

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EXTRATO *Morinda citrifolia* L  
POR MEIO DO TESTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO  
SOMÁTICA EM *Drosophila melanogaster***

ASSESSMENT OF MUTAGENIC POTENTIAL OF *Morinda citrifolia* EXTRACT BY  
MUTATION AND RECOMBINATION TEST IN SOMATIC CELS OF *Drosophila  
melanogaster*

Jéssica Soares Vieira<sup>1</sup>  
Cássio Resende de Moraes<sup>2</sup>

**RESUMO:** *Morinda citrifolia* L conhecida popularmente como noni, é uma pequena árvore da família das Rubiaceae, nativa do sudeste da Ásia à Austrália. Diversos trabalhos têm comprovado ação benéfica conferida pelo noni, tais como atividade antioxidante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória e vasodilatação. No Brasil, a utilização do noni para fins fitoterapêuticos não é permitida, devido sobretudo a carência de dados toxicológicos sobre o fruto. Nesta perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade, bem como o potencial mutagênico do extrato aquoso do noni, por meio do SMART em *Drosophila melanogaster*. Larvas de terceiro estágio resultantes do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB) foram tratadas com diferentes concentrações de noni (100; 50; 25; 12,5 e 6,25%). A toxicidade foi mensurada mediante moscas que sobreviveram a exposição em um tempo de 48 h. No SMART, larvas de terceiro estágio foram submetidas ao tratamento crônico (48 h) a diferentes concentrações subletais do noni (50; 25; 12,5 e 6,25%). Os resultados revelaram efeito tóxico do noni na concentração de 100%, tanto no cruzamento ST quanto HB. Não foi evidenciado efeito mutagênico em nenhuma das concentrações subletais testadas neste trabalho.

**Palavras-chave:** Mutagenicidade; SMART; Noni

**ABSTRACT:** *Morinda citrifolia* L popularly known as noni, is a small tree of the Rubiaceae family, native from Southeast Asia to Australia. Several works have proven beneficial action conferred by noni, such as antioxidant, antibacterial, antitumor, anti-inflammatory and vasodilatation activity. In Brazil, the use of noni for phytotherapeutic purposes is not allowed,

- 
1. Licenciada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP.
  2. Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP. Especialista e Biotecnologia Ambiental pelo Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Especialista em Toxicologia e Bioquímica pela Faculdade Metropolitana do Estado de São Paulo – FAMEESP. Especialista em Biologia Celular e Molecular pelo Centro Universitário FAVENI - UNIFAVENI. Mestre e Doutor em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Docente e Pesquisador pelo UNIFUCAMP. [cassio.1015@hotmail.com](mailto:cassio.1015@hotmail.com))

mainly due to the lack of toxicological data on the fruit. In this perspective, the present work aims to evaluate the toxicity as well as the mutagenic potential of the noni aqueous extract, through SMART in *Drosophila melanogaster*. Third-stage larvae resulting from standard cross (ST) and high metabolic bioactivation cross (HB) were treated with different concentrations of noni (100; 50; 25; 12.5 and 6.25%). Toxicity was measured by flies that survived exposure in a time of 48 h. In SMART, third stage larvae were submitted to chronic treatment (48 h) at different sublethal concentrations of noni (50; 25, 12.5 and 6.25%). The results showed a toxic effect of noni at 100% concentration in both ST and HB crosses. No mutagenic effect was evidenced in any of the sublethal concentrations tested in this work.

**Keywords:** Mutagenicity; SMART; Noni.

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que contenham em um ou mais de seus órgãos substâncias ou precursores que possam ser utilizadas com finalidade terapêutica (Kalluf, 2008). No Brasil a utilização de plantas e ervas de conhecimento popular na medicina alternativa, como meio terapêutico para tratar algumas doenças humanas, já vem sendo usado há muito tempo (Batista *et al.*, 2005; Fabricant & Farnsworth, 2001; Maciel *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2005). O conhecimento da população sobre determinadas plantas, principalmente ao que diz respeito às propriedades benéficas, as quais estas oferecem quando administradas em pacientes com alguma enfermidade, têm contribuído para o desenvolvimento da medicina alternativa, principalmente na sociedade de baixa renda (Maciel *et al.*, 2002).

A *Morinda citrifolia* L conhecida popularmente como noni, (Nelson; Elevitch, 2006; Correia, 2010), é uma pequena árvore da família das Rubiaceae, nativa do sudeste da Ásia à Austrália, sendo esta, cultivada na Polinésia, Índia, Caribe, América do Sul e Central (Wang *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2005; Chanblanco *et al.*, 2006; West *et al.*, 2006). No Brasil, *M. citrifolia* é considerada uma fruta exótica, fornece matéria-prima com forte apelo comercial devido à constituição química do seu extrato, apreciado para fins terapêuticos.

Nos últimos anos, ocorreu um grande interesse comercial em relação aos produtos derivados do noni (Silva; Medeiros; Leite, 2012). O interesse por seus possíveis efeitos benéficos é crescente (Barros, 2008). É provável que todas as partes do vegetal possam ser utilizadas (folhas, caule, raízes, frutos e sementes). De acordo com Müller (2007), o noni, confere diferentes atividades biológicas como: atividade antioxidante, antibacteriana e antitumoral. Frente às propriedades conferidas pelo noni, as que mais chamam atenção no

âmbito popular, está relacionada com as atividades anti-inflamatórias e vasodilatação e a propriedade anticancerígena, função conferida pela inibição da função pré-neoplásica e o crescimento de tumores malignos (Yang *et al.*, 2010; Pola *et al.*, 2011).

Definido como um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento incontrolado de células, o câncer é caracterizado pelo crescimento anormal, que resultam na ausência de reconhecimento celular, podendo ou não desencadear atividade de metástase (invadir outros tecidos) (INCA, 2014).

Em um estudo utilizando o extrato etanólico da fruta *M. citrifolia* no tratamento do melanoma, Cândida *et al.* (2014), ao tratar células em cultura durante oito dias, observou que o extrato etanólico da fruta foi capaz de reduzir a atividade celular e inibiu em 45% a taxa de proliferação de células de melanoma, indicando que o extrato etanólico dos frutos possui atividade antitumoral. Segundo Wang e Su (2001), a propriedade antitumoral da *M. citrifolia* está presente no estágio inicial da carcinogênese.

