



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Joélicia Clécia da Silva Lima

**BIOATIVIDADE DE *Morinda citrifolia* L. (NONI) NA
INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus
aureus***

Vitória de Santo Antão

2015

Joélicia Clécia da Silva Lima

**BIOATIVIDADE DE *Morinda citrifolia* L. (NONI) NA
INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus
aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientador: Profa. Dra. Zelyta Pinheiro de Faro

Co-Orientador: Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado

Vitória de Santo Antão

2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lúcia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

L732b Lima, Joélicia Clécia da Silva.

Bioatividade de *Morinda citrifolia* L. (noni) na inibição de *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*/ Joélicia Clécia da Silva Lima. – Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.

xxii, 67 folhas: il.; fig.

Orientador: Zelyta Pinheiro de Faro.

Co-orientador: Eriane de Castro Lima Machado.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2015.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Morinda. 2. Antibiose. 3. Conservação de Alimentos. I. Faro, Zelyta Pinheiro de (Orientadora). II. Machado, Eriane de Castro Lima (Co-orientadora). III. Título.

583.93 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-102/2015



Dissertação de Mestrado apresentada por **Joélicia Clécia da Silva Lima** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**BIOATIVIDADE DE MORINDA CITRIFOLIA L NA INIBIÇÃO DE ESCHERICHIA COLI E STAPHYLOCOCCUS AUREUS**", orientada pela Profª Drª Zelyta Pinheiro de Faro e coorientada pela Profª Drª Erilane de Castro Lima Machado, aprovada no dia 29 de maio de 2015 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Dr. Leandro Finkler
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Drª Michelle Rose de Oliveira Silva
CAV/UFPE

Autora

Joélicia Clécia da Silva Lima

Ao Rafael, meu marido, melhor amigo
e maior incentivador.
Dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu a vida e que me fortaleceu para superar todas as barreiras surgidas ao longo desse percurso.

Agradeço a minha família por todo apoio e compreensão durante o desenvolvimento de todos os trabalhos.

Ao meu marido Rafael Lima por todo auxílio, carinho e paciência.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente por todos os conhecimentos adquiridos.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela bolsa concedida durante os anos do curso.

À orientadora Zelyta Pinheiro de Faro e a co-orientadora Erilane de Castro Lima Machado por todo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao Professor Emerson Peter da Silva Falcão por sua importante contribuição.

Ao Professor André Maurício Melo Santos por sua colaboração.

À Dra. Michelle Rose de Oliveira Silva, por todo auxílio durante as experimentações.

À Maria Aparecida da Conceição de Lira pelo auxílio prestado nos trabalhos e a todos os colegas de laboratório, pela ajuda e companheirismo.

À toda equipe de técnicos dos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos, Bromatologia e Multifuncional 1 pelo apoio prestado ao desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários da Secretária do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, por toda atenção e ajuda prestada nos procedimentos relativos aos assuntos institucionais.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE SÍMBOLOS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1.1 Introdução | 1 |
| 1.2 Objetivos | 4 |
| 1.2.1 Objetivo Geral | 4 |
| 1.2.2. Objetivos Específicos | 4 |
| 1.3 Revisão da Literatura | 5 |
| 1.3.1 Noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) | 5 |
| 1.3.2 Características da Planta | 6 |
| 1.3.3 Constituição Fitoquímica da <i>M. citrifolia</i> | 8 |
| 1.3.4 Metabólitos Secundários | 16 |
| 1.3.4.1 Terpenos | 16 |
| 1.3.4.2 Compostos Fenólicos | 16 |
| 1.3.4.3 Compostos Nitrogenados | 17 |
| 1.3.5 Propriedades Biológicas da <i>M. citrifolia</i> | 17 |
| 1.3.5.1 Atividade Antibacteriana da <i>M. citrifolia</i> | 19 |
| 1.3.5.2 Efeitos Adversos | 21 |
| 1.3.5.3 Situação Regulamentar da <i>M. citrifolia</i> no Brasil | 23 |
| 1.3.6 Contaminação de Alimentos por Micro-organismos | 24 |
| 1.3.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 25 |
| 1.3.6.2 <i>Escherichia coli</i> | 26 |
| CAPÍTULO 2 | 27 |

| | |
|---|-----|
| Atividade antibacteriana de extratos de <i>Morinda citrifolia</i> L. na inibição de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| 2.1 Resumo | 28 |
| 2.2 Abstract | 29 |
| 2.3 Introdução | 30 |
| 2.4 Material e Método | 31 |
| 2.4.1 Coleta do Material Vegetal e Obtenção dos Extratos Orgânicos | 31 |
| 2.4.2 Padronização da Densidade do Inoculo | 33 |
| 2.4.3 Teste de Atividade Antibacteriana | 33 |
| 2.4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) | 34 |
| 2.4.5 Análise Cromatográfica | 35 |
| 2.4.5.1 Cromatografia em Camada delgada (CCD) | 35 |
| 2.4.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 35 |
| 2.4.5.3 Curva da Concentração de Quercetina | 36 |
| 2.4.6 Ensaio para Determinação de Saponinas | 36 |
| 2.5 Resultados e Discussão | 36 |
| 2.5.1 Rendimento dos Extratos das Partes Vegetais de <i>M. citrifolia</i> | 36 |
| 2.5.2 Teste de Atividade Antibacteriana | 37 |
| 2.5.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de Extratos da Raiz de <i>M. citrifolia</i> | 40 |
| 2.5.4 Análise Cromatográfica | 42 |
| 2.5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 42 |
| 2.5.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 44 |
| 2.5.4.3 Curva da Concentração de Quercetina | 48 |
| 2.5.5 Teste de Afrogenicidade | 49 |
| 2.6 Referências Bibliográficas | 52 |
| DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| ANEXOS | xvi |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1.1 | <i>M. citrifolia</i> , A, B e C: planta, frutos e flores, respectivamente. | 7 |
| Figura 1.2 | Frutos de <i>M. citrifolia</i> em diferentes estágios de maturação. | 8 |
| Figura 2.1 | Mapa do local onde foi realizada a coleta das amostras de <i>M. citrifolia</i> . Fonte: Google Earth 2015. | 32 |
| Figura 2.2 | Material vegetal obtido de plantas de <i>M. citrifolia</i> . A, B, C e D: casca, folha, raiz e semente, respectivamente. | 33 |
| Figura 2.3 | Formação de halos de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> com a utilização de extratos da raiz de <i>M. citrifolia</i> obtidos com os solventes ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. | 40 |
| Figura 2.4 | Cromatografia em camada delgada observada em luz UV de 365nm demonstrado a presença de padrões de bandas de coloração azul brilhante, sugestivos da presença de cumarinas. A, B, C, D, E e F: padrão de cafeína, padrão de quercetina, extrato ciclohexânico, extrato clorofórmico, extrato etanólico e extrato obtido com acetato de etila, respectivamente. | 43 |
| Figura 2.5 | Fórmula estrutural da cumarina 1,2-benzopirona | 44 |
| Figura 2.6 | Fórmula estrutural da cumarina umbeliferona (7-hidroxycumarina) | 44 |
| Figura 2.7 | Fórmula estrutural da cumarina escopoletina | 44 |
| Figura 2.8 | Fórmula estrutural da cumarina 4- hidroxycumarina | 44 |
| Figura 2.9 | Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de <i>M. citrifolia</i> obtido com acetato de etila. | 45 |
| Figura 2.10 | Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de <i>M. citrifolia</i> obtido com clorofórmio. | 46 |
| Figura 2.11 | Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de <i>M. citrifolia</i> obtido com ciclohexano | 46 |
| Figura 2.12 | Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de <i>M. citrifolia</i> obtido com etanol. | 47 |
| Figura 2.13 | Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de <i>M. citrifolia</i> revelando padrões de picos correspondentes a presença de quercetina e cafeína. | 47 |

