água, pela CAT presente na amostra, medido espectrofotometricamente a 240 nm, durante tempo predeterminado (AEBI, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) preparada e titulada no dia da análise. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H₂O₂ e 20 µL de amostra de homogenato. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida

durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os valores expressos em mmol de H₂O₂ consumido por minuto e por grama.

$$\text{CAT} = \Delta \text{ abs} \times \text{diluição}^* \times 1,5 \text{ (mmol.min}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{)}$$

$$* \text{ diluição (homogenato } 20 \times \text{ cubeta } 100) = 2000$$

4.6.3 Proteção à Lipoperoxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada a partir da reação de substância reativas com o ácido tiobarbitúrico gerando bases de Schiff segundo OHKAWA *et al.*, (1979), modificado por DRAPER & HADLEY, (1990). Foram adicionados em tubos de ensaio 0,25 mL de homogenato, 100 µL Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%, 0,75 mL de HCl 0,5M, 0,75 mL ácido tiobarbitúrico (TBA), 25 µL de butil-hidroxitolueno (BHT) e 125 µL H₂O deionizada. Após a adição dos reagentes, as amostras foram agitadas utilizando o homogeneizador e aquecidas a 100°C em banho seco por 15 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min e lidas em espectrofotômetro, no comprimento de 535 nm. A concentração de MDA total das amostras foi determinada mediante utilização equação da curva do padrão de MDA com 5 diluições (0,25; 0,5; 1; 2; 4) expresso em µmol/L.

4.7. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os fígados dos animais foram pesados, e como anteriormente descrito, foram divididos ao meio, uma parte para o estudo da viabilidade das enzimas do *stress* oxidativo, e a outra parte foi introduzida em tubos Falcon com 30 mL de formol tamponado à 10% para fixação do órgão e posterior confecção de lâminas histológicas utilizando coloração Hematoxilina-Eosina HE (WATINGTON, 1972).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como médias ± erros padrão da média (SEM) e analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida do teste de multicomparação de Tukey. Um valor de p <0,05 foi considerado significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material para as análises foi mantido armazenado em ultra freezer à -80°C material armazenado. Durante a manutenção do material para posteriores análises bioquímicas e histológicas, houve problemas com constantes interrupções de energia elétrica no setor sul do campus universitário, que interferiu na análise dos resultados da viabilidade enzimática.

Os fígados dos animais foram pesados individualmente. O peso e o desvio médio estão descritos na tabela 2:

Tabela 2 – Peso em gramas (g) dos fígados dos animais tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni (N), solução de Fenobarbital (F) ou Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média \pm SEM.

Parâmetro	Grupos experimentais					
	V	N	F	P	N+F	N+P
Peso (g)	2,48 \pm 0,6985	2,442 \pm 0,479	2,482 \pm 0,295	2,093 \pm 0,08	2,013 \pm 0,451	1,94 \pm 0,276

ANOVA, seguida do Teste de Múltipla Comparação de Tukey.

5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AST E ALT

A análise bioquímica realizada no ensaio *in vivo* é um parâmetro útil para prever alterações no organismo decorrentes de possível dano toxicológico (COELHO, 2011). As enzimas ALT e AST são consideradas hepatoespecíficas e têm aumento imediato após lesão hepatocelular ou alteração na permeabilidade da membrana celular sendo que AST estará na maioria das vezes mais alterada do que ALT (PEREIRA, 2011), apesar de que a ALT é mais específica como marcador para danos hepáticos (GIANNINI et al, 2005), pois esta enzima existe em maior quantidade no citosol do hepatócito do que em outros tecidos, portanto o seu aumento, mesmo não sendo maior que o da AST, tem mais significado clínico como sinal de lesão hepática (ALMEIDA, 2012).

Tabela 2 - Avaliação da atividade das enzimas AST e ALT nas respostas hepáticas dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni (N), solução de Fenobarbital (F) ou Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média±SEM.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	V	N	F	P	N+F	N+P
ALT	30,37±7,89	152,6±12,56	56,80±6,71	236,7±0,0	78,90±8,28	109,8±18,34
AST	177,1±6,58	296,0±32,43	149,0±20,38	231,0±18,00	217,7±72,85	261,0±13,55

ANOVA, seguida do Teste de Múltipla Comparação de Tukey.