De acordo Alencar *et al.* (2013), em uma pesquisa sobre a genotoxicidade e nefrotoxicidade em ratos machos e fêmeas, foi possível evidenciar expressivos danos genotóxicos em células renais, constatando que o noni tem poder genotóxico de maneira dose-dependente, sugerindo grande risco para a saúde, quando extrapolado os resultados encontrados para humanos.

Segundo um informe técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o noni não possui histórico de consumo no Brasil, sendo proibido a comercialização e consumo da fruta e seus derivados até que sejam estabelecidos estudos que comprovem a segurança no uso do produto, conforme determinam a Resolução nº. 16/1999 e a Resolução 16 RDC nº. 278/2005.

Para esta análise o modelo biológico utilizado foi a *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830), conhecida popularmente como “mosca-da-fruta”, é um inseto da ordem Díptera, a qual possui uma grande importância para as pesquisas científicas. O Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART), usando como organismo-modelo à espécie *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que são analisados fenotipicamente nas asas da mosca. Este teste é um eficiente método para avaliar e quantificar o potencial mutagênico e recombinogênico causados por agentes físicos e químicos (Graf *et al.*, 1984).

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial mutagênico da *Morinda citrifolia* (noni) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Morinda citrifolia* L – noni

A *Morinda citrifolia* L (**Figura 1**) conhecida popularmente como noni, é uma pequena árvore da família das Rubiaceae (Nelson e Elevitch, 2006; Correia, 2010), nativa do sudeste da Ásia à Austrália, sendo esta, cultivada na Polinésia, Índia, Caribe, América do Sul e Central (Wang et al., 2002; Su et al., 2005; Chanblanco et al., 2006; West et al., 2006). A folhagem da planta é similar a alguns tipos de citros. Essa árvore frutífera possui a copa similar ao sistema radicular, a planta adulta atinge de 3 a 10 m de altura e permanece enfolhada o ano todo (Tombolato; Barbosa; Hiroce, 2005). O fruto do noni é de formato ovalado, suculento e apresenta várias sementes por fruto. A casca do fruto é muito fina, facilmente retirada, quando o fruto está maduro. Pode ser dividido em três estádios de maturação conforme a cor: verde (casca verde), de vez (casca verde amarelada) e maduro (casca amarela esbranquiçada). Considerando a polpa, ocorre mudança de coloração, passando da cor branca para a amarela, à medida que o fruto amadurece (Tombolato; Barbosa; Hiroce, 2005).



**Figura 1.** Fruto verde de *Morinda citrifolia* L – Noni.

Considerada uma fruta exótica, fornece matéria-prima com forte apelo comercial devido à constituição química do seu extrato, apreciado para fins terapêuticos. Um dos principais componentes encontrados na fruta é a Proxeronina, precursora do alcalóide xeronina que ativa as enzimas catalisadoras do metabolismo celular, (Tombolato; Barbosa; Hiroce, 2005).

Nos últimos anos, ocorreu um grande interesse comercial em relação aos produtos derivados de noni (Silva; Medeiros; Leite, 2012), o interesse é devido as propriedades fitoterapêuticas aliadas a capacidade de cura de diversas enfermidades, inclusive o câncer. Segundo Rodriguez (2004) existem mais de 120 problemas de saúde que podem ser tratados, e até mesmo curados com o noni e seus derivados.

Pesquisas realizadas ressaltam que o noni fortalece o Sistema Imunológico, estimulando a produção de linfócito T, atua produzindo macrófagos e/ou linfócitos que constituem um componente vital das defesas naturais do organismo, combate muitos tipos de bactérias e regula a função celular e reforça a regeneração das células danificadas (Solomon, 1999). Somado a estes eventos a xeronina, princípio ativo mais abundante no fruto, tem a capacidade de contribuir para corrigir disfunções cerebrais associadas a dor, agindo como um potente analgésico (Solomon, 1999).

Segundo um informe técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o noni não possui histórico de consumo no Brasil, sendo proibida a comercialização e consumo da fruta e seus derivados até que sejam estabelecidos estudos que comprovem a segurança no uso do produto, conforme determinam a Resolução nº. 16/1999 e a Resolução 16 RDC nº. 278/2005.

## **2.2 Câncer**

Definido como um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento incontrolado de células, o câncer é caracterizado pelo crescimento anormal, que resultam na ausência de reconhecimento celular, podendo ou não desencadear atividade de metástase (invadir outros tecidos) (INCA, 2014). Existem vários tipos de câncer sendo eles correspondentes a cada tipo de célula existente em nosso organismo, por exemplo, se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma.

As causas do câncer são inúmeras, podendo ser resultantes de alterações em genes selvagens e sua conversão em genes mutantes, por resultado da interação com fatores ambientais, como alimentação (produtos de natureza química e/ou biológica) ou exposição à mutágenos físicos (radiação UV e material radioativo) (Dantas et al., 2008). Além disso, alguns cânceres podem apresentar natureza hereditária ou origem por remodelagem da cromatina (fatores epigenéticos) (Moura, 2009).

O câncer em suma, pode surgir a partir de alterações que ocorrem no DNA, esse fator é conhecido como mutação genética e podem ocorrer em qualquer entidade do genoma, sendo mais preocupante em genes especiais como os proto-oncogenes ou genes supressores de tumor, ambos reguladores do ciclo celular. Os proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais, podem induzir tumor quando sofrem mutações. As mutações podem também afetar genes que participam da divisão celular, alguns destes genes são chamados de genes supressores de tumor (INCA, 2014). Mutações em genes supressores de tumor podem ativar os proto-oncogenes transformando-os em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais (INCA, 2014).

Segundo o Instituto Oncoguia (2015), as células cancerosas podem se multiplicar desordenadamente, se espalhando para os tecidos mais próximos. O acúmulo dessas células dá início a formação de tumores malignos. As mutações podem ser de dois tipos: herdadas ou adquiridas.