- Figura 2.14 Curva de calibração da quercetina (mg/mL), obtida para 49
determinação dos teores de quercetina em extratos da raiz de *M.*
citrifolia.
- Figura 2.15 Teste da presença de saponinas, com espuma persistente por mais 51
de duas horas, confirmando a presença do composto.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1.1 | Compostos químicos de <i>M. citrifolia</i> de acordo com as partes da planta (adaptado de Chan-Blanco et al., 2006). | 10 |
| Tabela 2.1 | Rendimento dos extratos obtidos de <i>M. citrifolia</i> com a utilização de diferentes solventes, a partir de 10g do material vegetal. | 37 |
| Tabela 2.2 | Atividade antibacteriana de extratos da raiz de <i>M. citrifolia</i> na inibição de <i>S. aureus</i> . | 38 |
| Tabela 2.3 | Teste da Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos da raiz de <i>M. citrifolia</i> frente à cepa de <i>S. aureus</i> . | 41 |
| Tabela 2.4 | Resultado da avaliação fitoquímica em cromatografia de camada delgada dos extratos da raiz de <i>M. citrifolia</i> obtidos com diferentes solventes. | 43 |
| Tabela 2.5 | Relação entre a concentração de quercetina e a área de pico observada em CLAE. | 48 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|-------------------|
| Cm | Centímetro |
| % | Porcentagem |
| °C | Grau Celsius |
| m | Metro |
| mm | Milímetro |
| µg | Micrograma |
| mg | Miligramas |
| g | Gramma |
| kg | Quilograma |
| mL | Mililitro |
| L | Litro |
| nº | Número |
| p/v | Peso por volume |
| α | Alfa |
| h | Hora |
| nm | Nanômetro |
| µL | Microlitros |
| v/v | Volume por volume |
| > | Maior que |
| min | Minuto |
| mAU | Área de Pico |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| UFPE | Universidade Federal de Pernambuco |
| CAV | Centro Acadêmico de Vitória |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CCD | Cromatografia de Camada Delgada |
| TLC | Thin Layer Chromatography |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| EUA | Estados Unidos da América |
| BHT | Butil Hidroxi Tolueno |
| SAR | Superoxide Anion Radical |
| COX1 | Ciclo-oxigenase 1 |
| COX 2 | Ciclo-oxigenase 2 |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| TNJ | TAHITIAN NONI JUICE |
| DL 50 | Dose Letal 50% |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| CMI | Concentração Mínima Inibitória |
| MIC | Minimum Inhibitory Concentration |
| CMB | Concentração Mínima Bactericida |
| MBC | Minimum Bactericidal Concentration |
| IPA | Instituto Agrônomo de Pernambuco |
| FIG. | Figura |
| TAB. | Tabela |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| TSA | Tryptone Soya Ágar |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| UV | Ultravioleta |

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| Rf | Fator de Retenção |
| DAD | Detector de Uv com Arranjo de Diador |
| EB | Extrato Bruto |
| RE | Rendimento do Extrato |
| CTT | Cloridrato de Trifeniltetrazólio |
| NH ₄ OH | Hidróxido de Amônio |

RESUMO

Morinda citrifolia L. (Noni) é uma planta associada a diversas propriedades biológicas relevantes, tais como atividade anticancerígena, imunomoduladora, antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos orgânicos de *M. citrifolia* frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, na perspectiva de que os mesmos possam ser aplicados na conservação de alimentos. Diferentes partes de *Morinda citrifolia* (casca, folha, semente e raiz) foram coletadas no município de Chã Grande, Pernambuco, Brasil. Os extratos orgânicos foram obtidos pelo método de esgotamento a frio com extrações sucessivas seguindo a série eluotrópica dos solventes (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol), na proporção 1:10 p/v. O teste de atividade antibacteriana com os extratos foi realizado pelo método de difusão em disco de papel utilizando *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 e *Escherichia coli* ATTC 8739 como micro-organismos teste, e em seguida determinou-se a CMI e CMB. Nenhum dos extratos inibiu o crescimento de *E. coli* e apenas os extratos da raiz foram ativos para *S. aureus*. O grau de turvação e a intensidade da cor proporcionados pelos extratos durante a determinação da CMI não permitiram obtenção de resultados neste teste. Quanto a concentração mínima bactericida (CMB), frente a *S. aureus*, os extratos da raiz em acetato de etila e ciclohexano apresentaram valores de 15 mg/mL, enquanto em clorofórmio e etanol foram de 30 mg/mL. A composição de metabólitos secundários dos extratos ativos foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). Em CCD foram identificados padrões de bandas distintos para os extratos, sendo verificadas bandas sugestivas para flavonóides e cumarinas. Nos ensaios em CLAE foram visualizados picos correspondentes aos padrões de quercetina e cafeína. Conclui-se que entre as partes da planta nas condições estudadas, apenas a raiz apresentou atividade antibacteriana na inibição de *S. aureus*, sendo os extratos da raiz em acetato de etila e ciclohexano os mais eficazes. Esta é a primeira descrição dos compostos identificados em CLAE para a raiz da noni. Estudos posteriores podem aumentar o conhecimento a respeito da composição fitoquímica desta planta.

Palavras-Chave: Atividade antibacteriana; *E. coli*; *M. citrifolia*; *S. aureus*

ABSTRACT

Morinda citrifolia L. (Noni) is one plant associated with different biological properties relevant, such as anticancer activity, immunomodulator, antioxidant, anti-inflammatory, among others. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of organic extracts of *M. citrifolia* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, on the perspective that they can be applied in food preservation. Different parts of *Morinda citrifolia* (bark, leaves, seeds and roots) were collected near the town of Chã Grande, Pernambuco, Brazil. The organic extracts were obtained by cold exhaustion method with successive extractions following eluotropic series of solvents (cyclohexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol and methanol), 1:10 w / v. The test of antibacterial activity was conducted by the method of diffusion in paper disc using *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739 as test microorganisms and then determined the MIC and MBC. None of the extracts inhibited the growth of *E. coli* and only the root extracts were active against *S. aureus*. The degree of turbidity and the color intensity provided by extracts during the determination of the MIC did not permit obtaining the test result. With respect to minimum bactericidal concentration (MBC), against *S. aureus*, the root extracts of ethyl acetate and cyclohexane had 15 mg/ml values, while in chloroform and ethanol were 30 mg/ml. The composition of secondary metabolites of active extracts was evaluated by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). In TLC were identified different band standards for the extracts and analysis bands suggestive for flavonoids and coumarins. In tests HPLC were displayed peaks corresponding to the standards of quercetin and caffeine. It is concluded that between the parts of the plant under the conditions tested, only the root showed antibacterial activity in the inhibition of *S. aureus*, and the root extracts in ethyl acetate and cyclohexane are the most effective. This is the first description of these identified compounds by HPLC for the root of noni. Further studies can increase knowledge about the phytochemical composition of this plant.