Os dados apresentados na Tabela 2 não apresentaram diferença estatística significativa, porém o erro padrão da média demonstra que os resultados entre os indivíduos de cada grupo foram determinantes para tal. O problema com o armazenamento da amostra em temperatura à -80°C foi preponderante para a complicação de análise dos resultados. Apesar disso, faremos uma exposição, mesmo empírica, do que observamos:

Em relação aos níveis de ALT, nota-se uma diminuição desta nos grupos de interação N+P (109,8±18,34) e N+F (78,90±8,28) em relação ao grupo tratado somente com N (152,6±12,56), no entanto os três grupos foram superiores em valores quando comparados ao grupo tratado somente com o veículo. Já nos níveis de AST, o grupo que apresentou maior atividade dessa enzima foi N (296,0±32,43), e a atividade de AST foi discretamente diminuída, comparado aos grupos de interação N+P (261,0±13,55) e N+F (217,7±72,85).

WANG (2008) e MARTÍNEZ (2013) apresentam resultados para o Noni tendo efeito hepatoprotetor em modelo de indução com CCl_4 , havendo diminuição da atividade das enzimas AST e ALT, não corroborando com os resultados apresentados nesse estudo. HADIJAH *et al*, (2008) avaliou a atividade de Noni em três doses (5, 10 e 20%) em ratos. Ele demonstrou aumento da atividade das enzimas ALT e AST na dose mais alta do tratamento com *M. citrifolia*, demonstrando injúria hepática. A possibilidade de uso de baixas concentrações dos extratos de Noni pode justificar os seus primeiros efeitos benéficos relatados pela população, no entanto, com o uso constante e o aumento das doses, além do consumo com outros tipos de drogas como nos casos apresentados de intoxicação por Noni com paracetamol e fenobarbital, pode explicar o dano hepático observado nos usuários.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PT E ALB

O fígado é o sítio de síntese da maioria das proteínas plasmáticas, ocorrendo cerca de 90% da síntese de proteínas totais, e 100% da síntese de albumina. Assim, uma destruição extensa do tecido hepático resulta em baixos níveis séricos dessas moléculas (MCPHERSON, 2012). As proteínas são importantes para avaliar a função de síntese do fígado, pois quando há hepatotoxicidade mediada por xenobióticos, ocorre diminuição nos níveis séricos de ALB e PT (ALMEIDA, 2012).

Tabela 3 - Avaliação do efeito na atividade das Proteínas Totais e Albumina na resposta hepática dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni (N), solução de Fenobarbital (F) e Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média±SEM.

Parâmetro	Grupos experimentais					
	V	N	F	P	N + F	N + P
Proteínas Totais	7,960±0,42	7,183±0,41	5,900±0,49	5,900±0,23	4,825±0,73 ^{**} , a	6,100±0,51
Albumina	4,300±0,11	4,250±0,13	3,880±0,35	3,867±0,07	3,150±0,37 [*] , a	3,980±0,14

ANOVA, seguida do Teste de Múltipla Comparação de Tukey, onde: * p<0,005 e ** p<0,01 vs Veículo, a p<0,005 vs Noni.

Em relação à concentração de proteínas totais, nota-se diminuição na concentração de PT nos grupos tratados com os fármacos F (5,900±0,49) e P (5,900±0,23), e nos grupos de interação N + P (6,100±0,51) e N + F. Somente no grupo de interação entre N + F (4,825±0,73) houve diminuição significativa na concentração de proteínas totais dos animais tratados, refletindo o dano hepático nesse grupo. (Tabela 3)

Quanto à concentração de albumina, observou-se diminuição na concentração de ALB nos grupos tratados com os fármacos F (3,880±0,35) e P (5,900±0,23) e nos grupos de interação N + P (6,100±0,51) e N + F. Porém novamente, no grupo tratado com N + F (3,150±0,37) foi observado diferença significativa, demonstrando diminuição na concentração de albumina.

HADIJAH *et al* (2008), ao avaliar a função hepática de ratos tratados com *M. citrifolia*, demonstrou diminuição na concentração de proteínas, corroborando com nossos resultados apresentados.