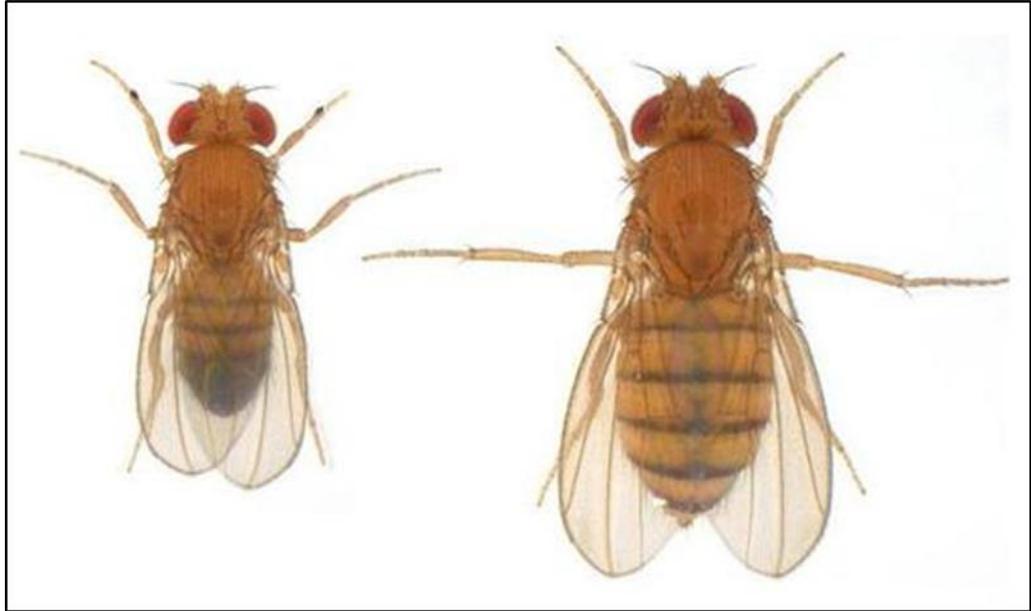
Mutações herdadas ocorrem após o ovócito II ser fecundado, sendo que esta mutação quando não reparada, perpetua no zigoto e demais etapas do desenvolvimento embrionário, expressando a nível do fenótipo em indivíduos adultos em todas as células do organismo (Instituto Oncoguia, 2015).

Mutações adquiridas, atuam em células somáticas, sendo esta transferida por sucessivas divisões mitóticas para uma determinada população de células. Ao contrário de mutações herdadas, as mutações adquiridas não vão afetar todas as células do organismo. As mutações também podem ocorrer por erros espontâneos durante a atuação do replissomo ou de maneira induzida, por diferentes xenobióticos ou agentes físicos. Seja de maneira espontânea ou por maneira induzida, quando uma célula sofre alguma alteração, ela recorre à maquinaria de reparo do organismo. Caso o reparo seja muito agressivo, a célula é marcada para morte celular. Caso a mutação escape do mecanismo de reparo, está poderá acumular na célula e desenvolver uma célula com atividade neoplásica (Instituto Oncoguia, 2015).

### **2.3 *Drosophila melanogaster***

A *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830), conhecida popularmente como “mosca-da-fruta”, é um inseto da ordem Diptera, a qual possui uma grande importância para as pesquisas científicas. Estas moscas na natureza apresentam olhos vermelhos, corpo cinzento e asas longas. Possui dimorfismo sexual (**Figura 2**), sendo que a fêmea é maior que o macho, apresenta um corpo mais corpulento, composto por “faixas pretas” em todo o seu abdômen; já o macho é menor, e no seu abdômen próximo ao cerco ele possui uma forte pigmentação

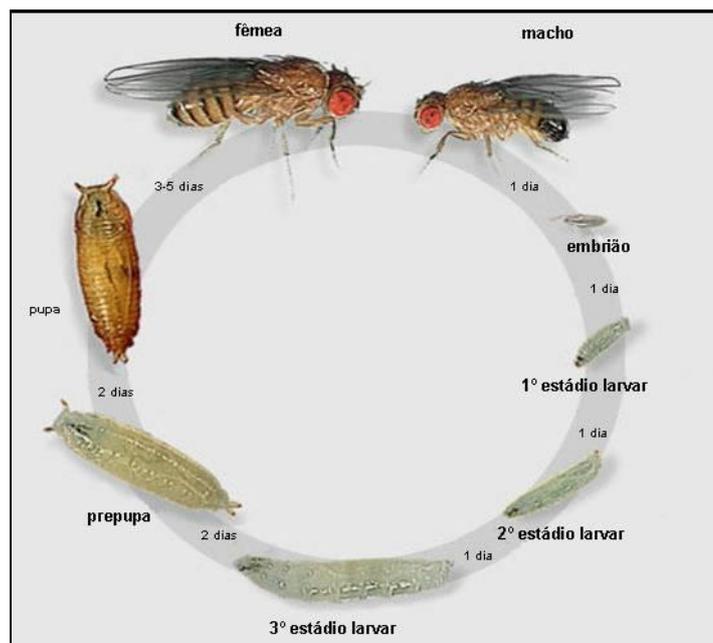
preta, somado a presença de apêndices sexuais no primeiro par de pernas (Protocolo - Utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte, 2001).



**Figura 2.** Dimorfismo sexual em um esquema comparativo entre o indivíduo do sexo masculino (esquerda), e um indivíduo do sexo feminino (direita).  
Fonte: <http://biologiafavaloro.blogspot.com.br/2012/07/laboratorio-de-genetica.html>. Acesso: 23 Abril 2017

No ciclo de vida da *Drosophila* (**Figura 3**), ela passa por uma fase de ovo, decorrendo a embriogênese em cerca de 24 horas eclode então uma 1ª forma larval, seguido mais um dia se transforma numa larva de 2º estágio. Decorrido mais um dia a larva muda novamente e transforma-se em larva de 3º estágio, que aumenta significativamente de tamanho ao longo de três dias. Após essas fases ela começa a ficar imóvel, segrega uma cutícula espessa e forma uma espécie de casulo denominada pupa. Durante a fase de pupa, que demora cerca de quatro dias, ocorre metamorfose, a qual envolve a degradação de praticamente todos os tecidos larvares e a proliferação significativa dos discos imaginiais. Estes são pequenos grupos de células, que irão originar as estruturas do adulto (também conhecido por imago). Da pupa eclode o indivíduo adulto, que atinge a maturidade sexual ao fim de 12 horas. Apenas ao fim de uma hora de eclosão da pupa é que as asas do adulto ficam completamente distendidas, os adultos eclodem pouco pigmentados, e só ao fim de algumas horas é que se torna óbvia a coloração acastanhada do corpo e o padrão de listas escuras dos segmentos abdominais. (Protocolo - Utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte, 2001).