Keywords: Antibacterial activity; *E. coli*; *M. citrifolia*; *S. aureus*

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

A utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças ocorre há milhares de anos. As antigas civilizações já conheciam o poder medicinal de algumas plantas e as cultivavam, repassando os saberes a cada geração (FEIJÓ et al., 2012). O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo (VARANDA, 2006). Nas últimas duas décadas, as investigações de plantas para tratamento de doenças humanas têm aumentado (AIYELAAGBE, 2001; PRASHANTH et al., 2001) devido a variabilidade genética de micro-organismos frente a ação dos antibióticos (SIBI et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (JUNIOR; PINTO, 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define fitoterápicos como medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As plantas têm sido usadas há milhares de anos para conservar os alimentos, para o tratamento de transtornos de saúde e prevenção de doenças. O conhecimento de suas propriedades curativas foi transmitido ao longo dos séculos dentro e entre as comunidades humanas. (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

As propriedades terapêuticas das plantas são geralmente atribuídas a compostos ativos produzidos durante o metabolismo vegetal secundário (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Dentre as diversas doenças que acometem a humanidade estão as toxinfecções alimentares. De acordo com Reis e Carneiro (2007) as doenças veiculadas pelos alimentos representam sério problema de saúde pública. Segundo Hyldgaard et al. (2012) a utilização de extratos vegetais para elaboração de conservantes naturais para alimentos é uma opção atraente para substituição dos conservantes sintéticos.

O controle da deterioração dos alimentos por micro-organismos patogênicos é alcançado principalmente por controle químico, mas o uso de produtos químicos sintéticos é limitado devido a uma série de aspectos indesejáveis que incluem carcinogenicidade, teratogenicidade, toxicidade aguda e à exigência de períodos prolongados de degradação com o conseqüente desenvolvimento de problemas de poluição ambiental (FALEIRO, 2011). Além disso, hoje existe uma percepção do consumidor cada vez mais negativa em relação aos aditivos alimentares sintéticos (ZINK, 1997).

Nos dias atuais, a descoberta dos compostos bioativos presentes em plantas tem reativado o interesse por espécies pouco conhecidas, mas utilizadas há séculos em determinadas regiões. Esse é o caso da *Morinda citrifolia* L., uma planta medicinal originária do sudeste da Ásia e tradicionalmente utilizada há mais de 2000 anos pelos povos polinésios (LOPES; ALMEIDA, 2011).

M. citrifolia tem sido associada a diversas propriedades terapêuticas, dentre elas à atividade antimicrobiana. West et al. (2006) afirmam que muitos produtos comerciais da noni como o suco, não contém conservantes químicos, indicando assim a presença de fitoquímicos com potencial atividade antimicrobiana. Fato que pode ser de grande importância para a indústria de alimentos, visto que, cuidados higiênico-sanitários são etapas críticas à qualidade do produto em um processamento industrial.

Com base na segurança microbiológica e padronização da qualidade, produtos elaborados apresentam grande importância entre as questões de saúde pública, principalmente pelo tipo de micro-organismo contaminante que podem apresentar e o seu grau de patogenicidade. Dentre os micro-organismos que frequentemente são encontrados em alimentos destacam-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Medidas são necessárias visando não apenas um controle na produção de alimentos com cuidados higiênico-sanitários, mas de novas tecnologias de conservação microbiológica diante de outros fatores de ocorrência destes contaminantes em alimentos, com o intuito de aprimorar a estabilidade de prateleira e manter a qualidade microbiológica de produtos processados.

A utilização de antimicrobianos naturais pode ser uma boa alternativa para conservação de alimentos, com isso, acredita-se que os extratos das diversas partes de *M. citrifolia*, obtidos com solventes de polaridades crescentes, apresentarão efeito

antibacteriano frente as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e assim, poderão ser aplicados na conservação microbiológica de produtos alimentícios.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia antibacteriana *in vitro* dos extratos de partes da planta *Morinda citrifolia* L. (Noni) na inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a sensibilidade das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* frente à ação dos extratos da casca, semente, folha e raiz da Noni;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) *in vitro* dos extratos de diferentes partes da planta na inibição das cepas testadas;
- Determinar os principais fitoconstituintes que poderiam ser associados à atividade antibacteriana de *M. citrifolia* L.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Noni (*Morinda citrifolia* L.)

A planta *Morinda citrifolia* L., conhecida popularmente como “noni”, é originária do sudeste da Ásia e Austrália e, subsequentemente, foi distribuída em toda a região do Pacífico, principalmente nas ilhas da Polinésia Francesa, onde se situa o Taiti (NELSON; ELEVITCH, 2006). *M. citrifolia* também é conhecida, entre outros nomes vulgares, como: Ba Ji Tian, Nonu, Indian Mulberry, Canary wood e Cheese fruit (COSTA, 2011).

Os ancestrais dos polinésios quando migraram do sudeste da Ásia há 2000 anos levaram plantas para utilizar como fonte de alimentos e no tratamento de enfermidades. Dentre as plantas medicinais que levaram, *M. citrifolia* foi a segunda mais popular utilizada para o tratamento de várias doenças (WANG et al., 2002).

Diferentes partes da noni são utilizadas como alimento, bebida, medicamento e para tingimento de tecidos (MÜLLER, 2007). O emprego tradicional da noni pelos polinésios há mais de 2000 anos é atribuído aos efeitos relacionados com atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, anti-helmíntica, analgésica, anti-inflamatória, hipotensora e imunostimulante (WANG et al., 2002)

Os cultivos comerciais de noni podem ser encontrados no Taiti, Havaí e em outros países da Polinésia, onde se fabricam a maioria dos sucos comercializados no mundo. (COSTA, 2011). A noni também é cultivada na Índia, Caribe, América Central e norte da América do Sul (DIXON et al., 1999). Desde os anos 90, os produtos derivados do fruto de *M. citrifolia* são comercializados nos Estados Unidos da América (EUA) e são distribuídos cada vez mais pelo mundo inteiro (NELSON; ELEVITCH, 2006). Como resultado de sua reputação, o consumo do fruto é atualmente alto não apenas nos países produtores, mas também nos Estados Unidos, Japão e Europa (KRISHNAIAH et al., 2012). Apesar da grande demanda internacional pelos produtos oriundos desta espécie, a noni é praticamente desconhecida no Brasil. Sua introdução deu-se há poucos anos e, ainda, não há material propagativo suficiente para o cultivo em escala comercial (VEIGA et al., 2005).

1.3.2 Características da Planta

O gênero *Morinda* pertencente à família Rubiaceae, inclui a espécie *Morinda citrifolia* L., e é composto por cerca de 80 espécies (CHAN-BLANCO et al., 2006).

A seguir está apresentada a classificação taxonômica de *M. citrifolia* proposta por Carolus Linnaeus:

Classificação Botânica

- Reino: Plantae
- Filo: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Gentianales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: *Morinda*
- Espécie: *Morinda citrifolia*
- Nome científico: *Morinda citrifolia* L.¹

O nome botânico para o gênero *Morinda* foi derivado de duas palavras do latim: *Morus*, amora, e *indicus*, indiana, em referência a sua semelhança com o fruto da amoreira *Morus alba*. O nome da espécie *citrifolia* indica a semelhança de suas folhagens com algumas espécies de citrus. Figura 1.1 (NELSON; ELEVITCH, 2006).

A planta *M. citrifolia* é um arbusto perene com cerca de 3 a 10 metros de altura, encontrada em regiões costeiras abertas ao nível do mar e em áreas florestais até cerca de 1300 metros acima do nível do mar (WANG et al., 2002). Desenvolve-se bem em solos vulcânicos ricos em minerais (WANG et al., 2002) e segundo Mcclathey (2002) também se desenvolve em solos arenosos ou muito úmidos.

