



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DOUGLAS MARINHO ABREU

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Morinda citrifolia* SOBRE O TUMOR DE
EHRlich**

São Luís – MA
2017



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

DOUGLAS MARINHO ABREU

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Morinda citrifolia* SOBRE O TUMOR DE
EHRlich**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Alessandra Lima Rocha

São Luís- MA
2017

Abreu, Douglas Marinho.

Atividade antitumoral da *Morinda citrifolia* sobre o tumor de Ehrlich: in vivo/
Douglas Marinho Abreu - São Luís, 2017.

44f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade
Estadual do Maranhão - UEMA, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Alessandra Lima Rocha

1. Fitoterápico 2. Antineoplásico. 3. Tumor de Erlich I. Título
CDU:



DOUGLAS MARINHO ABREU

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Morinda citrifolia* SOBRE O TUMOR DE
EHRlich**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Higor Ferreira da Silva
Mestrando em Ciência Animal
1º examinador

Renata Mondego de Oliveira
Doutoranda em Biotecnologia – RENORBIO
2º examinador

Prof. Dr. Alessandra Lima Rocha (Orientadora)
Doutora em Ciência Animal
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus que sem ele não poderia ter chegado até aqui. Também aos meus pais, Maria José Marinho e Antônio Carlos Abreu, que são e serão sempre os meus maiores exemplos.

Agradecer a todos os meus amigos da turma 79 pelo apoio e ajuda durante todos esses anos e por ter tornado essa jornada divertida. Agradeço, em especial, meu amigo Matheus Silva por estar desde o primeiro dia do meu lado fielmente, me dando força e me fazendo acreditar que os dias podem ser e serão sempre melhores. Até nos dias mais difíceis, eu me senti seguro. Obrigado

Gostaria de agradecer às professoras Ana Lucia Abreu Silva e Alessandra Lima Rocha pela disponibilidade na realização do experimento propostos, pelas oportunidades concedidas e pela paciência.

Gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Anatomopatologia por me conceder o estágio e assim contribuir imensamente no conhecimento adquirido durante a minha formação. Assim como a sua disponibilização do espaço para realização do trabalho. E também pelas muitas horas de risadas e momentos de descontração. Renata, Isadora, Higor, Breno, Anderson, Allana, Carol, todos. Vocês me inspiram.

Agradeço todos as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Avaliação ponderal dos camundongos do grupo controle e tratados com a droga vegetal de *Morinda citrifolia* nas concentrações de 125, 250, 500 mg. 32

FIGURA 2: Índice ascítico (A) e celularidade do linfonodo inguinal (B) do grupo controle e tratado com droga vegetal de *M. citrifolia* nas concentrações de 125, 250 e 500mg. 33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Fitoterápicos e tumor de Ehrlich	21
TABELA 2: Compostos identificados dos frutos, folhas e raízes de <i>M. citrifolia</i>	22
TABELA 3: Classificação do líquido ascítico de acordo com os grupos controle e tratados com a droga vegetal de <i>M.citrifolia</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%- por cento

°C – Grau Celsius

µg/mL- Micrograma por mililitro

ATCC - American Type Culture Collection

B16-F10 - Células de melanoma

BHK -Células de rim de hamster

Caco-2 – Células de adenocarcinoma de colon humano

CBA - Cytometric Bead Array

CB1 - Cannabinoid receptor 1

CB2 - Cannabinoid receptor 2

Cerb-2 - Receptor de membrana tirosina quinase

CLL - Lung peritoneal carcinomatosis

cm - Centrímetro

CO₂–Dióxido de carbono

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

DNA- Deoxyribonucleic Acid

E2 - Prostaglandin

EAC - Carcinoma Ascítico de Ehrlich

EGFR - Fator de crescimento epidérmico ou pidermal growth factor receptor

h - Horas

H.E – Hematoxilina e eosina

HCT-116 – Linhagem de células do cancer colorectal

HeLa – Células de carcinoma cervical humano

Hep2 – Células derivadas de carcinoma do epitélio laríngeo humano

HIF-1α - Hypoxia-inducible factor-1

HIV-1- *Human Immunodeficiency Virus*

HT-29 - Human colon adenocarcinoma

IC₅₀ - Inhibitory concentration

IFN- γ - Interferon gamma

IL-1- Interleucina 1

IL-2- Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

Ip - Intraperitoneal

KB – Linhagem de células do carcinoma epidermoide humano

L / min. – Litro por minuto

LDL - *Low Density Lipoproteins*

LLC - Carcinomatose peritoneal pulmonar de Lewis

LOOH - Lipid Hydroperoxide

m / z – Razão massa sobre carga

MCF7 - Linha de células do adenocarcinoma mamário humano)

mg/Kg – Miligrama por quilo

ml - Mililitro

noni-ppt - Noni- polysaccharide

PBS - Phosphate Buffered Saline

PC-3 – Linhagem de células do cancer de próstata

SAR - Superoxide Anion

TAE – Tumor Ascítico de Ehrlich

Th1 - célula T auxiliar tipo 1

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alpha

TNJ- suco do noni comercial

TSE – Tumor Sólido de Ehrlich

V – Voltagem

VEGF - Fcator de crescimento endothelial Vascular

RESUMO

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário, muito utilizado em ensaios terapêuticos. *Morinda citrifolia* (noni) é usada na medicina popular como suplemento alimentar em pacientes com diferentes tipos de câncer. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral da droga vegetal a base do fruto de *M. citrifolia* in vivo. O material vegetal foi coletado na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão e posteriormente processado para preparo da droga vegetal e para análises fitoquímicas. Para os ensaios in vivo foram utilizados 50 camundongos Swiss, divididos em dois grandes grupos: no primeiro grupo, foi realizada a indução da forma ascítica do tumor via intraperitoneal e, no segundo grupo, foi feita a indução da forma sólida do tumor, através da inoculação de células tumorais no coxim plantar esquerdo. Para realização do tratamento, os dois grupos foram subdivididos em cinco subgrupos, a seguir: três grupos tratados com a droga vegetal em diferentes concentrações (125, 250 e 500 mg/kg/dia, via oral), um grupo tratado com PBS (controle negativo) e um grupo tratado com ciclofosfamida (controle positivo). O tratamento foi iniciado após 24 horas da inoculação, com duração de sete dias, nos animais com a forma ascítica ou 14 dias, para os portadores da forma sólida do tumor. Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados para avaliação de parâmetros da evolução do tumor, bem como para análises histológicas e imunohistoquímicas. A análise fitoquímica do extrato revelou a presença dos compostos escopoletina, danacantal, ácido ursólico, noniosídeo C, ácido asperulosídico e ácido deacetil asperulosídico. No grupo do tumor ascítico, foi observada em todos os subgrupos ascite de aspecto seroso, sem diferenças quanto ao índice esplênico, hepático, circunferência abdominal e celularidade do linfonodo mesentérico, medula e baço entre os subgrupos.. Em suma, a droga vegetal não apresentou ação antineoplásica, mas não induziu a efeitos colaterais.