*Drosophila melanogaster* é um organismo eucarionte que tem  $2n = 8$  cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual. Atualmente é o modelo biológico mais utilizado em pesquisas científicas, devido as vantagens existentes ao manusear esse organismo, pois é de fácil manutenção em laboratório, tem um ciclo reprodutivo curto, fornece um grande número de indivíduos por progênie e apresenta reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite um certo grau de extrapolação para humanos (Graf, 2006).



**Figura 3.** Estágios de desenvolvimento *Drosophila melanogaster*

Fonte: <http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.htm>. Acesso em: 23 abril 2017

#### 2.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART)

O *Somatic Mutation and Recombination Test* (SMART) - Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática usando como organismo-modelo a espécie *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que são analisados fenotipicamente nas asas da mosca. Este teste é um eficiente método para avaliar e quantificar o potencial mutagênico e recombinogênico causados por agentes físicos e químicos (Graf *et al.*, 1984). No SMART é possível quantificar eventos de natureza

clastogênica, aneugênica e pontual de mutágenos (Graf *et al.*, 1984) e pró-mutágenos (Graf e Van Shaik, 1992).

O teste SMART fundamenta-se em grupos de células, que proliferam separadamente durante o desenvolvimento até diferenciarem, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.). Uma vantagem desse método é possibilitar a exposição de uma grande população de células dividindo mitoticamente no disco imaginal da larva. Se uma alteração genética ocorre em uma célula do disco imaginal, esta será detectada em todas as células descendentes e formar um clone de células mutantes, que pode ser detectado como uma mancha na superfície do corpo da mosca.

Para a realização do teste são usadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: Linhagem *multiple wing hairs, flare* e ORR.

A linhagem *multiple wing hairs* apresenta o marcador *mwh* que por sua vez está localizado no cromossomo 3 (3-0,3) em homozigose recessiva. A expressão em homozigose recessiva do *mwh* resulta em fenótipo de manchas mutantes caracterizadas pela presença de pelos múltiplos (três ou mais pelos) por célula nas asas da mosca.

A linhagem *flare*, possui o marcador *flr<sup>3</sup>* localizado no cromossomo 3 que é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico TM3, *Bd<sup>s</sup>*, que se encontram em posição próxima do centrômero (*flr<sup>3</sup>*, 3-38,9) quando comparado ao marcador *mwh*. A expressão do marcador *flr<sup>3</sup>* resulta em fenótipo de pelos que se assemelham a uma chama de vela, ou espinho de roseira.

A expressão de *mwh* e *flr<sup>3</sup>* resulta em pelos mutantes que diferenciam do fenótipo selvagem. O pelo selvagem é distribuído de maneira simples, ou seja, um único pelo por célula na asa da mosca.

A linhagem ORR, possui o mesmo marcador da linhagem *flr<sup>3</sup>*, somado a presença de genes que codificam enzimas do complexo de citocromo P450 (CYP6A2), nos cromossomos 1 e 2.

No teste SMART são realizados dois cruzamentos 1- Cruzamento padrão (ST), entre fêmeas virgens da linhagem *flr<sup>3</sup>* com machos da linhagem *mwh*. 2- Cruzamentos de bioativação metabólica (HB), feito entre machos da linhagem *mwh* e fêmeas virgens da linhagem ORR (Graf e Van Schaik, 1992).

Ambos os cruzamentos, produzem dois tipos diferentes de progênie: Trans-heterozigoto marcado (*mwh<sup>+</sup>/+flr<sup>3</sup>*) (MH), que possui o fenótipo de borda da asa lisa, e heterozigoto balanceado (*mwh<sup>+</sup>/+TM3, Bd<sup>s</sup>*) (BH), caracterizado por apresentar fenótipo de

borda de asa serrilhada, devido a presença do balanceador cromossômico TM3, *Bd<sup>s</sup>* (Graf et al. 1984).

A progênie MH permite a identificação de eventos mutagênicos e recombinogênicos, enquanto a progênie BH permite a identificação apenas de eventos mutagênicos, visto que os eventos recombinogênicos são eliminados. A comparação dos resultados da progênie MH e BH permite quantificar no total das manchas a contribuição dos eventos mutagênicos e recombinogênicos (Graf et al. 1984).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Agentes químicos e Preparação do extrato**

Os frutos de *Morinda citrifolia* (noni), foram coletados em área de zona rural do município de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil (18°44' 03.46" S 47°35' 23.41" O). A fazenda está situada a 11 Km da zona urbana.

Para a preparação do extrato aquoso do noni foi usado todos os componentes do fruto (epicarpo, mesocarpo e endocarpo). O fruto foi macerado/triturado com auxílio de liquidificador (Mondial), e os componentes sólidos foram separados com auxílio de peneira. O suco extraído foi considerado como 100% de noni. Soluções de 50%, 25% e 12,5% de noni foram feitas ao acrescentar água obtida por sistema de osmose reverse (Quimis), na solução de 100%.

Etil carbamato – Uretano (CAS 51-79-6) foi obtido da empresa Fluka AG (Buchs, Switzerland). Nesse experimento, Uretano (URE) na concentração de 10 mM foi usado como controle positivo com descrito na literatura (Morais et al., 2016).

#### **3.2 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART)**

##### **3.2.1 Linhagens de *Drosophila* e cruzamento.**

Para avaliar o potencial mutagênico do extrato do Noni foi utilizado o Teste para detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, sendo considerado um teste de grande sensibilidade no rastreamento da genotoxicidade de potenciais xenobióticos, além de ser barato, relativamente rápido e fornece resultados confiáveis e reproduzíveis (Graf et al., 1984).

Nesse experimento foram usadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: Linhagem *multiple wing hairs*, *flare* e *ORR*, ambas gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. GETEC, v.25, agosto, p. 32 - 53/ 2025

Mário Antônio Spanó, do laboratório de mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Estas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo  $\frac{1}{4}$  meio de cultura de banana (1230 mL de água; 16,5 de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó).

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: 1- Cruzamento padrão (ST), entre fêmeas virgens da linhagem *flr<sup>3</sup>* com machos da linhagem *mwh*. 2- Cruzamentos de bioativação metabólica (HB), feito entre machos da linhagem *mwh* e fêmeas virgens da linhagem ORR (Graf e Van Schaik, 1992).