O vegetal possui folhas elípticas, largas e abundantes (5 a 17 cm de comprimento, 10 a 40 cm de largura) e suas pequenas flores brancas tubulares são agrupados e inseridos no pedúnculo. Os frutos de *M. citrifolia* contêm muitas sementes e podem atingir de 3 a 10 cm de comprimento e de 3 a 6 cm de largura, são ovais e carnosos e após a colheita apresentam odor forte e desagradável (CHAN-BLANCO et al., 2006).

¹ CAROLUS LINNAEUS, (23/05/1717 – 10/01/1778); sueco botânico, físico e zoologista que classificou a planta *M. citrifolia*, responsável pelos fundamentos do esquema de nomenclaturas da taxonomia moderna.



Figura 1.1 – *M. citrifolia*, A, B e C: planta, frutos e flores, respectivamente.

Os frutos de *M. citrifolia* tornam-se amarelos ou brancos opalescentes quando maduros (McCLATHEY, 2002). Além disso, os frutos possuem a superfície grumosa coberta de secções com formatos poligonais (Figura 1.1).

As sementes, que são em formato triangular e com coloração marrom avermelhado, têm um saco de ar ligado a uma extremidade, o que as torna flutuantes. Isso poderia explicar, em parte, a ampla distribuição da planta em todas as ilhas polinésias (WANG et al., 2002).

M. citrifolia é uma espécie bastante precoce, começa a produzir seus primeiros frutos com aproximadamente um ano de cultivo. Além disso, após ter iniciado a fase de produção de frutos ela se torna constante, produzindo o ano inteiro, sendo possível observar em uma mesma planta a ocorrência simultânea de frutos em diferentes estádios de maturação (Figura 1.2) (CHAN-BLANCO et al., 2006).

O período de florescência da planta compreende de novembro a fevereiro, sendo todas as suas partes (frutos, folhas, cascas e raízes) destinadas para fins terapêuticos. As diversas partes da planta são coletadas em diferentes épocas do ano, sendo as raízes coletadas no inverno e as folhas na primavera (WANG et al., 2002).



Fonte: J. Lima

Figura 1.2 - Frutos de *M. citrifolia* em diferentes estágios de maturação.

No Havaí, frutos da noni são colhidos durante todo o ano, embora haja tendências sazonais na produção de frutos que podem ser afetadas ou modificadas pelo tempo e por fertilizantes e irrigação. A produção de frutos pode diminuir um pouco durante os meses de inverno. *M. citrifolia* é considerada uma espécie muito resistente e de boa longevidade. Quando é cultivada exposta ao sol e sem a presença de ventos frios, dificilmente é infectada por doenças ou atacada por insetos (CHAN-BLANCO et al., 2006). Dependendo do programa de tecnologia pós-colheita adotado, os frutos podem ser colhidos em diferentes estágios de maturação e deixados a amadurecer (BARROS, 2009).

1.3.3 Constituição Fitoquímica da *M. citrifolia*

Vários compostos fitoquímicos foram descritos na planta *M. citrifolia*, muitos pertencem aos três principais grupos de metabólitos secundários encontrados na natureza: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados.

Aproximadamente 160 compostos fitoquímicos já foram identificados na planta *M. citrifolia*, e a maioria destes, são compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcaloides. Dentre os compostos fenólicos relatados, os mais importantes são antraquinonas (damnacanthal, morindona e morindina), e também, asperulosido e escopoletina (WANG; SU, 2001). Os principais ácidos orgânicos são ácidos capríco e caprílico (DITTMAR, 1993).

A escopoletina identificada na noni é uma cumarina que segundo Duncan et al. (1998) está associada a atividade antibacteriana. O estudo realizado por Atkinson (1956) reportou a atividade antibacteriana de *M. citrifolia* e afirmou que esse efeito pode ser observado devido à presença de compostos fenólicos, como a aucubina, asperulosido e alizarina no fruto, bem como a presença de antraquinonas na raiz.

Os alcalóides xeronina e proxeronina foram descritos por Heinicke (1985) e Solomon (1999) como constituintes da noni, entretanto a caracterização bioquímica e o método usado para purificação não foram publicados.

Deshmukh et al. (2011) determinaram a presença de antraquinonas, flavonoides, fenólicos, esteroides e taninos em frutos de *M. citrifolia*. Todavia, a composição química difere grandemente de acordo com a parte da planta analisada (CHAN-BLANCO et al., 2006) (Tabela 1.1). Sibi et al. (2012) realizaram um estudo fitoquímico de várias partes de *M. citrifolia* e determinaram alguns compostos presentes na raiz (compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides e glicosídeos), compostos presentes nas folhas (compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas, terpenoides, esteroides e glicosídeos) e compostos presentes na casca da planta (alcaloides, taninos, terpenoides e glicosídeos).

As raízes de *M. citrifolia* são referidas como boas fontes de antraquinonas (THOMSON, 1971). No entanto, segundo Chan-Blanco et al. (2006) a composição físico-química completa do fruto de *M. citrifolia* ainda não foi bem reportada e apenas informação parcial do suco foi avaliada. Da mesma forma, a descrição completa dos fitoconstituintes das outras partes da planta ainda não foi realizada.

Tabela 1.1 - Compostos químicos de *M. citrifolia* de acordo com as partes da planta (adaptado de Chan-Blanco et al., 2006).

| PARTE DA PLANTA | CONSTITUINTE QUÍMICO | REFERÊNCIAS |
|-----------------|---|---|
| Flor | 2-metil-4-hidroxi-5,7- dimetoxiantraquinona 4-O-β-D-glucopiranosil- (1→4) -α-L-ramnopiranosideo | Sang et al. (2002) |
| Flor | 5,8-dimetil-apigenina 4'-O-β- D-galactopiranosideo | Sang et al. (2002), Elkins (1998) |
| Flor | aracetina 7-O- β-D-glucopiranosideo | Chan-Blanco et al. (2006) |
| Fruto | β-D-glucopiranosose pentaacetato | Sang et al. (2002), Elkins (1998) |
| Fruto | 2,6-di-O- (β-D-glucopiranosil-1-O- octanoil -β-D-glucopiranosose | Dittmar (1993) |
| Fruto | 6-O-(β-D-glucopiranosil-1-O-octanoil- β-D-glucopiranosose | Wang et al. (1999) |
| Fruto | Ácido ascórbico | Liu et al. (2001) |
| Fruto | Ácido asperulosídico | Morton (1992), Elkins (1998), Wang et al. (2002), McClatchey (2002) |
| Fruto | Asperuloside tetracetato | Wang et al. (1999), Liu et al. (2001), Cardon (2003) |
| Fruto | Ácido capróico | Dittmar (1993) |

Continuação

| | | |
|--------|---|---|
| Fruto | Ácido caprílico | Sang et al. (2002), Dittmar (1993), Elkins (1998), Wang et al. (2002), Levend e Larson (1979) |
| Fruto | Etil caprilato | Solomon (1999), Dittmar (1993), Cardon (2003), Elkins (1998), Wang et al. 2002), Levand e Larson (1979) |
| Fruto | Etil caproato | Dittmar (1993) |
| Fruto | Ácido hexanóico | Dittmar (1993) |
| Fruto | Ácido octanóico | Farine et al. (1996), Sang et al. (2002) |
| Fruto | Quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosideo | Farine et al. (1996), Sang et al. (2002), Cardon (2003), Wang e Su (2001) |
| Cerne | fiscion 8-O- α -L-arabinopiranosil - (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosil - (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosideo | Wang e Su (2001), Wang et al. (2002) |
| Folhas | Alanina | Sang et al. (2002), Srivastava e Singh (1993), Cardon (2003) |
| Folhas | Quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil - (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosideo - □ | Sang et al. (2002) |
| Folhas | Serina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Treonina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Triptofano | Dittmar (1993), Elkins (1998) |