Palavras-chave: Droga vegetal, adenocarcinoma, ciclofosfamida e imunohistoquímica

ABSTRACT

The Ehrlich tumor is a mammary adenocarcinoma of mice widely used for therapeutic trials. *Morinda citrifolia* (noni) is used in traditional medicine as a food supplement for patients with different types of cancer. The aim of this study was to evaluate the antitumoral activity of *M. citrifolia* plant drug in vivo. The plant material was collected at Fazenda Escola, Universidade Estadual do Maranhão, and processed for preparation of the plant drug and for phytochemical analysis. For the in vivo assays were used 50 Swiss mice, divided into two major groups: in the first group, the ascitic form of the tumor was induced intraperitoneally and in the second group, the solid form was induced on the left footpad. For the treatment, both groups were subdivided into five subgroups, as follows: three groups treated with the plant drug at different concentrations (125, 250 and 500 mg/kg/day, orally), a group treated with phosphate saline buffer – PBS (negative control) and a group treated with cyclophosphamide (positive control). Treatment started 24 hours post-inoculation and lasted seven days, in the animals with the ascitic form, or 14 days, for the ones with the solid form. After the treatment, the animals were euthanized for evaluation of tumor evolution parameters, as well as for histological and immunohistochemistry analyses. Phytochemical analysis of *M. citrifolia* extract showed the presence of the compounds scopoletin, damnacanthol, ursolic acid, nonioside C, asperulosic acid and deacetyl asperulosic acid. It was observed in all subgroups of the ascitic group, a serous-looking ascites, with no differences regarding the splenic and hepatic index, abdominal circumference and cellularity of the mesenteric lymph nodes, bone marrow and spleen between the subgroups. In short, the plant drug did not present antineoplastic action, but did not induce side effects.

Keywords: Plant drug, adenocarcinoma, cyclophosphamide and immunohistochemistry

SUMÁRIO

	Páginas
1.0 INTRODUÇÃO	16
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Aspectos gerais sobre neoplasias.....	18
2.2 Tumor de Ehrlich.....	19
2.3 <i>Morinda citrifolia</i>	20
2.4 Caracterização da planta	23
2.5 Atividade Antitumoral	23
3.0 OBJETIVO	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivo específico	27
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Coleta da <i>Morinda citrifolia</i>	28
4.2 Preparação da droga vegetal de <i>Morinda citrifolia</i>	28
4.3 Espectrofotômetro de Massa	28
4.4 Ensaio tumor de ehrlich	29
4.5 Indução do tumor na forma ascítica.....	29
4.6 Ensaio terapêutico.....	29
4.7 Avaliação ponderal dos camundongos inoculados com tumor ascítico de ehrlich	30
4.8 Necropsia dos animais com tumor de ehrlich ascítico, coleta de sangue e análise dos índices	30
4.9 Volume tumoral	30
4.10 Análise estatística	31
5.0 RESULTADOS	32
5.1 Caracterização química do extrato da <i>M. citrifolia</i>	33

5.2 Tumor de Ehrlich Ascítico	33
6.0 DISCUSSÃO	34
7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
Referências	37

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grande problema de saúde pública, sendo a segunda maior causa de morte no mundo, devendo superar as doenças cardíacas nos próximos anos. A homeostasia do organismo é mantida pela proliferação celular e o processo de morte celular programada, apoptose. Sabe-se que o câncer, seja herdado ou não, é causado pela instabilidade genômica mediada por alterações no DNA, incluindo anormalidades cromossômicas, mutações, alterações na sequência do gene (WILLBANKS et al, 2016). Câncer é o termo utilizado para neoplasias malignas, e tem como terapias convencionais a quimioterapia e a radioterapia, ocasionando a morte celular por mecanismo de apoptose ou inibição da proliferação celular, tais mecanismos não são seletivos levando a morte tanto de células normais como neoplásicas (SANTOS et al, 2016).

Nos últimos trinta anos, os quimioterápicos oriundos de produtos naturais vêm sendo utilizados no tratamento de neoplasias, deste modo a prospecção desses produtos tem aumentado, visando a obtenção de novos medicamentos que possam levar a cura ou aumento de sobrevida dos pacientes com câncer (SANTOS et al, 2016). Segundo a legislação brasileira, fitoterápico é todo produto obtido exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo, publicados na literatura técnico-científica, e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Não se considera medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico aquele que inclua na sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam

elas sintéticas, semissintéticas ou naturais e nem as associações dessas com outros extratos, sejam eles vegetais ou de outras fontes, como a animal (ANVISA, 2014).

Existem muitos modelos experimentais para o estudo do desenvolvimento de neoplasias, entre eles o tumor de Ehrlich em camundongos. O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário em camundongos, análogo ao adenocarcinoma humano, por isso esse modelo permite a avaliação da atividade antitumoral de diferentes compostos, bem como seu mecanismo de ação. (VERLENGIA, 1994).

Considerando o aumento do número de casos de neoplasias em animais domésticos, e a incipiente oncologia veterinária faz-se necessário a busca de novas drogas, bem como, a obtenção de novos protocolos terapêuticos que visem amenizar o sofrimento dos animais e daqueles que os assistem. Desta forma, a droga vegetal de *M.citrifolia* foi avaliada frente ao tumor sólido e ascítico de Ehrlich, buscando conhecer a sua possível atividade e mecanismo de ação antitumoral em camundongos com adenocarcinoma mamário.

Kharis e Azimahtol (2004) demonstraram que o suco do noni tem atividade antiproliferativa por induzir apoptose em adenocarcinoma no pulmão, Taskin et. al. (2009) observou também em tumor de mama em camundongo BALB-c, que além de diminuir o tamanho do tumor promoveu a ativação de apoptose (T).

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre neoplasias

A palavra neoplasia é originária do termo neoplasma (*neo*, novo e *plasia*, formação). O conceito de neoplasia é bem amplo, mas no geral pode ser definida como uma massa anormal de tecido que se expande por meio do crescimento desordenado de células. Popularmente, as neoplasias são conhecidas como câncer, que geralmente é um termo associado a neoplasias malignas. De uma maneira geral, as neoplasias são conhecidas também pela palavra “tumor”, que é um termo associado a neoplasias tanto benignas quanto malignas (JONES et al., 2000). Para o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o conceito de câncer é o usado a um conjunto, composto por mais de 100 doenças que possuem em comum o ciclo celular desordenado e a capacidade de invadir órgãos e tecidos (PORTUGAL, 2012).

O número de casos de neoplasias em animais tem aumentado significativamente nos dias atuais (DOBSON E LASCELLES, 2011). Essa maior frequência está relacionada à melhoria no cuidado dos animais de companhia, favorecendo o aumento da expectativa de vida. (WITHROW, VAIL E PAGE, 2013).