Ambos os cruzamentos, produzem dois tipos diferentes de progênie: Trans-heterozigoto marcado (*mwh<sup>+</sup>/<sup>+</sup>flr<sup>3</sup>*) (MH), que possui o fenótipo de borda da asa lisa, e heterozigoto balanceado (*mwh<sup>+</sup>/<sup>+</sup>TM3*) (BH), caracterizado por apresentar fenótipo de borda de asa serrilhada, devido a presença do balanceador cromossômico *TM3 Bd<sup>s</sup>* (Graf et al. 1984).

Os ovos descendentes dos cruzamentos ST e HB foram coletados no período de 8 horas, em frascos contendo meio de cultura à base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após  $72 \pm 4$  horas, larvas de terceiro estágio foram lavadas com água obtida por sistema de osmose reverse e coletadas com auxílio de peneira de malha fina e posteriormente submetido ao tratamento crônico por 48 horas.

### 3.2.2 Tratamento e Ensaio de sobrevivência

Para mensurar a toxicidade do noni, 20 larvas de 3º estágio foram submetidas a tratamento crônico por 48 horas. O tratamento foi realizado em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8,0 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batata (Yoki Alimentos S.A) hidratado em 5 mL de extrato aquoso do noni nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%.

Foi quantificado a quantidade de imagos que emergiram das pupas após o processo de metamorfose e os dados foram gerados em porcentagem de sobrevivência.

O tratamento do SMART foi feito nas mesmas concentrações e condições experimentais do ensaio de sobrevivência. No SMART foram analisadas apenas as concentrações subletais. Resultados referentes à taxa de sobrevivência estão apresentados na **Figura 1**.

O SMART foi acompanhado de controle negativo (água obtida por sistema de osmose reverse) e controle positivo (10 mM de URE).

### 3.2.3 Preparação das lâminas e análise microscópica

As moscas adultas descendentes dos cruzamentos ST e HB, após metamorfose foram fixadas em etanol 70%, e armazenadas até momento de montagem das lâminas. As asas foram removidas e montadas em lâminas e lamínulas para microscopia sob solução de *Faure* (30g goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 ml de água destilada) e analisadas em microscópio óptico (OPTON modelo TIM – 2005 –B) com ampliação de 400X.

### 3.2.3 Análise estatística

Foram analisadas 40 moscas por concentração (aproximadamente 48 000 células por mosca), acompanhado de controle negativo e positivo. As frequências de manchas *mwh*, *flr<sup>3</sup>* e gêmeas foram registradas em um diagrama padrão, expressando o tamanho das manchas, em classes.

O procedimento de decisão múltipla (Frei e Würgler, 1988) foi utilizado para analisar os dados, resultando em três diferentes diagnósticos: negativo, positivo ou inconclusivo. As frequências de cada tipo de mancha (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) e o total de manchas por mosca, de cada tratamento, foram comparadas aos pares (exemplo, controle negativo vs. tratamento Noni) de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970), com  $p = 0,05$  (Frei e Würgler, 1988).

Comparações estatísticas referentes às taxas de sobrevivência foram feitas por meio do teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado o efeito do extrato aquoso de *Morinda citrifolia* (noni) sobre a sobrevivência e a integridade do material genético de *Drosophila melanogaster*.

Como apresentado na **Figura 1** a taxa de sobrevivência de moscas tratadas com o extrato aquoso 100% concentrado diferiu estatisticamente do controle negativo ( $P \leq 0,05$ ) (água ultrapura), evidenciando efeito tóxico, tanto em moscas descendentes do cruzamento ST (**Figura 1A**), quanto moscas descendentes do cruzamento HB (**Figura 1B**).

Os resultados obtidos sugerem que compostos presentes no extrato do noni podem apresentar ação citotóxica. Tal hipótese é sustentada pelo trabalho de Yassin et al (2015), o qual afirma que o noni possui compostos que conferem toxicidade a *Drosophila* sp. Além

disso, noni na concentração de 2 mg/mL foi hepatotóxico incrementando morte em 40% dos ratos expostos oralmente por 3 meses (SHALAN; MUSTAPHA; MOHAMED, 2016).

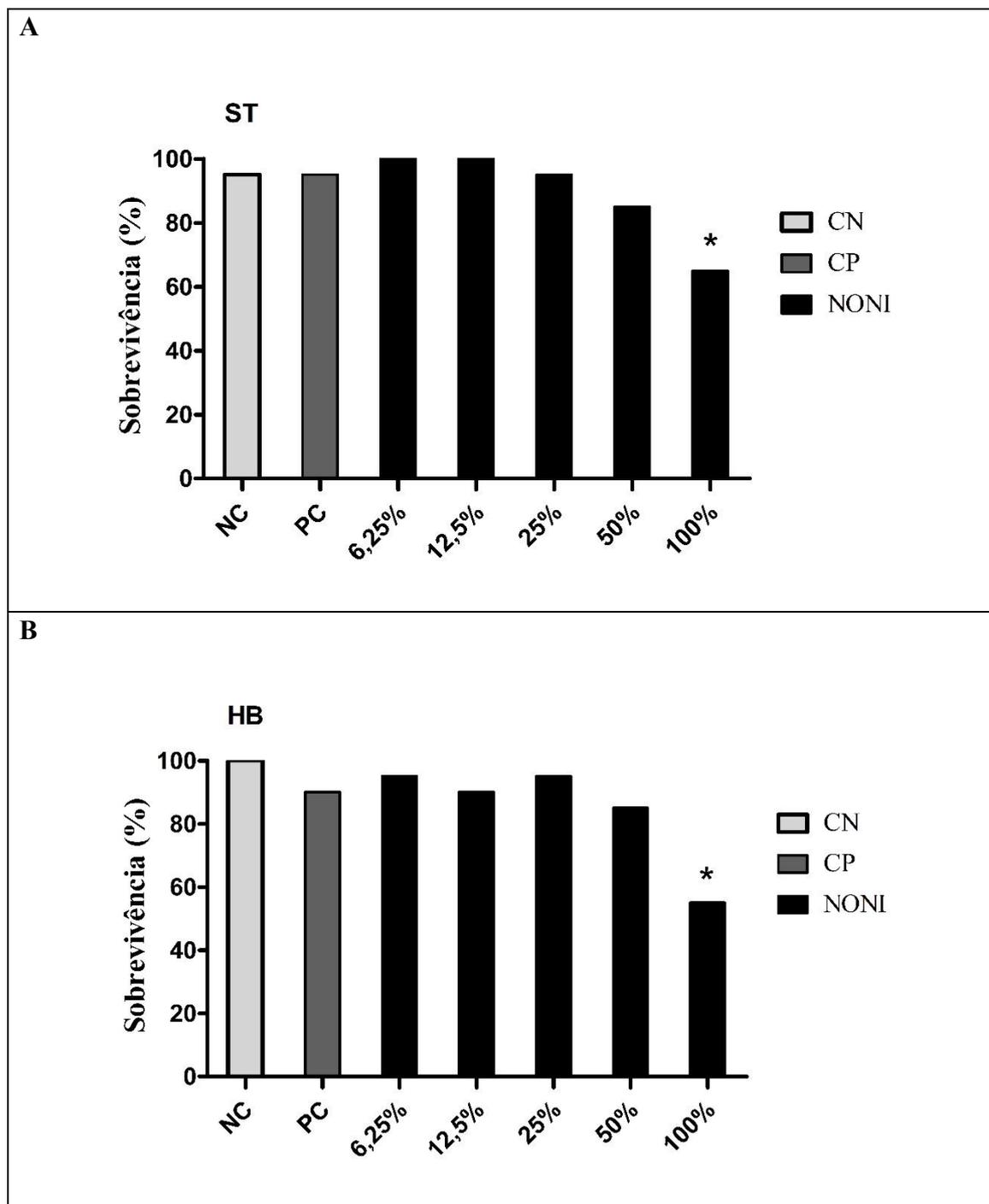
Toxicidade reprodutiva, ossificação retardada, lesões hepatológicas e redução do comprimento do fígado, bem como efeitos comportamentais já foram relatados em ratos em dieta a base de noni (Muller et al., 2009; Marques et al., 2010; Shalan; Mustapha; Mohamed, 2016).