Continuação

| | | |
|--------|---|--|
| Folhas | Tirosina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Ácido ursólico | Sang et al. (2002), Cardon (2003), Elkins (1998), Wang et al. (2002) |
| Folhas | Valina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Planta | 2-metil-3,5,6- trihidroxiantraquinona | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | 2-metil-3,5,6- trihidroxiantraquinona 6-O-β-D-xilopiranosil - (1→6)-β -D-glucopiranosideo | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | 3-hidroximorindona | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | 3- hidroximorindona 6-O-β-D- xilopiranosil -(1→6)-β-D-glucopiranosideo | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | 5,6- dihidroxilucidina- 3-O-β-D- xilopiranosil -(1→6)-β-D-glucopiranosideo | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | 5,6- dihidroxilucidina | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | Aucubina | Elkins (1998), Wang et al. (2002) |
| Planta | Ácido linoleico | Wang et al. (2002) |
| Planta | Lucidina | Cardon (2003), Inoue et al. (1981), Ross (2001) |
| Planta | Lucidina 3-O-β-D- xilopiranosil -(1→6)-β-D-glucopiranosideo | Cardon (2003), Inoue et al. (1981) |
| Planta | Escopoletina | Farine et al. (1996), Wang et al. (2002) |

Continuação

| | | |
|--------|--|---|
| Folhas | Arginina | Dittmar (1993) |
| Folhas | Ácido aspártico | Dittmar (1993) |
| Folhas | β -sitosterol | Sang et al. (2002), Chunhieng (2003), Elkins (1998), Wang et al. (2002) |
| Folhas | Citrifolinoside B | Sang et al. (2002) |
| Folhas | Cisteína | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Cistina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Ácido glutâmico | Dittmar (1993) |
| Folhas | Glicina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Histidina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Isoleucina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Campferol 3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosideo | Sang et al. (2002) |
| Folhas | Campferol 3-O- β -D glucopiranosil -(1 \rightarrow 2)- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6) - β -D-galactopiranosideo | Sang et al. (2002) |
| Folhas | Leucina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Metionina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |

Continuação

| | | |
|----------------------------|--|---|
| Folhas | Fenilalanina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Prolina | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Folhas | Quercetina 3-O- β -D-glucopiranosideo | Sang et al. (2002) |
| Raiz, cerne, casca da raiz | Morindone | Sang et al. (2002), Inoue et al. (1981), Dittmar (1993), Ross (2001), Cardon (2003), Wang et al. (2002) |
| Raiz, cerne, sementes | Damnacanthal | Sang et al. (2002), Cardon (2003) |
| Folhas | Quercetina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosideo | Sang et al. (2002) |
| Raiz | 8-hidroxi-8-metoxi-2-metil-antraquinona | Cardon (2003), Solomon (1999) |
| Raiz | Ácido rubiclórico | Elkins (1998), Morton (1992) |
| Raiz | 1,3-di-hidroxi-6-metil-antraquinona | Morton (1992) |
| Raiz | Morenone 1 | Solomon (1999) |
| Raiz | Morenone 2 | Solomon (1999) |
| Raiz | Ácido ruberítrico | Cardon (2003) |
| Raiz | Rubiadina | Cardon (2003), Elkins (1998), Inoue et al. (1981), Ross (2001) |

Continuação

| | | |
|----------------------|---------------------------------------|---|
| Casca da raiz | Chlororubin | Dittmar (1993), Elkins (1998) |
| Casca da raiz | Hexose | Dittmar (1993) |
| Casca da raiz | Morindadiol | Dittmar (1993) |
| Casca da raiz | Morindanidrine | Dittmar (1993) |
| Casca da raiz | Morindine | Cardon (2003), Dittmar (1993), Elkins (1998), Morton (1992) |
| Casca da raiz | Pentose | Dittmar (1993) |
| Casca da raiz | Fiscion | Solomon (1999) |
| Casca da raiz | Rubiadina monometil éter | Dittmar (1993) |
| Casca da raiz | Soranjidiol | Dittmar (1993), Elkins (1998), Ross (2001) |
| Casca da raiz | Trioximetilantraquinona monoetil éter | Dittmar (1993) |
| Raiz, casca da raiz, | Alizarina | Cardon (2003), Dittmar (1993), Elkins (1998), Ross (2001), Wang et al. (2002) |
| Frutos | | |
| Sementes | Ácido ricinoleico | Solomon (1999) |

1.3.4 Metabólitos Secundários

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais. Muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas importantes nos vegetais, podem atuar na proteção das plantas contra herbívoros e contra infecção por micro-organismos patogênicos, podem agir como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes e também podem ter papel importante na competição planta-planta. Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2004).

1.3.4.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de metabólitos secundários. São derivados do isopreno (C₅) e são classificados em monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (DEWICK, 2009). Alguns terpenos possuem função bem caracterizada no crescimento e desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados em alguns casos como metabólitos primários ao invés de secundários (BERGAMASCHI, 2010). Os terpenos também são tóxicos para muitos parasitas e herbívoros, exercendo assim um importante papel de defesa do reino vegetal (LICHTENTHALER, 1999).

1.3.4.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, os quais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução (SARTORI, 2012). Segundo Taiz e Zeiger (2004), os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas.

As substâncias fenólicas ou polifenóis contribuem para as propriedades antioxidantes e sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas, mel, bebidas e vegetais. Essas substâncias estão envolvidas na adaptação a condição de estresses ambientais, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (MOURE et al., 2001). Além disso, compostos fenólicos, quando inclusos na dieta, possuem atividade antioxidante e são também responsáveis por capacidade anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE et al., 2007).

1.3.4.3 Compostos Nitrogenados

Os compostos nitrogenados são os metabólitos secundários que possuem em sua estrutura o nitrogênio. Essa categoria inclui alguns compostos que atuam na defesa das plantas contra os parasitas e herbívoros, como os alcaloides. Esses compostos apesar de apresentarem um alto grau de toxicidade despertam grande interesse devido as suas propriedades medicinais (BERGAMASCHI, 2010).

Os alcaloides constituem uma família com mais de 15000 metabólitos secundários nitrogenados, sintetizados a partir de aminoácidos (lisina, tirosina e triptofano). Sua estrutura química é composta de átomos de carbono e nitrogênio, tendo em seu anel heterocíclico um átomo de nitrogênio (BERGAMASCHI, 2010). Acredita-se que a maior parte dos alcaloides funcione em defesa contra predadores, em especial aos mamíferos, devido à sua toxicidade (MITHEN et al., 2000).

1.3.5 Propriedades Biológicas da *M. citrifolia*

M. citrifolia é associada a diversas propriedades terapêuticas, vários estudos já foram realizados sobre seus benefícios, estes têm revelado e confirmado algumas das atividades biológicas da planta, descritas pelos povos polinésios, como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, imunomoduladora, antimicrobiana, antitumoral e antituberculosa, entre outros (PAWLUS; KINGHORN, 2007).