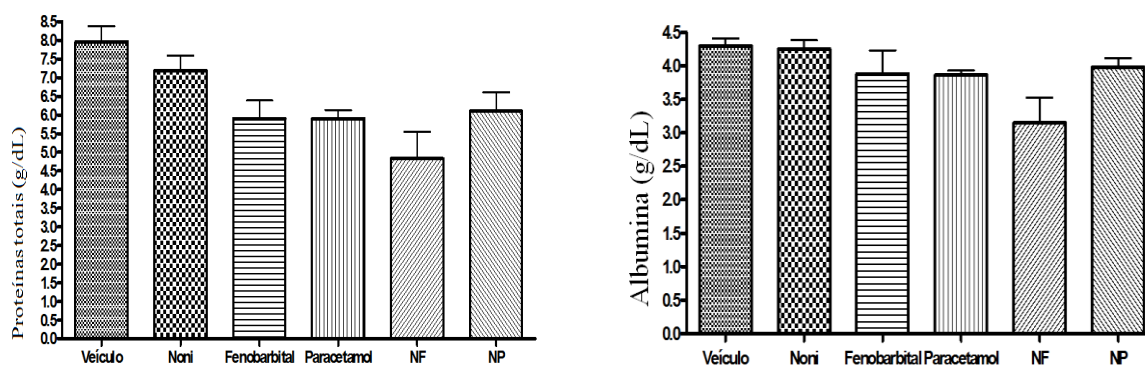


Figura 1- Avaliação do efeito na atividade das Proteínas Totais (PT) e Albumina (ALB) na resposta hepática dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni, solução de Fenobarbital (F) e Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média±SEM. ANOVA, seguida do Teste de Múltipla Comparação de Tukey, onde: * p<0,005 vs Veículo, a p<0,005 vs Noni.

5.3 VIABILIDADE DE ENZIMAS HEPÁTICAS DO *STRESS* OXIDATIVO

O *stress* oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a geração das espécies reativas do oxigênio (ROS) e a capacidade de defesa corporal, tanto endógena quanto exógena em células intactas (LAPPAS *et al*, 2011). O *stress* oxidativo é um achado freqüente na hepatotoxicidade induzida, com a formação de radicais livres diversos que resultam na degradação oxidativa dos lipídeos (lipoperoxidação) e de proteínas nos diversos sistemas de membrana da célula (RABELO, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROS), conhecidas como radicais livres, são componentes químicos derivados radicais e não radicais livres do oxigênio, que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, que reagem com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, oxidando-os (GUIMARÃES, 2013). Dentre essas espécies reativas, destacam-se o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), os hidroperóxidos orgânicos (ROOH), radicais peróxil ($\text{RO}\bullet$, alcóxil e $\text{ROO}\bullet$), e o ácido hipocloroso (HOCl) (LAPPAS *et al*, 2011). Sabe-se que em condições fisiológicas, EROS são geradas constantemente pelas células por várias enzimas oxidases e pelo processo de respiração mitocondrial (WIESE, 2008).

O sistema de defesa do organismo é representado principalmente pela defesa antioxidante enzimática, onde destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) entre outras (DAVID, 2011). Essas moléculas são capazes de bloquear a

iniciação da oxidação, dessa forma removendo as espécies reativas ao oxigênio (COTINGUIBA, 2013).

As enzimas antioxidantes são capazes de eliminar o superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), uma espécie reativa anteriormente descrita. O superóxido é inicialmente convertido em H_2O_2 e em seguida reduzido à água. A primeira etapa de conversão é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Existem 3 isoformas de SOD nos mamíferos, SOD de cobre / zinco (CuZnSOD), SOD de manganês (MnSOD) e SOD extracelular (ECSOD). MnSOD e ECSOD estão localizadas na matriz mitocondrial e na superfície exterior das membranas das células, respectivamente, ao passo que CuZnSOD encontra-se no citosol (LAPPAS *et al*, 2011).

Tabela 4 - Avaliação da atividade antioxidante da resposta hepática dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni (N), solução de Fenobarbital (F) e Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média \pm SEM.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	V	N	F	P	N + F	N + P
SOD	251,8 \pm 70,60	289,0 \pm 88,22	253,1 \pm 65,90	289,9 \pm 201,3	129,7 \pm 18,85	255,8 \pm 46,47
CAT	225,6 \pm 1,25	522,0 \pm 105,0**	462,0 \pm 18,1**	321,0 \pm 6,00	433,3 \pm 26,18*	1148 \pm 51,90**,b

ANOVA, seguida do Teste de Múltipla Comparação de Tukey, onde: * $p < 0,005$ e ** $p < 0,01$ vs Veículo, a $p < 0,005$ vs Noni, b: $p < 0,001$ vs Paracetamol.