Baseado nos resultados de sobrevivência de *D. melanogaster*, os efeitos do noni sobre a integridade do material genético foram avaliados por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em asas de *D. melanogaster* – SMART. Os efeitos mutagênicos foram avaliados nas quatro concentrações subletais identificadas no ensaio de sobrevivência.

Foram quantificadas as frequências de manchas simples pequenas, grandes e manchas gêmeas em todas as moscas tratadas com noni e uretano, e as frequências foram comparadas com o controle negativo (água ultra-pura). Como apresentado na **tabela 1 e 2** nenhuma das concentrações de noni testadas neste trabalho apresentaram alta frequência de manchas mutantes. Neste sentido, os resultados obtidos pelo SMART sugerem que o extrato aquoso de noni nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25 não apresentam efeito mutagênico ou recombinogênico para *D. melanogaster*. Os resultados obtidos apontam para a ausência de mutágenos diretos (cruzamento ST – **tabela 1**) e pró-mutágenos (cruzamento HB – **tabela 2**) no extrato aquoso usado neste trabalho.

Conforme apresentado na **tabela 1 e 2**, uretano a 10 mM induziu alta frequência de manchas mutantes, diferindo assim do controle negativo em todas as categorias de manchas, tanto nos descendentes do cruzamento ST, quanto do HB.

Mais de 195 artigos estão disponíveis tendo como objeto de estudo a *M. citrifolia*. A grande maioria dos trabalhos, buscam sobretudo, avaliar as propriedades benéficas e malélicas do extrato aquoso do fruto ou folha em diferentes organismos modelos, bem como a quantificação dos componentes presentes no extrato. Uma grande discordância dos dados é observada. Enquanto muitos pesquisadores defendem as propriedades benéficas do noni, muitos outros asseguram propriedades toxicas conferida pelo mesmo.



**Figura 1.** Taxas de sobrevivência das progênes de *Drosophila melanogaster* resultantes dos cruzamentos ST (A) e HB (B), tratadas cronicamente como diferentes concentrações de Noni.

NC = Controle negativo (Água); PC = Controle positivo (Uretano 10 mM).

\*Diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes

**Tabela 1.** Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico de larvas com extrato aquoso do noni.

Tratamentos (mM)	Número de moscas	Manchas por moscas (número de manchas); diagnóstico estatístico <sup>a</sup>					Manchas com clone <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células por divisão <sup>d</sup>	
		Manchas simples pequenas (1-2 células) <sup>b</sup>	Manchas simples grandes (> 2 células) <sup>b</sup>	Manchas gêmeas	Total de manchas	Observado		Controle corrigido	
<i>Controle negativo</i>	40	0,45 (18)	0,05 (02)	0,00 (00)	0,50 (20)	18	0,92		
Uretano10	40	2,58 (103) +	0,35 (14) +	0,25 (10) +	3,18 (127) +	125	6,40	5,48	
<i>Noni</i>									
6,25 %	40	0,28 (11) -	0,20 (08) i	0,03 (01) i	0,05 (20) -	20	1,02	0,01	
12,5 %	40	0,13 (05) -	0,05 (02) i	0,03 (01) i	0,20 (08) -	08	0,40	- 0,52	
25,0 %	40	0,18 (07) -	0,10 (04) i	0,00 (00) i	0,28 (11) -	11	0,56	- 0,36	
50,0 %	40	0,33 (13) -	0,03 (01) i	0,03 (01) i	0,38 (15) -	14	0,71	- 0,21	

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): *U*-test; níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo;  $P \leq 0.05$  vs. controle negativo;

<sup>b</sup> incluindo raras manchas simples *flr*<sup>3</sup>.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* clones de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48800 células (sem correção de tamanho).

**Tabela 2.** Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) após tratamento crônico de larvas com extrato aquoso do noni.