Com relação à atividade anticâncer, Hirazumi e Furusawa (1999) identificaram uma substância imunomoduladora rica em polissacarídeos no suco do fruto de *M. citrifolia* com atividade antitumoral, testada em carcinoma peritoneal de ratos. A administração terapêutica da noni aumentou significativamente a sobrevivência de ratos portadores de tumores. A propriedade anticancerígena da noni foi associada à antraquinona damnacanthal que está presente principalmente nas raízes (SOLOMON, 1999; HIRAMATSU et al., 1993). Enquanto

Wang e Su (2001) investigaram o mecanismo do efeito preventivo do suco de *M. citrifolia* no estágio inicial da carcinogênese. Os resultados sugeriram que a prevenção da formação de tumores e a atividade antioxidante do suco do fruto podem contribuir para o efeito quimiopreventivo. Kamiya et al. (2010) confirmaram o potencial anticarcinogênico de diversas antraquinonas isoladas da raiz de *M. citrifolia*.

A atividade antioxidante também tem sido reportada em vários estudos a exemplo de Zin et al. (2002) que investigaram a atividade antioxidante de extratos das raízes, folhas e frutos de *M. citrifolia*, os resultados mostraram que extratos da planta demonstraram possuir alta atividade antioxidante quando comparados com antioxidantes clássicos como o α -tocoferol e butil hidroxi tolueno (BHT). A atividade para combater radicais ânions superóxidos (SAR) do suco de noni mostrou ser 2,8 vezes maior que a vitamina C, 1,4 vezes maior que o pycnogenol e 1,1 vezes maior que o pó de semente de uva (WANG; SU, 2001). No estudo de Costa (2011) foi analisada a atividade antioxidante da polpa, casca e semente de *M. citrifolia* e concluiu-se que todos os extratos avaliados apresentaram atividade antioxidante *in vitro*.

Com relação à atividade anti-inflamatória, no estudo de Li et al. (2003) foi investigada *in vitro* a atividade anti-inflamatória de 24 espécies de plantas australianas e chinesas, e observaram que *M. citrifolia* em pó possui atividade inibitória da enzima ciclo-oxigenase COX-1. McKoy et al. (2002) mostraram que os extratos aquoso e etanólico do suco de noni possuem atividade antiedematogênica quando administrados tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina.

A atividade de cicatrização foi analisada por Nayak et al. (2009) que avaliaram a atividade de cicatrização de feridas em ratos, de extrato etanólico de folhas de *M. citrifolia*. Os animais tratados com o extrato exibiram redução de 71 % na área da ferida quando comparado com os controles que exibiram 57 %.

Alguns estudos também reportaram a presença de atividade analgésica na noni, como no trabalho realizado por Younos et al. (1990) que verificaram que o extrato da raiz da noni (1,600 mg/kg) apresentou atividade analgésica significativa nos animais, semelhante ao efeito da morfina (75 % e 81 % de proteção através de noni e morfina, respectivamente), além do mais ele também se mostrou não-tóxico. As propriedades analgésicas da *M. citrifolia* são associadas à cumarina escopoletina que também foi relacionada a capacidade de controlar os níveis de serotonina no corpo (LEVAND; LARSON, 1979).

Com relação à atividade cardiovascular foi observada em alguns estudos a eficácia da noni na prevenção da arteriosclerose, uma doença relacionada com a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Este efeito benéfico pode ser devido à presença de

lignananas (KAMIYA et al., 2004). No trabalho de Ridzwan et al. (2002) foi verificado que extratos aquosos do fruto de *M. citrifolia* reduziram a pressão arterial em ratos. E Solomon (1999) afirmou que a escopoletina pode estar relacionada com o efeito anti-hipertensivo da noni.

1.3.5.1 Atividade Antibacteriana da *M. citrifolia*

A atividade antibacteriana da noni tem sido relatada por vários autores, a exemplo de Bushnell et al. (1950) que descreveram a atividade antibacteriana de extratos dos frutos maduros da *M. citrifolia*, obtidos submetendo-se as partes vegetais a alta pressão, sem a utilização de água ou solvente, na inibição de cepas de *Salmonella typhosa*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella schottmuelleri*, *Shigella paradys* e moderada atividade antibacteriana frente a cepas de *E. coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Enquanto no estudo realizado por Locher et al. (1995) foi demonstrado que um acetonitrilo extraído do fruto seco da noni inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *S. pyogenes*. No trabalho de Saludes et al. (2002) foi descrita a atividade antibacteriana da noni, onde o extrato obtido com hexano foi capaz de inibir o crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* em 89 - 95 %.

Na literatura relata-se também a utilização da noni no tratamento da úlcera do estômago, através da inibição da bactéria *Helicobacter pylori* (WANG et al., 2002). A atividade antibacteriana da noni também foi testada também por Jayaraman et al. (2008) que analisaram a atividade de extratos do fruto de *M. citrifolia* obtidos com os solventes metanol, acetato de etila e hexano na inibição de *E. coli*, *S. aureus* e outras 13 bactérias patogênicas. Os extratos do fruto obtidos com metanol apresentaram os melhores resultados na inibição das cepas. Selvam et al. (2009) analisariam a atividade antibacteriana de extratos do pó de frutos de *M. citrifolia* obtidos com os solventes acetona, clorofórmio, metanol e etanol na inibição de cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *Proteus vulgaris*. Todos os extratos estudados apresentaram moderada atividade antibacteriana frente às cepas testadas.

Kumar et al. (2010) testaram a atividade antibacteriana de extratos da folha de *M. citrifolia* obtidos com os solventes etanol e éter de petróleo contra cepas de *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus*. Os dois extratos testados inibiram o crescimento das cepas, porém o extrato alcóolico apresentou melhor resultado.

Usha et al. (2010) estudaram a atividade antibacteriana de extratos das folhas de *M. citrifolia* obtidos com os solventes benzeno, clorofórmio, acetato de etila, etanol e água

frente as cepas de *E. coli* e *S. aureus* e a *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Os resultados do ensaio antimicrobiano revelaram que os extratos demonstraram atividade inibidora frente a todos os micro-organismos testados.

Sunder et al. (2011) verificaram a atividade antibacteriana de extratos do fruto, folhas e sementes de *M. citrifolia* obtidos com os solventes metanol, clorofórmio e acetona na inibição de cepas de *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, e *E.coli*. Dentre os diferentes extratos de *M. citrifolia*, os obtidos da semente apresentaram a melhor atividade antibacteriana, seguidos pelos extratos do fruto e das folhas. O metanol foi o melhor solvente para extração dos componentes de *M. citrifolia* com potencial antibacteriano, seguido pelos extratos da acetona e do clorofórmio respectivamente. *E.coli* e *Pseudomonas spp.* foram inibidas por todos os extratos, no entanto, *Salmonella spp.*, *S. aureus* e *Klebsiella spp.* não foram inibidas por todos os extratos.

Silveira et al. (2011) estudaram a atividade antibacteriana de extrato do fruto de *M. citrifolia* obtido com solvente hidroalcolico na inibição de *S. aureus*. Os extratos do fruto da noni testados revelaram atividade antibacteriana. No entanto, Lopes e Almeida (2011) investigaram a atividade antibacteriana do extrato hidroalcolico do fruto de *M. citrifolia* em cepas de *S. aureus* e *E. coli*, mas não encontraram atividade antibacteriana frente as cepas testadas.