HANSEN E KHANNA (2004) estimaram que 8 milhões de animais, entre cães e gatos, irão desenvolver algum tipo de neoplasia, o que desafia os profissionais da medicina veterinária, pois os tratamentos atuais são baseados em protocolos pouco eficazes e de alto custos, envolvendo cirurgias, quimioterapias e radioterapias. Segundo Garcia et. Al. (2009) apesar da evolução da oncologia veterinária nas últimas décadas, cerca de 50% dos pacientes oncológicos evoluem para óbito.

O desenvolvimento de novas estratégias seguras e eficazes para tratamento do câncer é extremamente necessário. Nesse contexto, as plantas medicinais representam uma fonte de produtos biologicamente ativo, cujos compostos tem potencial terapêutico, como exemplo o sulfato de vincristina e vinblastinaque foram isolados da planta *Catharanthus roseus*, opaclitaxeldas

plantas *Taxus baccata L.* e *Taxus brevifoliae o Nutt.*, irinotecan e topotecan derivados da *Camptotheca acuminata* (BRANDÃO et al, 2010).

2.2 TUMOR DE EHRLICH

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de camundongos, e foi descrito pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1905. É um modelo bastante utilizado em estudos nas áreas de oncologia, imunologia e farmacologia, principalmente para avaliar a influência do stress sob o câncer, efeitos de extratos vegetais, drogas anti-inflamatórias, agentes químicos e outros (Tabela 1) (QUILLES, 2010)

A indução do tumor de Ehrlich ocorre por meio de transplante de células tumorais por via subcutânea ou intraperitoneal. A forma sólida desenvolve-se quando a inoculação das células tumorais é realizada em tecido subcutâneo ou no coxim plantar do camundongo. Entretanto, ao administrar a suspensão de células tumorais no peritônio, o camundongo desenvolverá a forma ascítica do tumor. Após o sétimo dia de inoculação observa-se desenvolvimento da massa tumoral com conseqüente aumento do volume intraperitoneal (NERY, 2004).

O tumor ascítico apresenta como principais características o crescimento rápido, comportamento agressivo, desenvolvimento de neoplasia em todas linhagens de camundongos estudadas, reação inflamatória local, o que explica aumento na produção do fluido ascítico e conseqüente distensão da cavidade abdominal. Os camundongos normalmente evoluem para óbito no período máximo de 30 dias, devido a fatores como a pressão mecânica exercida pelo fluido ascítico, e hemorragias (NASCIMENTO et al., 2006).

A forma sólida caracteriza-se histologicamente por apresentar células pleomórficas, com citoplasma abundante, com presença ou não de vacúolos, escassez de estroma, poucas células inflamatórias e alto índice mitótico (PORTUGAL, 2012). O exame citológico do líquido ascítico do tumor de Ehrlich revela a presença de células pleomórficas e anaplásicas, aumento da relação

núcleo-citoplasma e hipercromasia nuclear. Segundo Guerra (1983) após 10 dias de inoculação do tumor, 90% das células peritoneais são células neoplásicas.

Em relação ao tumor sólido, sabe-se que por volta de sete dias da inoculação das células tumorais via subcutânea ou intramuscular, ele já possui aspecto palpável e consistência firme. Ao realizar uma incisão no tumor, nota-se áreas esbranquiçadas, características de necrose e áreas de hemorragia. Na forma ascítica observa-se um fluido viscoso e leitoso (NERY, 2004).

Histologicamente, o parênquima é indiferenciado e o estroma é constituído de fibras colágenas e capilares delicados. As células tumorais apresentam citoplasma escasso e núcleo com cromatina frouxa, contendo nucléolos evidentes e figuras de mitoses atípicas e áreas extensas de necrose e hemorragia não são infrequentes (SILVA et al., 2006).

Comparando as duas formas do tumor de Ehrlich com o mesmo período de inoculação, verifica-se que a ascítica possui uma quantidade de fluido levemente viscoso e com aspecto leitoso, rico em células tumorais maiores do que as da forma sólida, são pleomórficas e com nucléolos únicos ou múltiplos (SILVA et al., 2006; OZASLAN et al., 2011).

No tumor de Erlich ascítico, o óbito dos animais ocorre mais precocemente quando comparados com aqueles portadores da forma sólida. Hemorragia intraperitoneal, pressão mecânica causada pelo aumento do fluido ascítico e a liberação de substâncias tóxicas pelas células tumorais mortas são os principais fatores envolvidos na morte dos animais (OZASLAN ET AL., 2011).

Tabela 1: Fitoterápicos e tumor de Ehrlich

Gênero/Espécie	Tipo de concentrações	teste/ Resultados/ Conclusão	Veículo	Referência
<i>Curcuma zedoaria</i>	<i>In vivo.</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida,	Extrato metanólico	PROSANTO et al. , 2015.
<i>Curcuma amada e Curcuma zedoaria</i>	<i>In vivo</i>	atividade antineoplásica . <i>antioxidante</i>	Extrato de acetona de <i>C. Amada</i> . Extrato isopropilo de <i>Curcuma zedoaria</i>	KUMAR et. al., 2012.
<i>Terminalia arjuna</i>	<i>In vivo e in vitro.</i>	Redução do volume tumoral.	Ácido arjunólico da casca	NEHAL e ELSHERBINY, 2016.
<i>Mussaenda roxburghii</i>	<i>In vivo/ 20, 40 e 60 mg / kg / dia)</i>	Inibição do crescimento de células e aumento na sobrevida	Extrato metanolico	FARHADUL et. Al., 2015.
<i>Trichosanthes dioica</i>	<i>In vivo</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida,	Extrato hidroalcoólico da raiz	BHATTACHARYAet al., 2011.
<i>Argyrea nervosa</i>	<i>In vivo .</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida,	Extrato metanólico	SHARMA, 2015.
<i>Zizyphus spp.</i>	<i>In vivo</i>	Melhoranfo nível de corticosteroidee marcadores imunológicos	Extrato das folhas	HASSAN e ABDEL-GAWAD, 2010
<i>Anthocephalus cadamba</i>	<i>In vivo</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida,	Extrato metanólico	DOLAI, et. Al., 2012
<i>Caesalpinia bonducella</i>	<i>In vivo</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida,	Extrato das folhas	GUPTAet al., 2004
<i>Thevetia peruviana</i>	<i>In vivo</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida,	Extratos metanolico	HALDAR, et. Al., 2015
<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>In</i>	Redução na proliferação do tumor	Extrato etanólico	MIRANDA E FREITAS, 2008.
<i>Euphorbia tirucalli</i>	<i>In vivo</i>	Redução do tumor, aumento da sobrevida, eda	Extrato hidroalcoólico	DOS SANTOS, et. al. 2016 .

		celularidade da medula óssea.		
<i>Ageratum conyzoides L.</i>	<i>In vivo</i>	Doses de 50 mg/kg inibiram o crescimento tumoral	Frações clorofórmica e metanólica do extrato das folhas	MOMESSO et. al. , 2009.
<i>Alomia myriadenia</i>	<i>In vivo</i>	Os grupos não apresentaram redução significativa, desenvolveram degeneração hepática.	Produto isolado de <i>Alomia myriadenia</i> (miriadenolídeo)	VERÇOSA et al., 2006

2.3 Caracterização da planta *Morinda citrifolia*

Morinda citrifolia é uma planta de pequeno porte originária da Polinésia, que produz o fruto popularmente conhecido como noni. Sua classificação taxonômica é descrita da seguinte forma: Reino Plantae, Filo Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Rubiales, Família Rubiaceae, Gênero *Morinda*, Espécie *Morinda citrifolia* (INBiO, 1997). Das três, a variedade de maior importância econômica e medicinal é *Morinda citrifolia* var. *citrifolia* (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010).