Tratamentos (mM)	Número de moscas	Manchas por moscas (número de manchas); diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas	Manchas com clone <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células por divisão <sup>d</sup>	
		Manchas simples pequenas (1-2 células) <sup>b</sup>	Manchas simples grandes (> 2 células) <sup>b</sup>	Manchas gêmeas	Observado			Controle corrigido	
<i>Controle negativo</i>	40	0,53 (21)	0,05 (02)	0,00 (00)	0,58 (23)	22	1,12		
Uretano10	40	13,93 (557) +	1,98 (79) +	1,08 (43) +	16,98 (679) +	656	33,60	32,48	
<i>Noni</i>									
6,25 %	40	0,30 (12) -	0,20 (08) i	0,03 (01) i	0,53 (21) -	20	1,02	- 0,10	
12,5 %	40	0,35 (14) -	0,05 (02) i	0,00 (00) i	0,40 (16) -	15	0,76	- 0,36	
25,0 %	40	0,18 (07) -	0,08 (03) i	0,03 (01) i	0,38 (15) -	10	0,51	- 0,61	
50,0 %	40	0,30 (12) -	0,23 (09) +	0,03 (01) i	0,55 (22) -	21	1,07	- 0,05	

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): *U*-test; níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo;  $P \leq 0.05$  vs. controle negativo;

<sup>b</sup> incluindo raras manchas simples *flr*<sup>3</sup>.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* clones de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48800 células (sem correção de tamanho)

Ao que diz respeito a ensaios de genotoxicidade/mutagenicidade, uma grande carência de dados é observada. Em concordância com Franchi et al (2008) o tratamento crônico com suco de noni, não causou efeitos mutagênicos em *D. melanogaster*. Ratos e Bactérias quando tratados em dieta suplementada com noni não apresentaram alterações genéticas, resultado confirmado pelo teste de aberração cromossômica e o teste Ames, respectivamente (Westendorf et al., 2007).

Além disso em *D. melanogaster*, noni demonstrou atividade antimutagênica e antirecombinogênica contra os danos induzidos por doxorubicina e mitomicina C (Franchi, 2008; Franchi et al., 2013).

Evidências de efeitos anticarcinogênicos também foram reportados por Lim et al (2016), o qual ao testar extrato aquoso de folhas de noni, descobriu que os componentes do noni eram capazes de induzir a apoptose de carcinoma de pulmão LL2 ao levar ao bloqueio do ciclo celular da célula neoplásica. Além disso foi constatado alta expressão de genes associados a atividade anticancerígena e anti-inflamatória.

Ação anti-inflamatória, ativação do sistema imunológico, proteção hepática e da memória a longo prazo, também foram evidenciados frente a exposição de ratos ao extrato aquoso de noni (Wang et al., 2008; Wang et al., 2008; Pauchauri et al., 2012).

No Brasil, mesmo que a ANVISA não tenha liberado o consumo de noni, comumente a população pode recorrer as propriedades fitoterápicas do fruto. Mesmo não sendo evidenciado efeitos mutagênicos no presente trabalho, os autores reconhecem a necessidade de mais pesquisas fundamentadas na Genética Toxicológica, visando a obtenção de informações sobre a toxicocinética dos componentes do noni.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que nestas condições experimentais, neste organismo modelo e nestas concentrações, o extrato aquoso de *M. citrifolia* não apresenta ação mutagênica. Além disso, concluímos que a concentração de 100% apresenta componentes com ação tóxica para *D. melanogaster*.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Informe Técnico nº. 25, de 29 de maio de 2007.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25\\_290507.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25_290507.htm)>. Acesso em 04 Março de 2017.

ALENCAR, M.V.O. B.; SILVA, M. B. S.; PAZ, M. F. C. J.; MORAES, G. P.; NUNES, A. T.; CAVALCANTE, A. A. C. M.. Genotoxicidade e nefrotoxicidade da *Morinda citrifolia* em estudos pré-clínicos: riscos à saúde pública. **Revista Interdisciplinar**, Teresina v.6, n.1, p.1-8, jan/fev/mar. 2013.

CÂNDIDA, T.; FRANÇA, J. P.; CHAVES, A. L. F.; LOPES, A. R.; GAIBA, S.; SACRAMENTO, C. K.; FERREIRA, L. M.; FRANÇA, L. P.. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 29, n.2, p. 4-10. 2014.

**CENTRO DE COMBATE AO CÂNCER**. O que é o câncer. Disponível em: <<http://cccancer.net/o-cancer/o-que-e-o-cancer/>>. Acesso em 04 Março de 2017.

DANTAS, E. L. R.; SÁ, F. H. L.; CARVALHO, S. M. F.; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, E. M.; RIBEIRO, E. M.. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, 55(3): 263-269, maio. 2009.

Dr. LUIZ ALBERTO SILVEIRA; Dr. LUCAS VAN de SANDE SILVEIRA.. **Oncologia Clínica Florianópolis: O que é, como se forma**. Disponível em: <[http://www.oncologiaclinicafloripa.com.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47:entenda-o-cancer&catid=14:sobre-o-cancer](http://www.oncologiaclinicafloripa.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=47:entenda-o-cancer&catid=14:sobre-o-cancer)>. Acesso em 27 de Abril de 2017.

FRANCHI, L.P.; GUIMARÃES, N.N.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H.R.; CUNHA, K.S. Ausência de efeito tóxico-genético de *Morinda citrifolia* (Noni) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista eletrônica de farmácia**, Universidade Federal de Goiás, v. 3, n.1, p. 46-53, 2008.

FRANCHI, L. P.; GUIMARÃES, N. N.; ANDRADE, L. R.; ANDRADE, H. R. H.; LEHMAN, M.; DIHL, R. R.; CUNHA, K.. Antimutagenic and antirecombinogenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Anais da Academia Acadêmica de Ciências**, V. 85, n. 2, p. 585-594, 2013.

GERARD MANNING. Uma introdução rápida e simples a *Drosophila melanogaster*. Disponível em: <<http://ceolas.org/VL/fly/intro.html>>. Acesso em: 01 de Maio de 2017.

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

GRAF, U.; SCHAIK, N. V.. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. 271: 59-67, 1992.

**INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA)**. Câncer, o que é. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em 04 Março de 2017.

**INSTITUTO ONCOGUIA**. Alterações nos Genes. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/alteracoes-nos-genes/8160/73/>>. Acesso em 20 de Março de 2017.

JÉSSICA CARVALHO. *Drosophila Melanogaster* e a Genética do Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.universoracionalista.org/drosophila-melanosgaster-e-genetica-do-desenvolvimento/>>. Acesso em 25 Março de 2017.

KALLUF, L, J, H.. **Fitoterapia funcional: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos**. São Paulo: VP Editora, 2008. 304p.