Nos experimentos para avaliação da superóxido dismutase hepática, não foi demonstrado diferença significativa entre os grupos e um erro padrão acentuado foi observado provavelmente devido a problemas de armazenamento das amostras de fígado, conforme explicado anteriormente. Porém é observado aumento da concentração da SOD no grupo P (289,9 \pm 201,3) em relação aos demais grupos. Em contrapartida, a concentração da SOD nos grupos N + F (129,7 \pm 18,85) mostrou-se em níveis mais baixos encontrados. Sabe-se que a SOD é afetada pelo stress oxidativo, podendo haver decréscimo da concentração da enzima e até mesmo sua inativação (MANNA, 2006). Após a etapa de dismutação do ânion superóxido, catalisada pela enzima SOD, ocorre a formação de H_2O_2 , que é convertida em água pela enzima catalase no lisossomo ou pela glutathiona peroxidase (GHS-Px) nas mitocôndrias (SOUZA, 2014). Geralmente o aumento da atividade da CAT sugere ação oxidativa excessiva não contida pela atividade antioxidante não enzimática que tenha favorecido a formação de peróxido de hidrogênio, potencializando a produção do radical hidroxila via reação de Haber-Weiss.

Também esta elevada atividade da CAT poderá ser um indicativo de uma forte geração de ($\bullet\text{O}_2^-$), que foi dismutado pela SOD (WIESE, 2008).

No presente trabalho, foram observadas alterações significativas na atividade da CAT nos grupos N ($522,0 \pm 105,0$) e N + F ($433,3 \pm 26,18$) e N + P ($1148 \pm 51,90$) em relação ao grupo controle. Isso demonstra intensa atividade enzimática nos grupos experimentais de interação, principalmente quando no tratamento de Noni concomitante com paracetamol.

SENTHIL *et al* (2013) verificaram aumento da atividade da SOD e da CAT, em ensaio para avaliação do potencial antioxidante e antidiabético de *Morinda citrifolia*. SAMINATHAN *et al* (2014) mostra aumento da atividade da CAT e SOD em animais tratados com Noni durante 28 semanas e diminuição da lipoperoxidação lipídica, em ensaio para avaliação do potencial antioxidante e anticancerígeno dos frutos de Noni. Segundo os autores, o aumento da atividade dessas enzimas reflete a capacidade hepatoprotetora e antioxidante do Noni.

Nossos resultados, portanto não corroboram com a literatura, sendo que os grupos onde deveriam mostrar algum dano hepático (P e F) parecem reproduzir um resultado diferente do esperado. Deve-se considerar que houve problemas de descongelamento com as amostras de fígado que podem ter alterado o comportamento das enzimas SOD e CAT doseadas, dessa forma não poderemos estabelecer uma relação confiável para os resultados apresentados, sendo necessário uma contra-prova para avaliar de forma precisa o comportamento dessas enzimas.

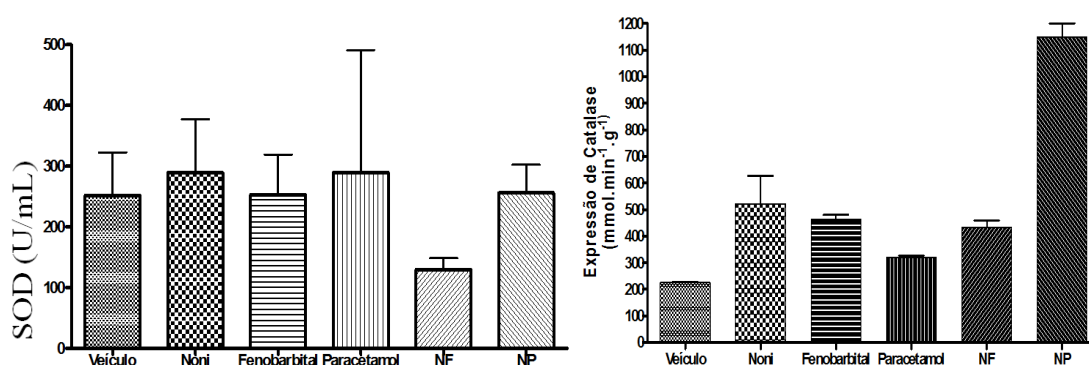


Figura 2 - Avaliação da atividade antioxidante da SOD e CAT na resposta hepática dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni (N), solução de Fenobarbital (F) e Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média \pm SEM.

A peroxidação da membrana celular leva a desorganização molecular dos lipídeos, resultando em aumento da permeabilidade da membrana e extravasamento das enzimas celulares na circulação. O aumento da peroxidação lipídica está associado com a indução de P450E1 em lesões hepáticas experimentais (DAVID, 2011).