A planta pode chegar de 9 a 10 metros de altura e cresce em temperatura e umidade adequadas. Produz flores e frutos durante todo o ano, suas folhas são largas, simples e opostas, com 7 a 25 cm de largura e 20 a 45 cm de comprimento, de coloração verde escura. O fruto é oval e atinge de 4 a 7 cm de tamanho e cerca de 100 a 300 gramas. Ela tem sido utilizada tanto na alimentação quanto no tratamento de doenças, tais como artrites, hipertensão arterial, úlceras gástricas, diabetes e câncer (WANG *et al.*, 2002). É considerada uma planta adaptogênica, com propriedades que exercem influência de homeostase no organismo.

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

As pesquisas sobre os componentes fitoquímicos de noni despertam interesse dos pesquisadores devido ao seu uso medicinal e como suplemento dietético botânico. Os principais compostos isolados de noni podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos identificados dos frutos, folhas e raízes de *M. citrifolia*

Parte da planta	Composto	Classificação química	Referência
Folha	Americanin A	Ligana	Kovendan <i>et al.</i> (2012) e Kovendana <i>et al.</i> (2014)
	Prolina Leucina Cisteína Metionina Glycine	Aminoácido	Shovic e Whistler (2001), Elkins (1998) e Sang <i>et al.</i> (2001)

	Histidina Isolucine Ácido glutâmico Fenilalanina Serina Treonina Triptofano Tirosina Arginina Valina		
	Quercetina glucopiranoside	3-O-β-D-	Flavonóides
	Quercetina Irhamnopiranosil-(1-6)-β- diglucopiranoside	3-O-a-	Chan-Blanco et al. (2006) e Sang et al. (2001)
	Ácido ursólico		Triterpenóides Elkins (1998), Sang et al. (2001) e Dittmar (1993)
	β-sitosterol		Esteróis Shovic e Whistler (2001) e Wang et al. (2002)
	Citrifolinoside B		Iridóides Sang et al. (2001)
	Kaempferolm Dglucopiranosil-(1-2)-a- Lrhamnopiranosil-(1-6)-βD- galactopiranoside	3-O-β-	Derivados de clorofila Sang et al. (2001)
	Escopoletina		Derivado de cumarina Kamiya et al. (2010) and Mohd Zin et al. (2007)
Fruto	Ácido octanóico (caprílico) Ácido hexanóico Ácido capróico		Ácido graxo Elkins (1998), Dittmar (1993), Wang et al. (1999, 2002), Mohd Zin et al. (2007), Jayaraman et al. (2008), Liu et al. (2001) e Zhang et al. (2014)
	Vitamina C Vitamina E Niancina		Vitaminas Zin et al. (2002) e West et al. (2011)
	Manganês, Selênio		Elementos químicos Zin et al. (2002) e West et al. (2011)
	Ácido Asperuloside		Iridóide West et al. (2012)
	Quercetina		Flavonóides Elkins (1998), Sang et al. (2001), Liu et al. (2001), Morton (1992), Yu (2004) e Deng et al. (2007b)

	2,6-di-O-(β-Dglucopiranosil-1-O-octanoil-β-D glucopiranosose	Éster de ácidos graxos	Nelson (2006), Kamiya et al. (2010), Jayaraman et al. (2008) e Lin et al. (2013)
	6-O-(β-D-glucopiranosil-1-O-octanil-β-D glucopiranosose		Liu et al. (2001), Wang et al. (1999), Zhang et al. (2014) and Akihisa et al. (2012)
	Damnacanthal	Antraquinonas	Chan-Blanco et al. (2006) e Kamata et al. (2006)
	Americanin A	Ligana	
Raiz	8-hidroxi-8-metoxi-2-metil-antraquinona, rubiadina	Antraquinonas	Su et al. (2005), Elkins (1998), Morton (1992) e Inoue et al. (1981)
	1,3-di-hidroxi-6-metil antraquinona		Elkins (1998) e Solomon (1999)
	Morenone 1		
	Morenone 2		
	Asperuloside	Iridóide	Bushnell et al. (1950)
	Quercetina	Flavonóides	Mohd Zin et al. (2007) e Mandukhail et al. (2010)
	Escopoletina	Derivado de cumarina	Sang et al. (2001) e Jensen et al. (2005)
	Damnacanthal	Antraquinonas	Nualsanit et al. (2012)

Adaptado de Assi et al. (2015) e Oliveira et al. (2016)

2.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL

O efeito antiproliferativo do noni já foi descrito em várias linhagens celulares, como em células de rim de hamster (BHK), células Vero, Hep2, MCF7, neuroblastoma e células de melanoma B16-F10 (LAN5) (CANDIDA et al., 2014).

O suco de noni reduziu a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um biomarcador de adenocarcinoma de pulmão (LIM et al., 2016), além de ter ação no carcinoma pulmonar de Lewis em camundongos singênico (HIRAZUMI et al., 1994). Na composição química do suco encontra-se uma substância rica em polissacarídeos, o noni-ppt, que possui atividade

antitumoral frente à carcinomatose peritoneal pulmonar de Lewis (LLC). A administração terapêutica do noni-ppt aumentou significativamente a sobrevivência de camundongos portadores deste tumor (HIRAZUMI & FURUSAWA, 1999).

O suco do fruto de *M. citrifolia* isoladamente ou associado ao quimioterápico doxorrubicina apresentou potencial citotóxico em carcinoma mamário de camundongos BALB/c. De acordo com os autores essa atividade antineoplásica foi induzida via ativação da caspase-3 (TASKIN et al., 2009).

Estudos recentes demonstraram a atividade antioxidante da polpa, da casca e de sementes do noni (COSTA et al., 2013), tendo em vista que o excesso de radicais livres no organismo está relacionado com uma série de doenças crônicas não transmissíveis, como aterosclerose, infarto do miocárdio, artrite reumatoide, catarata, mal de Parkinson, envelhecimento precoce, câncer, dentre outras. (MANACH E DONOVAN, 2004.)