Enquanto Natheer et al. (2012) descreveram a atividade antibacteriana de extratos obtidos dos frutos, folhas e caule de *M. citrifolia* obtidos com os solventes metanol, etanol e acetato de etila na inibição de cepas de *E. coli*, *S.aureus* e outras 10 bactérias patogênicas. Dentre os extratos testados, o autor descreveu os obtidos com metanol como mais eficientes na inibição dos micro-organismos.

Sibi et al. (2012) realizaram um estudo sobre as propriedades antimicrobianas de extratos metanólicos da folha, raiz e caule de *M. citrifolia*, frente as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados revelaram que os extratos das raízes e folhas apresentaram significativa atividade antimicrobiana principalmente devido aos compostos fenólicos e taninos. Dentre os extratos testados, o extrato metanólico da raiz apresentou os melhores resultados, principalmente contra *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Em estudo sobre os fitoconstituintes da raiz de *M. citrifolia*, Sibi et al. (2012) determinaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides e glicosídeos. E afirmaram que estes componentes bioativos são conhecidos por conferirem atividade antimicrobiana as plantas. Não foram encontrados alcaloides e nem terpenoides na raiz.

Tradicionalmente, as raízes de *M. citrifolia* eram utilizadas pelos polinésios para produzir corante amarelo ou vermelho, mas agora são conhecidas por conterem componentes ativos medicinalmente, como antraquinonas, que devido à sua atividade antioxidante, possuem várias propriedades terapêuticas. Estas propriedades incluem a atividade antibacteriana, antiviral e anticâncer, bem como os seus efeitos analgésicos. (KRISHNAIAH et al., 2012).

Duncan et al. (1998) demonstraram que a escopoletina, um fitoconstituente da noni, inibe a atividade de *E. coli*, comumente associada a surtos de infecções graves e até a morte. Atkinson (1956) afirmou que o efeito antimicrobiano observado na noni pode ser devido à presença de compostos fenólicos, tais como acubina, alizarina, escopoletina e outras antraquinonas.

Deng et al. (2007) citaram que dentre os compostos cumarínicos, a escopoletina é responsável pela atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante. As propriedades antibacteriana e antifúngica de saponinas também têm sido bem relatadas na literatura (AVATO et al., 2006; SOETAN et al., 2006; BARILE et al., 2007).

Dentre os trabalhos analisados que comprovaram a atividade antibacteriana dos extratos obtidos de *M. citrifolia* a grande maioria foi realizada na Índia, porém, dentre os trabalhos realizados no Brasil sobre a atividade antibacteriana, que foram limitados apenas ao estudo dos frutos, apenas um encontrou atividade antibacteriana nos extratos analisados. Essas divergências nos resultados podem ser explicadas pelas variações climáticas, pois esse fator pode influenciar na produção dos metabólitos secundários da planta e desse modo, interferir nas suas propriedades terapêuticas.

Diante da comprovação da atividade antibacteriana de *M. citrifolia*, os extratos obtidos da planta podem ser utilizados não apenas para o desenvolvimento de novos medicamentos, mas também podem ser empregados para a elaboração de antibacterianos para uso na conservação de alimentos, fato que poderá ser de grande interesse para a indústria alimentícia.

1.3.5.2 Efeitos Adversos

Apesar de a literatura científica sobre a *M. citrifolia* ser extensa, especialmente em relação aos possíveis efeitos farmacológicos e usos terapêuticos, a quantidade de publicações que avaliaram sua segurança é limitada (WEST et al., 2006). Alguns estudos encontraram resultados controversos quanto às reais propriedades benéficas do consumo da noni. Alguns autores sugerem que o uso indiscriminado e em altas doses da noni poderá

ter efeitos deletérios à saúde. Nesse sentido é importante cautela no uso desses produtos e mais estudos são necessários para esclarecer as lacunas ainda existentes quanto as propriedades medicinais da *M. citrifolia* (COSTA, 2011).

Millonig et al. (2005) relataram um caso de hepatotoxicidade, relacionado ao consumo por algumas semanas de suco da noni. Stadlbauer et al. (2005) também avaliaram alguns casos de hepatotoxicidade associados ao consumo do suco da noni e fizeram os seguintes relatos: Um paciente com histórico de hepatite desenvolveu uma insuficiência hepática após o consumo de 1,5 L de suco da noni durante 3 semanas, necessitando de transplante hepático de urgência. Enquanto outro, sem evidência de doença hepática anterior desenvolveu um episódio de hepatite aguda após o consumo de 2 L de suco de noni por mais de 3 meses.

Yüce et al. (2006) descreveram outro caso de hepatotoxicidade associada ao consumo de suco da noni. Uma paciente foi hospitalizada após ter consumido entre 1 a 1,5 L de suco da noni durante 4 semanas e após interromper o consumo do produto, os sintomas desapareceram. Enquanto Andrada et al. (2007) associaram o consumo durante vários dias de uma preparação da noni ao desenvolvimento de hepatotoxicidade grave. Millonig et al. (2005) e Stadlbauer et al. (2005) afirmaram que as antraquinonas poderiam ser as substâncias responsáveis pelos efeitos hepatotóxicos observados.

Müller (2007) investigou os possíveis efeitos adversos do extrato aquoso do fruto da noni (*M. citrifolia*) sobre a prenhez e parturição de ratas progenitoras e concluiu que a exposição ao extrato seco do fruto da noni pode provocar efeitos adversos na gestação desses animais em doses de 7,5 mg/kg e sugere que as atividades antiestrogênica, antiangiogênica e inibidora da COX-2 estejam relacionadas a estes efeitos. Por outro lado, West et al. (2006) afirmaram que a ligação sugerida entre a ingestão de suco da noni e toxicidade do fígado foi refutada pelo fato de não ser consistente com a histopatologia e resultados de química clínica dos testes de toxicidade subcrônica oral em animais, nem com os valores laboratoriais observados de estudos de segurança clínica, e que nenhuma relação causal pode ser comprovada.

Franchi et al. (2008) realizaram uma avaliação tóxico-genética do suco da noni e concluíram que o mesmo não apresentou efeito tóxico-genético em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Outro estudo foi realizado com purê de frutos da noni que foi administrado por sonda oral a uma dose de 15000 mg/kg a ratos tipo Sprague-Dawley. Os animais foram observados durante duas semanas após a administração. Os animais sobreviveram e não mostraram sinais de toxicidade ou de mudanças comportamentais. Todos os animais pareciam saudáveis e ganharam peso. Necropsias brutas dos animais,

realizadas no final de duas semanas não revelaram quaisquer efeitos patológicos. Conseqüentemente, a DL 50 do fruto da noni foi maior que 15000 mg/kg (PRODUCT SAFETY LABS, 1999).

Kaaber (2000) realizou um estudo para avaliar o potencial alergênico do suco da noni. Foram utilizados dois grupos de seis animais cada, um grupo controle positivo, e um grupo controle negativo. Os animais de teste foram analisados e não foram observadas reações alérgicas ao suco.

Davies e Mugglestone (2003) realizaram um estudo clínico para avaliar a segurança do suco do fruto de noni (Tahitian Noni) em indivíduos saudáveis. Participaram da pesquisa 96 indivíduos, sendo 28 homens e 68 mulheres, com idades entre 18 e 64 anos, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. Estes grupos incluem um grupo placebo e três grupos de teste, recebendo cada um deles uma dose de 750 mL ou do placebo ou do suco Tahitian noni por dia. Os sujeitos foram avaliados, sendo realizados exames hematológicos, bioquímicos, e medições urológicas, feitos nas semanas 0, 2, 4, e 6. Não foram observadas diferenças clinicamente significativas nos parâmetros e medidas do estudo entre qualquer um dos grupos. Estes dados indicam que o consumo de até 750 mL Suco Tahitian Noni por dia é seguro.