Tabela 5 - Avaliação da atividade de TBARS da resposta hepática dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni, solução de Fenobarbital e Paracetamol e suas associações. Resultados expressos em Média±SEM.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	V	N	F	P	N + F	N + P
TBARS	0,6400±0,19	2,130±0,43	2,433±0,28	2,613±,28*	2,103±0,08	1,620±0,56

ANOVA, seguida do Teste de Múltipla Comparação de Tukey, onde: * p<0,005 vs Veículo

A medida de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é usada para avaliar a lipoperoxidação, ou seja, quando os lipídeos sofrem ação de radicais livres (RABELO, 2008). TBARS reflete a quantidade de malonaldeído (MDA) formado, um produto final da peroxidação dos ácidos graxos da membrana (HALLIWELL *et al*, 1894).

Nos ensaios para avaliação da lipoperoxidação lipídica, foi observado aumento na concentração de MDA nos grupos de N e tratamento com fármacos P e F, e nos grupos de interação N + F e N + P, apesar não ter sido observado diferença significativa, exceto no grupo tratado com paracetamol (P). O aumento na concentração de MDA, reflete a peroxidação dos ácidos graxos de membrana, ou seja, dano oxidativo ao tecido hepático. Na figura 3, é demonstrado que a concentração de MDA do grupo tratado com Noni é semelhante ao grupo tratado com os fármacos hepatotóxicos, significando que a utilização de *M. citrifolia* promoveu dano hepático, porém, nos grupos de interação N + P e N + F, observa-se uma diminuição da concentração de MDA, indicando efeito hepatoprotetor, da mesma forma como discutido anteriormente no ensaio de avaliação das transaminases, onde o Noni pareceu agir como agente hepatotóxico sozinho e hepatoprotetor, quando em interação com os fármacos.

SAMINATHAN, *et al* (2014) e SENTHIL, *et al* (2013) mostra diminuição da lipoperoxidação lipídica expressa em concentrações de MDA em ratos tratados com *Morinda citrifolia*.

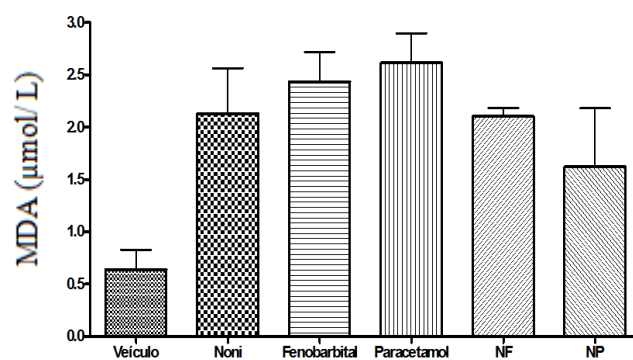


Figura 3 - Avaliação da atividade do TBARS na resposta hepática dos camundongos tratados com 400mg/kg do extrato aquoso de Noni (N), solução de Fenobarbital (F) e Paracetamol (P) e suas associações. Resultados expressos em Média±SEM.

5.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As lâminas histológicas ainda não foram concluídas. Esperamos terminar para apresentar os resultados no CONIC.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, a complicação no armazenamento devido às recorrentes faltas no fornecimento de energia elétrica no setor sul do campus universitário foi determinante para a inconclusão de nossos resultados e a geração de um erro padrão alto em vários testes. No entanto, os resultados são indicadores importantes neste estudo de interação medicamento x plantas medicinais.

No ensaio para avaliação das transaminases hepáticas ALT e AST, foi demonstrado que nos grupos tratados com Noni 400 mg/kg e os fármacos Paracetamol e Fenobarbital, houve discreta diminuição dos níveis de atividade enzimática. Em contrapartida, os animais tratados somente com Noni demonstraram ter níveis de transaminases semelhantes aos tratados somente com os fármacos hepatotóxicos.

Na avaliação das proteínas totais e albumina, houve diminuição significativa no grupo tratado com Noni e Fenobarbital, e nos demais grupos houve discreta diminuição em relação ao grupo controle, significando dano hepático.

Não traçamos resultados conclusivos para avaliação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase pois os resultados obtidos estão em completo desacordo com a literatura.

Em relação à avaliação do estado de lipoperoxidação da membrana dos hepatócitos, os resultados mostram aumento da lipoperoxidação nos grupos tratados somente com Noni ou os fármacos Paracetamol e Fenobarbital, e nos grupos de interação entre Noni e os fármacos, ocorre diminuição da lipoperoxidação.