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antitumoral de *Morinda citrifolia* in vivo.

3.2 Objetivo específico

- Analisar os componentes químicos do fruto de *M. citrifolia*;
- Avaliar ponderalmente os camundongos inoculados com tumor ascítico de ehrlich e com tumor sólido de ehrlich;

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de *Morinda citrifolia*

A planta foi coletada na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no Campus de São Luís – MA. Foram coletados galhos da planta com folhas, flores e frutos de aproximadamente 30 cm de comprimento. O material coletado foi levado para o Herbário da UEMA, onde foi feita a identificação botânica, sendo a exsicata depositada sob o número 2346.

4.2 Preparação da droga vegetal de *Morinda citrifolia*

Os frutos coletados foram lavados e cortados, posteriormente colocados em estufa de secagem por 72h. Após a secagem, a matéria seca foi moída em moinho a facas, guardada em frascos âmbar até a diluição em solvente. O extrato foi obtido na proporção de 1:2:2, noni, água e álcool respectivamente, diluído em solução PBS e colocado por 72h e posteriormente levado a um rotoevaporador até sua secagem.

4.3 ESPECTOFOTÓMETRO DE MASSA

Para a análise dos componentes do fruto de *M. citrifolia*, utilizou-se 1g do extrato metanólico e diluiu-se em 5 ml de metanol e posteriormente foi separada por cromatografia em coluna utilizando gel de Sephadex LH20 como fase estacionária e o metanol como fase móvel. As frações foram utilizadas para obter o espectro de massa e foram injetados por inserção directa no espectrómetro de massa . O tempo de aquisição total para cada espectro foi de 1 min.

Os espectros foram extraídos pela polaridade de íons negativos com equipamentos Q -TOF Bruker Compass. Os parâmetros de aquisição foram : Varredura inicial a 50 m / z ; varredura final 1500 m / z ; conjunto capilar 4500 V; set placa de deslocamento final -500 V; definição da tensão de carga 2000 V ; definição do nebulizador 0,4 bar; temperatura da estufa de secagem a 200 ° C ; definição do gás a seco 4.0 L / min.

4.4 ENSAIO TUMOR DE EHRLICH

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos fêmea Swiss com idade aproximada de 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Maranhão. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, forradas com xilana estéril e tampadas com grades inoxidável, em sala climatizada com temperatura constante de 20°C, com ciclos de claro-escuro de 12 h. Ração e água estéreis foram fornecidas aos animais *ad libitum*. O ensaio com o tumor ascítico de Ehrlich teve a duração de 10 dias de tratamento e do tumor sólido de Ehrlich 14 dias de tratamento. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com os protocolos Comitê de Ética e Experimentação Animal 09/2015.

4.5 Indução do tumor na forma ascítica e sólida

A linhagem tumoral de Ehrlich é mantida no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, através de sucessivas passagens intraperitoneais entre animais. O Tumor de Ehrlich foi inoculado em camundongos intraperitonealmente (ip) com 0,2 ml de uma suspensão de células tumorais contendo 5×10^6 células/mL, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores. Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos doadores, o número e a viabilidade das células foram determinados pelo método de exclusão do corante Trypan-blue 0,2%, em câmara hemocitométrica, considerando adequado em 99% de viabilidade. Após a determinação da viabilidade, procedeu-se a inoculação. Para o ascítico, foi por via intraperitoneal, e o sólido pela via subcutânea no coxim plantar direito.

4.6 Ensaio terapêutico

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=10), a saber:

- 1) animais controle positivo, portadores de TAE, administração de solução salina (PBS);
- 2) animais portadores de TAE, tratados com droga vegetal a base de *Morinda citrifolia* 125 mg/Kg;

- 3) animais portadores de TAE, tratados com droga vegetal a base de *Morinda citrifolia* 250 mg/Kg;
- 4) animais portadores de TAE, tratados com droga vegetal a base de *Morinda citrifolia* 500 mg/Kg.
- 5) Animais sem tumor e sem tratamento.

4.7 AVALIAÇÃO PONDERAL DOS CAMUNDONGOS INOCULADOS COM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH E COM TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

Os animais inoculados com Tumor de Ehrlich foram pesados em balança semi-analítica de dois em dois dias até o dia da necropsia para fazer o acompanhamento da quantidade de líquido ascítico produzido ao longo do tratamento.

4.8 NECROPSIA DOS ANIMAIS COM TUMOR DE EHRLICH ASCÍTICO, COLETA DE SANGUE E ANÁLISE DOS INDICES ASCÍTICO, ESPLÊNICO E HEPÁTICO.

Após 7 dias de tratamento, os animais de cada grupo foram eutanasiados por indução anestésica profunda usando xilasina e ketamina. Após a eutanásia o líquido ascítico foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e classificado como: seroso, sero-hemorrágico e hemorrágico. O baço e fígado foram pesados, posteriormente calculado o índice esplênico e hepático.

4.9 VOLUME TUMORAL

Os tumores foram medidos manualmente (os dois diâmetros, maior e menor) utilizando-se um paquímetro. A realização do cálculo do volume tumoral foi de acordo com a seguinte fórmula:

$$VT = D \times d^2 / 2$$

Onde:

(VT) Volume Tumoral

(D) Diâmetro maior

(d) Diâmetro menor

Fonte: RAMALHO (2014) e GOMES-NETO (2008)

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados empregando-se o software GraphPad Prism 5. Para dados apresentando uma distribuição paramétrica foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey na avaliação ponderal. Para dados com distribuição não paramétrica foi realizado o teste Kruskal-Wallis. Em todas as análises, as diferenças consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey foi utilizado para detectar diferenças existentes entre todos os grupos. De comparação múltipla de Dunn. Consideramos estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