LIM, S, L.; MUSTAPHA, N, M.; GOH, Y, M.; BAKAR, N, A,A.; MOHAMED, S.. Metastased lung cancer suppression by *Morinda citrifolia* (Noni) leaf compared to Erlotinib via anti-inflammatory, endogenous antioxidant responses and apoptotic gene activation. **Mol Cell Biochem**, 2016 May;416(1-2):85-97.

MATOSO, L. M. L.; MELO, C. C. R.; MENEZES, L. M. C.; OLIVEIRA, L. E.; OLIVEIRA, K. K. D.. Características e a utilização do noni (*Morinda citrifolia*). **C&D- Revista Eletrônica da Fainor**, Vitória da Conquista, v.6, n.1, p.42-50, jan/jun, 2013.

MARQUESA, N, F, Q.; MARQUESA, A,P, B, M.; IWANO, A, L.; GOLINA, M.; CARVALHO, R, R.; PAUMGARTTENB, F, J, R.; DALSENTERA, P, R.. Delayed ossification in Wistar rats induced by *Morinda citrifolia* L. exposure during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**. v.128, p. 85–91, 2010.

MORAIS, C. R.; BONETTI, A. M.; CARVALHO, S. M.; REZENDE, A. A. A.; ARAUJO, G. R.; SPANÓ, M. A.. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, **Chemosphere**, v. 165, p.342-351, 2016.

MULLER, J, C.; BOTELHO, G, G, K.; BUFALO, A, C.;BOARETO, A, C.; RATTMANN, Y, D.; MARTINS, E, S, M.; CABRINI, D, A.; OTUKI, M, F.; DALSENTER, P, R.. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): *In vivo* and *in vitro* reproductive toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 121, p. 229–233, 2010.

OTONI, W. C.; RIBEIRO, A. P. O.. **Teste de Mutação e Recombinação Somáticas (SMART): o que é e em que se aplica ?**. Disponível em: <<http://arquivo.ufv.br/dbg/seminar/resu0010.htm>>. Acesso em 26 de Abril de 2017.

PACHAURI, S, D.; VERMA, P, R, P.; DWIVEDIA, A, K.; TOTA, S.; KHANDELWAL, K.; SAXENAC,J, K.; NATHD, C.. Ameliorative effect of Noni fruit extract on streptozotocin-induced memory impairment in mice. **Behavioural Pharmacology**. V. 24, n. 4, 2013.

PIMENTEL, D. D.; MEIRA, A. M. B.; ARAUJO, C. R. F.; PEIXOTO, M. I.. Uso de Noni por pacientes oncológicos. **Revista Saúde e Ciência online**, Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, 5(1): 37-44, 2016.

RUI ARTUR P.L. GOMES.. **PROTOCOLO - Utilização de Drosophila em Genética: 1ª Parte**. Departamento de Biologia Vegetal - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. P. 6. jan. 2001.

SHALAN, M.N.A.A., MUSTAPHA, N.M., MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2016.

SECRETI, L. C.; OSHIRO, A. M.; OLIVEIRA, V. S.. Características físicas e químicas da polpa *in natura* da fruta noni (*Morinda citrifolia* L.), **A Revista Eletrônica da Faculdade de Ciências Exatas e da Terra Produção/construção e tecnologia**, Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, v. 4, n. 7, 2015.

SILVA, L. R.; MEDEIROS, P. V. Q.; LEITE, G. A.; SILVA, K. J. P.; MENDONÇA, V.; SILVA, G. G.. Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia* L. (noni), **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, vol.17 n.1 Ciudad de la Habana ene.mar.2012.

SOLOMON, N.. **O fruto tropical de 101 aplicações medicinais: Suco de Noni**. 1<sup>a</sup> ed. Vineyard: Utah; 1999. 31p.

SOUSA, J. S. B.. **O uso de *Morinda citrifolia* L. (noni) como terapia alternativa na saúde humana: uma revisão de literatura**. Disponível em: <[http://www.cstr.ufcg.edu.br/grad\\_cienc\\_bio/tcc\\_15\\_1/05\\_jakelyne\\_suelen\\_bezerra\\_de\\_sousa\\_2015\\_1.pdf](http://www.cstr.ufcg.edu.br/grad_cienc_bio/tcc_15_1/05_jakelyne_suelen_bezerra_de_sousa_2015_1.pdf)>. Acesso em 24 Fevereiro de 2017.

TOMBOLATO, A. F. C.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimatação no Brasil. Informações técnicas: **O agrônomo**, Campinas. V. 57, n. 1, 2001.

VALE, C. R.; OLIVEIRA, C. M. A.; CHEN-CHEN, L.. **Avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e antigenotóxica da seiva *Hymenaea courbaril* L. em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/mestrado/trabalhos-mestrado/mestrado-camila-regina.pdf>>. Acesso em 20 Março de 2017 .

WANG, M, Y.; ANDERSON, G.; NOWICKI, D.; JENSEN, J.. Hepatic Protection by Noni Fruit Juice Against CCl4-Induced Chronic Liver Damage in Female SD Rats. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 63, p.141–145, 2008.

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

WEST, B.J., SU, C.X., JENSEN, J. Hepatotoxic and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit, **The Journal of Toxicological Sciences** (J.Toxicol. Sci) vol.34, n.5, p.581-585, 2009.

WEST, B, J.; SU, C, X.; JENSEN, J.. Prenatal toxicity test of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The Journal of Toxicological Sciences** (J. Toxicol. Sci.). vol 33, n5, p. 647-649, 2008.

WESTENDORF, J.; EFFENBERGER, K.; IZNAGUEN, H.; BASAR, S.. Toxicological and Analytical Investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. **Journal Agricultural and Food Chemistry**., V. 55, n. 2, 2007.

VIEIRA, J.S; MORAIS, C.R

YASSINA, A.; DEBATO, V.; BASTIDEA, H.; GIDASZEWSKI, N.; DAVID, J, R.; POOLA, J, E.. Recurrent specialization on a toxic fruit in an island *Drosophila* population. **PNAS Early Edition**. April 26, 2016 | vol. 113 | no. 17 | 4771–4776. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/113/17/4771.full.pdf>>. Acesso 15 setembro 2017.

YUCE,B.; GULBERG, V.; DIEBOLD, J.; GERBES, A, L.. Hepatitis Induced by Noni Juice from *Morinda citrifolia* : A Rare Cause of Hepatotoxicity or the Tip of the Iceberg?. **Digestion** v.168, p.167–170, 2006.