É necessário uma contra-prova para avaliar de forma precisa o comportamento tanto das enzimas hepáticas quanto dos parâmetros bioquímicos. Infelizmente, o Biotério Central da UFAM está vedado para experimentações com modelos animais, dessa forma dificultando a repetição dos experimentos.

Esperamos concluir a avaliação histológica para apresentar resultados precisos no CONIC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUALMJID, R. J.; SERGI, C. Hepatotoxic Botanicals - An Evidence-based Systematic Review. **J Pharm Pharmaceut Sci** 16(3) 376-404, 2013.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**;105:121-6, 1984

AHMED, B.; ALAM, T.; KHAN, S.A. Hepatoprotective activity of *Luffa echinata* fruits. **J Ethnopharmacol.** 76:187-9, 2001.

AHN, B. M. Herbal preparation-induced liver injury. **Korean J Gastroenterol.** Sep;44(3):113-25. 2004.

AKIHISA, T.; TOCHIZAWA, S.; TAKAHASHI, N.; YAMAMOTO, A.; ZHANG, J.; KIKUCHI, T.; FUKATSU, M.; TOKUDA, H.; SUZUKI, N. Melanogenesis-inhibitory saccharide fatty acid esters and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **Chem Biodivers.** Jun;9(6):1172-87, 2012.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18(1): Jan./Mar. 2008.

ALMEIDA, D. V. A. Hepatotoxicidade de nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) não funcionalizados em camundongos [Dissertação]. Mestrado em Nanociências, Centro Universitário Franciscano de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2012.

ALMEIDA, F. M.; ALVES, M. T. S. S.; AMARAL, F. M. M. Uso de Plantas com Finalidade Medicinal por Pessoas Vivendo com HIV/ AIDS em Terapia Antirretroviral. **Saúde Soc.** São Paulo, v.21, n.2, p.424-434, 2012.

ANDRADE, C.; HASS, S. E. H.; COSTA, T. D; ARAUJO, B. V. Comparação do metabolismo interespecies dos principais anticonvulsivantes usados na prática clínica. **Rev. Bras. Farm.** 94 (3): 321 – 330, 2013.

ANVISA, Agência de Vigilância Sanitária. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda Citrifolia*, também conhecida como Noni. Informe Técnico nº. 25, de 29 de maio de 2007.

BEAUCHAMP C.; FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.** 44:276-87, 1971.

BEH, H. K; SEOW, LJ; ASMAWI, MZ; ABDUL MAJID, AM; MURUGAIYAH, V; ISMAIL, N; ISMAIL, Z. Anti-angiogenic activity of *Morinda citrifolia* extracts and its chemical constituents. **Nat Prod Res.** 26(16):1492-7, 2012.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, n.4, p. 228-237. 2010.

BOWERS, G. N.; MCCOMB, R. B. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase, **Clin Chem**, 12:70, 1966.

BRITO, D. R. B.; FERNANDES, R. M.; LIMA, M. Z.; FERNANDES, C. M.; FERREIRA, M. D. S.; ROLIM, F. R. L.; FILHO, M. L. S. Atividade anti-helmíntica dos extratos aquoso e etanólico do fruto de *Morinda citrifolia* sobre *Ascaridia galli*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 18, n. 4, p. 32-36, out.-dez. 2009.

CHANG, Q.; WO, S.; NGAI, K. L. K.; WANG, X.; FOK, B.; NGAN, T. M.; WONG, V. T.; CHAN, T. Y. K.; LEE, V. H. L.; TOMLINSON, B.; CHAN, P. K. S.; CHOW, M. S. S.; ZUO, Z. Bench to Bed

Evidences for Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions Involving Oseltamivir and Chinese Medicine. **Hindawi Publishing Corporation: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Volume, Article ID 354172, 2014.

CHIDAMBARA, M. K.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. **J Agric Food Chem**. 50:4791–5, 2002.

CLAFSHENKEL, W. P.; KING, T. L.; KOTLARCZYK, M. P.; CLINE, J. M.; FOSTER, W. G.; DAVIS, V. L.; WITT-ENDERBY, P. A. Morinda citrifolia (Noni) Juice Augments Mammary Gland Differentiation and Reduces Mammary Tumor Growth in Mice Expressing the Unactivated C-erbB2 Transgene. **Evid Based Complement Alternat Med**. ;2012:487423, 2012.