5.0 RESULTADOS

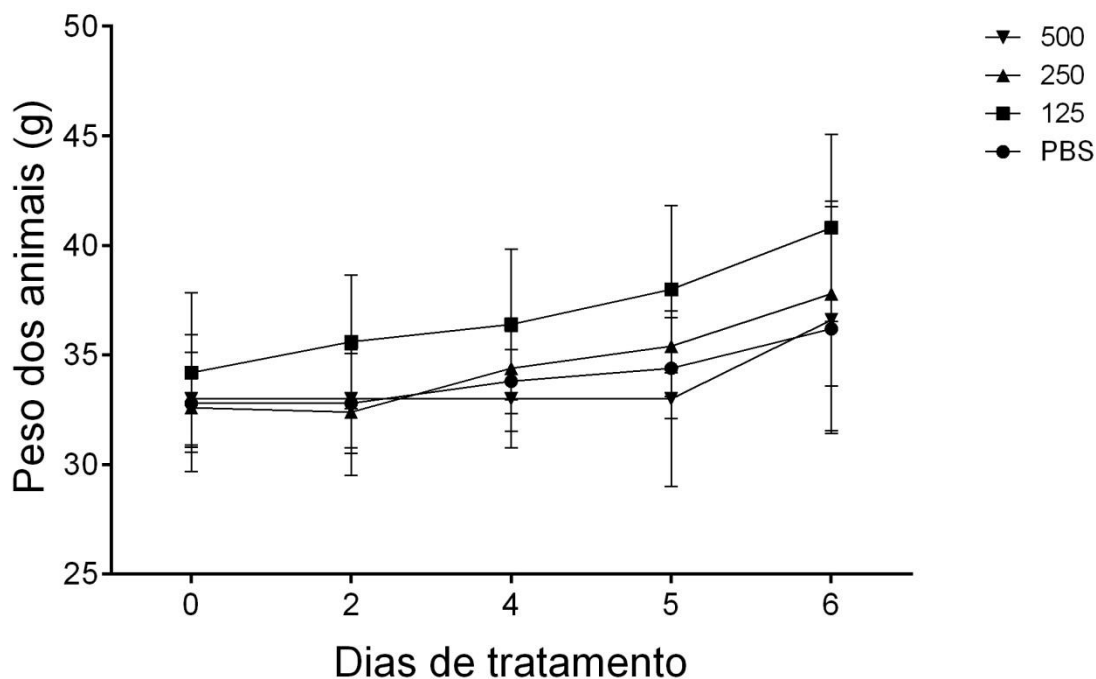
5.1 Caracterização química do extrato

Nas nove frações obtidas do extrato metanólico de *M. citrifolia* foram identificados íons moleculares correspondentes a escopoletina, danacantal, ácido ursólico, noniosídeo C, ácido asperulosídico e ácido deacetil asperulosídico.

5.2 Tumor de Ehrlich Ascítico

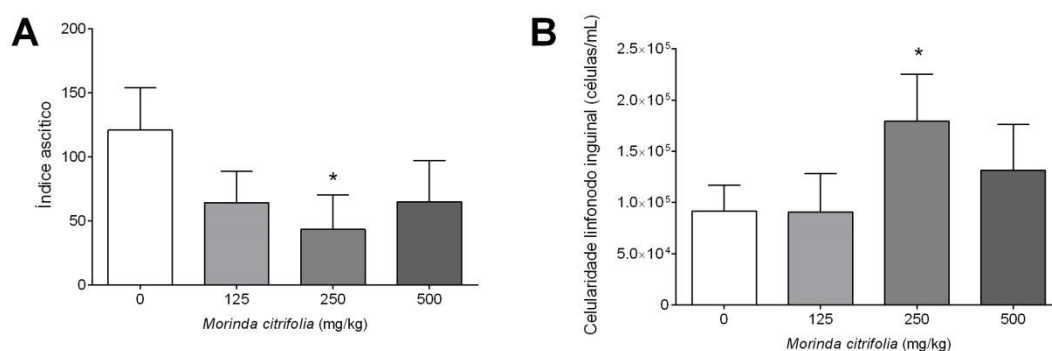
A Figura 1 mostra que não houve diferença estatística em relação ao peso dos animais tratados com a droga vegetal de *M. citrifolia* nas concentrações de 125, 250, 500 mg/kg e o grupo controle.

Figura 1: Avaliação ponderal dos camundongos do grupo controle e tratados com a droga vegetal de *M. citrifolia* nas concentrações de 125, 250, 500 mgP* P <0,05. em comparação com o grupo não tratado pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.



A avaliação do índice ascítico revelou que este foi menor no grupo de 250mg tratado com a droga vegetal de *M. citrifolia* quando comparado ao grupo controle (Figura 2A e 2B). Todavia, não foi observada diferença quanto ao índice esplênico, celularidade do baço, circunferência abdominal, celularidade da medula, índice hepático e a celularidade do linfonodo entre os grupos estudados.

Figura 2: Índice ascítico (A) e celularidade do linfonodo inguinal (B) do grupo controle e tratado com droga vegetal de *M. citrifolia* nas concentrações de 125, 250 e 500mg. * P <0,05. em comparação com o grupo não tratado pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.



Quanto ao aspecto do líquido ascítico foi observado que animais de cinco grupos apresentaram do tipo seroso (não hemorrágico), conforme demonstrado na Tabela).

Tabela 3. Classificação do líquido ascítico de acordo com os grupos controle e tratados com a droga vegetal de *M.citrifolia*

Grupos tratados com droga vegetal de <i>M.citrifolia</i>	Seroso	Seri-sanguinolento	Hemorrágico
0	80%	20%	0
125	100%	0	0
250	60%	0	40%
500	100%	0	0

5. DISCUSSÃO

Um dos componentes isolados do extrato metanólico da *M. citrifolia* foi o danacantal, que tem ação antioxidante, anti-inflamatória e estimulador da apoptose comprovado (SUKAMPORN et al, 2016; GUNAY et al, 2016). Provavelmente a redução do índice ascítico no grupo dos animais tratados com concentração de 250mg/kg ser devido a presença desse composto na droga vegetal. O uso do danacantal em célula MCF-7 aumentou a expressão de p21, p53 e caspase-7, levando a ativação da apoptose (GARCÍA-VILAS, et. al. 2015; AZIZ et al, 2014).

A indução da apoptose pelo danacantal também foi comprovada em linhagens celulares de HL-60, MOLT-4 e HELA (GUPTA et al., 2013). A ativação da morte celular por este composto em linhagens de células MCF-7 ocorre pela via intrínseca levando a transcrição p53 e do gene BAX (AZIZ et al, 2014). Estudos anteriores com o noni e tumor ascítico de Ehrlich demonstrou que o volume do tumor do grupo tratado foi 40-50% menor, em comparação ao grupo de controle (TASKIN et al, 2009) .

Um dos achados mais importantes foi a ausência de efeitos adversos da droga vegetal. De acordo com ISSEL et al (2009) o uso diário de 4 cápsulas de 500mg do fruto do noni em ensaios clínicos de fase I, apesar de não reduzir o tamanho do tumor, reduziu as queixas de fadiga e dor intensa em 29 pacientes com câncer em estado avançado

No nosso estudo observamos que o tratamento à base da droga vegetal de *M. citrifolia* no tumor sólido de Ehrlich também não reduziu a massa tumoral, mas, os animais não manifestaram efeitos colaterais, como por exemplo, piloereção, caquexia, hipotermia e apatia como os animais tratados com ciclofosfamida. Apesar dos avanços na área da quimioterapia antineoplásica, as drogas disponíveis são conhecidas por produzirem efeitos colaterais que causam desconforto físico e emocional (Silva et al., 2010), o que leva muitos

familiares e o paciente a ponderar se devem ou não se submeter ao tratamento. Por isso, a droga vegetal oriunda do noni, ou mesmo um composto isolado da planta, pode ser uma aliada no tratamento antineoplásico para minimizar os efeitos adversos e, conseqüentemente melhorar a qualidade de vida do indivíduo.