COMMISSION E. Commission decision of 5 June 2003 authorizing the placing on the market of 'noni juice' (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European parliament and of the council. Europe: Official Journal of the European Union, p. 12, 2003.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; L. V. S. SACRAMENTO. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Rev. Bras. Farmacogn**. 15(3):jul/set. 2005.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** 15(3):231-7, 2013.

DANTAS, R. T. Hepatotoxicidade do paracetamol em pacientes com dengue [Monografia]. Salvador: Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2013.

DAVID, C. A quercetina protege o fígado na lesão hepática induzida por tioacetamida (TAA) e suas complicações [Tese]. Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DAVID, L. E. Avaliação das atividades citotóxica, antifúngica e do potencial de segurança *in vivo* de *ar-turmerona* (*Curcuma longa* L.) [Dissertação]. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNICENTRO. Guarapuava, 2013.

DUNNET, C. W. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20:482–92, 1964.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v.172, p.367-79, 2005.

GOODMAN L. S. G.; HARDMAN J. G.; LIMBIRD L. E. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, 1821p. , 2010.

GUIMARÃES, M. R. M.; VIANNA, L. M. A. Estresse oxidativo e suplementação de antioxidantes na atividade física: uma revisão sistemática. **Rev Mackenzie de Educação Física e Esporte** – v. 12, n. 2, p. 155-171, 2013.

HABBU, P. V.; SHASTRY, R. A.; MAHADEVAN, K. M.; JOSHI, H.; DAS, S. K. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Argyreia Speciosa* in rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med**.5:158–64, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of iron oxygen radical reactions. **Methods Enzymol.**; New York, v. 105. P. 47. 1984.

JÚNIOR, J. V. R. Perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores de função hepática e renal em hamsters tratados com extratos de sementes de urucum [Dissertação]. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2008.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering research and design* 90 622–632, 2012.

KUMAR, D. J.; SANTHI, R. J.; Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of *Morinda pubescens* leaves in human liver cancer cell line. **Asian Pac J Trop Med.** May;5(5):362-6. 2012.

LAPPAS, M.; HIDEN, U.; DESOYE, G.; FROEHLICH, J.; HAUGUEL-DE MOUZON, S.; JAWERBAUM, A. The Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. **Antiox & Redox Sign.** Vol. 15, n. 12, 2011.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol (Acetaminofem). **Rev. Bras. Farm.** 93(4): 411-414, 2012.

MANNA, P., SINHA, M.; SIL, P. C. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. **BMC complementary and alternative medicine**, 6(1), 33. 2006.

MCCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integr Cancer Ther.** Jun;1(2):110-20, 2002.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 21 ed, Barueri – São Paulo: **Manole**, 2012.

MELCHARDT, T.; MAGNES, T.; WEISS, L.; GRUNDBICHLER, M.; STRASSER, M.; HUFNAG, C.; MOIKI, M.; GREIL, R.; EGLE, E. Liver toxicity during temozolomide chemotherapy caused by Chinese herbs. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:115, 2014.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S. VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a noni preparation (*Morinda citrifolia*). **Eur J Gastroenterol Hepatol** 17: 445-7, 2005.

MOMM, M. S. L. Hepatopatia associada ao uso crônico de fenobarbital: relato de caso [Monografia]. Itapema: Instituto de Qualittas – Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos animais, Universidade Castelo Branco, 2008.

MRZLJAK, A.; KOSUTA, IVA.; SKRTIC, A.; KANIZAJ, T. F.; VRHOVAC, R. Drug -Induced Liver Injury Associated with Noni (*Morinda citrifolia*) Juice and Phenobarbital. **Case Rep Gastroenterol.** 7:19–24, 2013.

MÜLLER, J. C.; BOTELHO, G. G.; BUFALO, A. C.; BOARETO, A. C.; RATTMANN, Y. D.; MARTINS, E. S.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M. F.; DALSENTER, P. R. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): in vivo and in vitro reproductive toxicology. **J Ethnopharmacol.** Jan 21;121(2):229-33, 2009.

NICHOLAS, M. A. A Spectrophotometric assay for iodide oxidation by thyroid peroxidase. **Anal Biochem.**; 4:341–5, 1962

NISHIKIMI, M.; APPAJI RAO, N.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and biophysical research communications**, v.46, n.2, p.849-854. 1972.

NUALSANIT ,T.; ROJANAPANTHU, P.; GRITSANAPAN, W.; LEE, S. H.; LAWSON, D.; BAEK, S. J.; Damnacanthal, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. **J Nutr Biochem.** Aug;23(8):915-23, 2012.