Há vários relatos de que a quimioterapia prejudica a função cognitiva dos pacientes com câncer de mama (LIM et al, 2016). Nesse sentido, há estudos que comprovam que o suco do noni possui ação protetora no cérebro de camundongos submetidos a estresse, o que repercutiu na melhora da função cognitiva (MUTO et al., 2010). Assim, ainda que a droga vegetal não exerça ação direta antineoplásica, ela pode ser usado como um adjuvante, não apenas para minimizar os efeitos colaterais dos quimioterápicos mas, também como estimulador da função cognitiva

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos experimentos realizados podemos concluir neste trabalho que o tratamento terapêutico de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Ehrlich com as doses de 125, 250 e 500mg/Kg/dia da droga vegetal da *M.citrifolia*:

Embora a droga vegetal do noni não tenha tido o efeito antitumoral esperado, a sua administração não leva a efeitos colaterais, o que pode estimular estudos que avaliem seu efeito como suplemento alimentar ou como adjuvante em associação a outras drogas antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

ANVISA. RDC nº 48/04, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília: Diário Oficial da União, **2004**.

ARPOMSUWANL, T.; PUNJANONZ, T. Tumor cell-selective antiproliferative effect of the extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Phytother Res**, v. 20, n. 6, p. 515-517, 2006.

AZIZ, A., YUSRAN, M., OMAR, A. R., SUBRAMANI, T., YEAP, S. K., HO, W. Y., ALITHEEN, N. B.. Damnacanthal is a potent inducer of apoptosis with anticancer activity by stimulating p53 and p21 genes in MCF-7 breast cancer cells. **Oncology letters**, v. 7, n. 5, p. 1479-1484, 2014.

BASAR, S., UHLENHUT, K., HÖGGER, P., SCHÖNE, F., WESTENDORF, J.. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni) fruit. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.

BHATTACHARYA, S.; BISWAS, M.; P. K. The triterpenoid fraction from *Trichosanthes dioica* root exhibits in vitro antileishmanial effect against *Leishmania donovani* promastigotes. **Pharmacognosy research**, v. 5, n. 2, p. 109, 2013.

BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P. K. The triterpenoid fraction from *Trichosanthes dioica* root exhibits antiproliferative activity against Ehrlich ascites carcinoma in albino mice: Involvement of possible antioxidant role. **Journal of experimental therapeutics & oncology**, v. 9, n. 4, 2012.

BHATTACHARYA, S.; PRASANNA, A.; MAJUMDAR, P.; HALDAR, P. K. . Antitumor efficacy and amelioration of oxidative stress by *Trichosanthes dioica* root against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 9, p. 927-935, 2011.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A., DAVID, J. M.. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. 2010.

BRASIL. Resolução RDC no 47, de 16 de março de 2006. Aprova o Regulamento Técnico Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial Idal República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 de março de 2006.

BROWN, AMY C. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit: a review. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 10, p. 1427-1440, 2012.

CANDIDA, T., FRANÇA, J. P. D., CHAVES, A. L. F., LOPES, F. A. R., GAIBA, S., SACRAMENTO, C. K. D., FRANÇA, L. P. D.. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, p. 10-14, 2014.

COSTA, ADRIANA BARBOSA, et al. "Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*Morinda citrifolia* Linn)." **Revista Brasileira de Fruticultura** 35.2 (2013): 345-354.

DA SILVA MOMESSO, L.; DE MOURA, R. M. X.; JARDIM, Dulce Helena. Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 660-663, 2009.

DOBSON, J. M., LASCELLES, B. D. X. BSAVA manual of canine and feline oncology. **British Small Animal Veterinary Association**, 2011.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. S., KAR, B., BALA, A., HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 865-870, 2012.

EHRlich, P. **Collected studies on immunity**. Wiley, 1906.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mäusetumoren. L. Schumacher, 1905.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. Fischer, 1906.

ELSHerbiny, N. M.; AL-GAYYAR, M. MH. Anti-tumor activity of arjunolic acid against Ehrlich Ascites Carcinoma cells in vivo and in vitro through blocking TGF- β type 1 receptor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 28-34, 2016.

GARCIA, A., MESQUITA, J., NÓBREGA, C., VALA, H. Cuidados paliativos em oncologia veterinária. **Millenium**, 2009.

GARCIA-VILAS, J. A., MEDINA, M. A., MELO, F. R., PEJLER, G., & GARCIA-FAROLDI, G.. Damnacanthal inhibits IgE receptor-mediated activation of mast cells. **Molecular immunology**, v. 65, n. 1, p. 86-93, 2015.

GOMES NETO, A., SIMÃO, A. F. L., MIRANDA, S. D. P., MOURÃO, L. T. C., BEZERRA, N. P., ALMEIDA, P. R. C. D., RIBEIRO, R. D. A. Experimental rat lung tumor model with intrabronchial tumor cell implantation. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 84-92, 2008.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de Tumor de Ehrlich**. 1983. 87f. 1983. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

GUILARDUCCI, N. V., ARAÚJO, S. G., PEREIRA, A. F., RIBEIRO, R. I. M. A., DOS SANTOS LIMA, L. A. R., PINTO, F. C. H.. Efeito da administração oral de

extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.(alecrim) no desenvolvimento do Tumor Sólido de Ehrlich. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 23-32, 2016.

GÜNAY, ERSIN et al. Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on Benzo (a) pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 744-751, 2016.

GUPTA, M., MAZUMDER, U. K., KUMAR, R. S., SIVAKUMAR, T., e VAMSI, M. L. M.. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of pharmacological sciences**, v. 94, n. 2, p. 177-184, 2004.

HALDAR, S., KARMAKAR, I., CHAKRABORTY, M., AHMAD, D., HALDAR, P.. Antitumor Potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's Ascites Carcinoma-Bearing Mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 34, n. 2, 2015.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 858-880, 2004.

HASSAN, I. A.; ABDEL-GAWAD, I. E. Effect of Zizyphus leaves extract on mice suffering from ehrlich ascites carcinoma. **Natural and Science**, v. 8, n. 11, p. 234-244, 2010.

HIRAZUMI A. & FURUSAWA E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity. **Phytotherapy Research**. 13(5): 380-387. 1999.

HIRAZUMI A., et al. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted lewis lung carcinoma in syngeneic mice. **Proceedings of the western pharmacologic society**. 37:145-146. 1994.

INBIO. INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDADE. COSTA RICA 1997. CONSULTADO EM 22 DE SETEMBRO DE 2014. DISPONÍVEL EM: <http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0142/f01359/g008903/s028172.htm>.

ISLAM. F.; RAIHAN, O.; CHOWDHURY, D.; KHATUN, M.; ZUBERI, N.; KHATUN, L.; BRISHTI, A.; BAHAR E. Apoptotic and antioxidant activities of methanol extract of *Mussaenda roxburghii* leaves. **Pak. J. Pharm. Sci**, v. 28, n. 6, p. 2027-2034, 2015

JONES, D., GARSKY, V. M., WONG, B. K., FENG, D. M., BOLYAR, T., HASKELL, K., WAI, J.. A peptide-doxorubicin'prodrug'activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1248-1252, 2000.

JÚNIOR, S., FIALHO, E. M. S., SANTOS, R. H. P., SANTOS, R. A. P., PORTELA, I. C., & SERRA, B. Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucallina* inibição do tumor ascítico de ehrlich. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 43, n. 1, p. 018-021, 2016.

KHARIS, Z.; AZIMAHTOL HAWARIAH, L. P. Pengaruh apoptosis di dalam kanser paru-paru NCI-H23 oleh fraksi kloroform buah *Morinda citrifolia*. **Prosiding kolokium siswazah keempat**, p. 5-8, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins basic pathology. **Elsevier Health Sciences**, 2012.

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

LAVAUT G., N. E.; LAVAUT G., J. A. *Morinda citrifolia* Linn: potencialidades para su utilización en la salud humana. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 37, n. 3, p. 1-1, 2003.

LIM, I., JOUNG, H. Y., YU, A. R., SHIM, I., KIM, J. S. PET Evidence of the Effect of Donepezil on Cognitive Performance in an Animal Model of Chemobrain. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

MANACH, C.; DONOVAN, J. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, Sidney, v.38, n.8, p.771- 785, 2004.

MACHADO, H. Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Ehrlich in vivo. 2006.

MAYER, I. A., ABRAMSON, V. G., LEHMANN, B. D., PIETENPOL, J. A. New strategies for triple-negative breast cancer—deciphering the heterogeneity. **Clinical cancer research**, v. 20, n. 4, p. 782-790, 2014.

MIRANDA, R. R.; FREITAS, J. J. S. The anti-proliferative effects of the ethanolic extract of *Uncaria tomentosa* in Ehrlich ascitic carcinoma. **Rev. para. med**, v. 22, n. 2, p. 17-22, 2008.

MOMESSO, L. S.; MOURA, Rute Mendonça Xavier de; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Antitumoral activity of the *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 660-663, 2009.

MONTAZERI, A., VAHDANINIA, M., HARIRCHI, I., EBRAHIMI, M., KHALEGHI, F., JARVANDI, S. Quality of life in patients with breast cancer before and after diagnosis: an eighteen months follow-up study. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.

MUTHUKUMAR, T., CHRISTYN, A., MANGADU, A., MALAISAMY, M., SIVARAJ, C., & BALASUBRAMANIAN, K. Anticancer and antioxidant activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma amada rhizome* extracts. **J. Acad. Indus. Res**, v. 1, n. 2, p. 91-6, 2012.

NASCIMENTO, F. R., CRUZ, G. V., PEREIRA, P. V. S., MACIEL, M. C., SILVA, L. A., AZEVEDO, A. P. S., GUERRA, R. N.. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p. 2650-2653, 2006.

NERY, L. H. R.. Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c. 2004.

OZASLAN, M., KARAGOZ, I. D., KILIC, I. H., & GULDUR, M. E.. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PAL, P., PRASAD, A. K., CHAKRABORTY, M., HALDAR, S., MAJUMDER, P., e HALDAR, P. K. Evaluation of anti-cancer potential of methanol extract of *Curcuma zedoaria*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 5, p. 271-275, 2015.

PORTUGAL, L. M. **Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. 2012. Tese de Doutorado.

PORTUGAL, L. M. **Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. 2012. Tese de Doutorado.

QUILLES, M. B. Atividade anti-tumoral e imunomodulatória de complexos de paládio (II) utilizando modelo experimental de Ehrlich. 2010.

RAZAFIMANDIMBISON SG, McDOWELL TD, HALFORD DA, BREMER B. Molecular phylogenetics and generic assessment in the tribe morindeae (Rubiaceae-Rubioideae): how to circumscribe Morinda L. to be monophyletic? *Molecular phylogenetics and evolution*. 2010; 52: 879-886.

SAGNIK H., INDRAJIT K., MAINAK C., DILSHAD A., & PALLAB K.I HALDAR.A. Potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's Ascites Carcinoma-Bearing Mice.**Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, 34(2):105–113 (2015).

SANTOS, D. B. A.; LATTARO, R. C. C.; DE ALMEIDA, D. A. Cuidados paliativos de enfermagem ao paciente oncológico terminal: revisão da literatura. **Revista de Iniciação Científica da Libertas**, v. 1, n. 1, 2016.

SILVA, C. B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de vida em pacientes portadoras de neoplasia mamária submetidas a tratamentos quimioterápicos. **Rev bras cancerol**, v. 56, n. 2, p. 227-36, 2010.

SHARMA, B.; DHAMIJA, I.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antitumor activity of methanolic extract of *Argyreia nervosa* leaves on Ehrlich ascites carcinoma. **Bangladesh J Pharmacol**. v. 10, n.2, p. 399-408, 2015.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SUKAMPORN, P., ROJANAPANTHU, P., SILVA, G., ZHANG, X., GRITSANAPAN, W., & BAEK, S. J. Damnacanthal and its nanoformulation exhibit anti-cancer activity via cyclin D1 down-regulation. **Life sciences**, v. 152, p. 60-66, 2016.

TAŞKIN, E. İ., AKGÜN-DAR, K., KAPUCU, A., OSANÇ, E., DOĞRUMAN, H., ERALTAN, H., ULUKAYA, E.. Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. **Cell biochemistry and function**, v. 27, n. 8, p. 542-546, 2009.

TAŞKIN, E. İ., AKGÜN-DAR, K., KAPUCU, A., OSANÇ, E., DOĞRUMAN, H., ERALTAN, H., ULUKAYA, E.. Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. **Cell biochemistry and function**, v. 27, n. 8, p. 542-546, 2009.

VERÇOSA JÚNIOR, D. et al. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia*(Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.5, p.788-798, 2006.

VERÇOSA JÚNIOR, D., FAGUNDES, E. M. D. S., CASSALI, G. D., RIBEIRO, E. L., ZANI, C. L., MELO, M. M. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. 2006.

VERLENGIA, R. Estudo do perfil de eletroforese e imuno eletroforese em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. 1994.

WANG, X. W., HUSSAIN, S. P., HUO, T. I., WU, C. G., FORGUES, M., HOFSETH, L. J., HARRIS, C. C.. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Toxicology**, v. 181, p. 43-47, 2002.

WILLBANKS, AMBER ET al. The Evolution of Epigenetics: From Prokaryotes to Humans and Its Biological Consequences. **Genetics & Epigenetics**, v. 8, p. 25, 2016.

WITHROW, S. J.; PAGE, R.; VAIL, D. M. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. **Elsevier Health Sciences**, 2013.