PAK, E.; ESRASON, K.T.; WU, V. H. Hepatotoxicity of herbal remedies: an emerging dilemma. **Prog Transplant.** Jun;14(2):91-6, 2004.

PARANÁ, R. Mecanismo de hepatotoxicidade medicamentosa: o exemplo do acetaminofeno/paracetamol. **Rev Suplemento Hepatotox**, 2011.

PIARU, S. P.; MAHMUD, R.; ABDUL MAJID, A. M.; MAHMOUD NASSAR, Z. D. Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. **Asian Pac J Trop Med**. Apr;5(4):294-8, 2012.

POSADZKI, P. WATSON, LEALA K. ERNST, E.; Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. **Clinical Medicine** Vol 13, No 1: 7–12, 2013.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit-phytochemistry, pharmacology, safety. **Planta Med**. Mar;73(3):191-9. Epub 2007 Feb 7, 2007.

PROTESTE. É natural, mas pode fazer mal. Disponível em: <http://www.proteste.org.br/alimentacao/nc/noticia/e-natural-mas-pode-fazer-mal>. Acesso: 23.03.2013.

RABELO, A. F. L. Estudo da toxicidade hepática da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), um diterpeno obtido de *Croton cajucara* Benth, e de estratégias farmacológicas preventivas em modelos animais [Dissertação]. Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **Am J Clin Pathol** 28: 56-63, 1957.

SANTOS, C. F. S. Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação no dano hepatocelular em ratos Wistar submetidos a dietas deficientes em fatores lipotróficos [Tese]. Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

SCHMITZ, W. O.; CECCHINI, R.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, H. O. Atividade hepatoprotetora do extrato alcoólico da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá-verde) em ratos Wistar tratados com dietilnitrosamina. **Rev. Bras. Farm.** 19(3): 702-709, Jul./Set. 2009.

SILVELLO, C. L.; O uso de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS: uma revisão bibliográfica. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

SOUZA, R. O. S. Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de resíduos de frutos amazônicos. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

STADLBAUER, V.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; SCHMERLAIB, J.; KRISPER, P.; TRAUNER, M.; STAUBER, R. E. Hepatotoxicity of NONI juice: Report of two cases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 30, p. 4758-4760, 2005.

STADLBAUER, V.; WEISS, S.; PAYER, F.; STAUBER, R. E. Herbal does not at all mean innocuous: the sixth case of hepatotoxicity associated with *Morinda citrifolia* (Noni). **Am J Gastroenterol**. Sep;103(9):2406-7, 2008.

VENDRUSCOLO, G. S. & MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Iheringia, Sér. Bot.*, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, jan./dez. 2006.

WATINGTON, E. A. *Histology methods for bone*. London: Burthewoods, 1972.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J. AND WHITE, L. D. A Safety Review of Noni Fruit Juice. **Journal of Food Science**, Vol. 71, 2006.

WIESE, L. P. L. Avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória de extrato e frações de *Alternanthera tenella* Colla. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

WOODSON, R. F. Probability and mathematical statistics. Chichester: Wiley; Statistical methods for the analysis of biochemical data, 1987.

YU, E. L.; SIVAGNANAM, M.; ELLIS, L.; HUANG, J.S. Acute hepatotoxicity after ingestion of *Morinda citrifolia* (Noni Berry) juice in a 14-year-old boy. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** Feb;52(2):222-4, 2011.

ZHANG, H; LI, J; XIA, J; LIN, S. Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis*. **Int J Biol Macromol.** Mar 16, 2013.

ZHOU, S. F.; WUE, C. C.; YU, X. Q.; WANG, G. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. **Curr. Drug. Metab.**, v. 8, p. 526-553, 2007.

WANG, M.Y.; NOWICKI, D.; ANDERSON, G.; JENSEN, J.; WEST, B. Liver Protective Effects of *Morinda citrifolia* (Noni). **Plant Foods Hum Nutr.** Jun; 63(2): 59–63, 2008.

HADIJAH, H.; NORMAH, A.; TARMIZI, S. A. Thirteen-week toxicity study of mengkudu juice (*Morinda citrifolia*): Effect on the blood analysis. **J. Trop. Agric. Food Sci.**, 36: 221-226, 2008.

SENTHILL, N.; BALU1, P. M.; MURUGESAN, K. Antihyperglycemic effect of Spirulina, Insulin and *Morinda citrifolia* against streptozotocin induced diabetic rats. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci** (10): 537-559, 2013.