WEST et al. (2006) realizaram uma revisão sobre a segurança do suco do fruto de noni e chegaram a conclusão que o o suco de noni é tão seguro quanto outros sucos de frutas comuns.

Diante dos casos citados acima e da existência de poucos estudos a respeito da segurança da utilização do suco do fruto de *M. citrifolia* em humanos, bem como de preparados de outras partes da planta, torna-se claro a necessidade da realização de mais estudos que busquem a definição de doses seguras de produtos obtidos da noni, a fim de utilizar da melhor forma seus possíveis benefícios a saúde, visto que os casos relatados de hepatotoxicidade foram associados ao consumo elevado do produto. O uso indiscriminado de noni não deve ser encorajado a população, pois para evitar possíveis problemas a saúde é importante que seja utilizado em doses seguras.

1.3.5.3 Situação Regulamentar da *M. citrifolia* no Brasil

O interesse comercial pela *M. citrifolia* tem aumentado enormemente nos últimos anos, tendo em vista o surgimento de patentes registradas. Além das patentes registradas pelos Estados Unidos, o suco de noni foi aceito na União Europeia como um novo alimento (EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE OF FOOD, 2002). No Japão, o

suco do fruto e o chá das folhas de *M. citrifolia* foram lançados no mercado de alimentos funcionais e são ingeridos na expectativa de que eles possam ajudar a prevenir doenças (MASUDA et al., 2009).

As propriedades medicinais da noni foram divulgadas para o mundo principalmente a partir de 1995, quando o suco foi processado, patenteado como TAHITIAN NONI® Juice (TNJ) e distribuído por uma empresa norte americana – *Morinda Inc.* e sua companhia filial *Tahitian Noni International* (MÜLLER, 2007). No entanto, apesar do crescimento da comercialização, as pesquisas científicas ainda não são suficientes para a comprovação do uso seguro e das reais propriedades nutricionais e funcionais de produtos à base de noni . Além disso, os compostos fitoquímicos responsáveis por suas supostas propriedades ainda não foram revistos (CHAN-BLANCO et al., 2006). De acordo com Chan-Blanco et al. (2006), embora estudos recentes tenham mostrado que o fruto tem propriedades antibióticas e antioxidantes *in vitro*, ainda não se tem evidências científicas que sustentam os valores nutricionais e medicinais da *M. citrifolia* em humanos.

Diante disso, a ANVISA liberou em 29 de maio de 2007 o informe técnico nº 25, que decidiu que pelo fato de a noni não possuir histórico de consumo no Brasil, a comercialização de qualquer alimento contendo esse ingrediente só será permitida após a comprovação de sua segurança de uso e registro no Órgão competente, conforme determinam a Resolução nº 16/1999 e a Resolução RDC nº 278/2005, respectivamente.

Apesar da advertência emitida pela ANVISA, o suco da noni e também produtos derivados da *M. citrifolia* continuam a serem vendidos ou como suplemento alimentar ou como fitoterápicos no Brasil, sem a realização de estudos toxicológicos pré-clínicos preconizados pela legislação brasileira (MÜLLER, 2007).

1.3.6 Contaminação de Alimentos por Micro-organismos

Diversas doenças que acometem a humanidade são causadas por micro-organismos e dentre elas destacam-se as toxinfecções alimentares que de acordo com Cardoso e Carvalho (2006) são enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos e suas substâncias tóxicas, e constituem um importante problema sanitário. Segundo Passos et al. (2008) os indivíduos acometidos por toxinfecções alimentares podem apresentar diferentes quadros clínicos, períodos de incubação variáveis e os casos graves podem evoluir para óbitos nos pacientes acometidos.

As doenças transmitidas por alimentos consomem recursos com cuidados de saúde e causam mortalidade e morbidade em todo o mundo. Entre os sintomas agudos mais comuns podem ser citados diarreias, vômito, náuseas e, algumas vezes febre (MENDONÇA, 2003).

O tratamento de patologias causadas por bactérias ocorre por meio do uso de agentes antimicrobianos, compostos químicos que, em pequenas concentrações, são capazes de ocasionar a morte ou a inibição do crescimento. Porém, quando utilizados excessivamente, principalmente os mais antigos, têm-se tornado, na maioria das vezes, ineficazes, devido ao surgimento de cepas resistentes (TIBBETTS et al., 2003). Diante disso, torna-se clara a importância da descoberta de novas substâncias com propriedades antimicrobianas, fato que tem se destacado principalmente com relação aos compostos antibacterianos naturais. Além da possibilidade do desenvolvimento de novos medicamentos, novos antimicrobianos poderiam ser empregados como conservantes de alimentos.

1.3.6.1 *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* pertencente à família *Staphylococcaceae* é representada por bactérias em forma de cocos gram-positivos. Bactérias do gênero *Staphylococcus* são distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da pele e da mucosa de grande parte dos mamíferos, dentre eles os humanos (VAN BELKUM et al., 2009). Apesar de ser encontrado com relativa frequência como membro da microbiota normal do corpo humano (mucosa naso-faríngea), *S. aureus* é altamente patogênico, uma vez que atua como agente de várias infecções (FUEYO et al., 2005). A importância epidemiológica de *S. aureus* como agente causador de doenças transmitidas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI; HAHN, 2000). Segundo Raddi et al. (1988) surtos de intoxicação alimentar são frequentemente relatados e os causados por *S. aureus* são os mais comuns. *S. aureus* são micro-organismos capazes de produzir enterotoxinas termorresistentes que são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (JAY, 1994).

1.3.6.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria anaeróbia facultativa e oxidase negativa, são bastonetes gram-negativos curtos, que podem formar cadeia. Constitui um grande grupo heterogêneo cujo habitat natural é o trato intestinal dos humanos e animais de sangue quente (LOPES; ALMEIDA, 2011).

Apesar de *E. coli* ser uma espécie bacteriana da microbiota do trato intestinal de humanos, determinados sorotipos podem causar graves problemas gastrointestinais, com diarreias severas e suas complicações (MENG et al., 2001). É conhecida por produzir enterotoxinas cujas propriedades e participação em diarreias tem sido amplamente investigada (KONOWALCHUK et al., 1977; KONOWALCHUK et al., 1978; SCOTLAND et al., 1980). Desse modo, *E. coli* está entre os mais importantes agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE *Morinda citrifolia* L. NA INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

Joélicia Clécia da Silva Lima

Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil.

Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil.

Autor para correspondência: joeli.clecia@gmail.com

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais
ISSN 1516-0572

2.1 RESUMO

Atividade antibacteriana de extratos de *Morinda citrifolia* L. na inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Morinda citrifolia L. (Noni) é uma planta associada a diversas propriedades biológicas, dentre elas a atividade antibacteriana. O presente estudo objetivou avaliar a atividade antibacteriana de extratos orgânicos de *M. citrifolia* para sua posterior utilização na conservação de alimentos. O material vegetal foi coletado no município de Chã Grande, Pernambuco, Brasil. Os extratos da casca, semente, folha e raiz da noni foram obtidos pelo método de esgotamento a frio com extrações sucessivas seguindo a série eluotrópica dos solventes (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol), na proporção 1:10 p/v. O teste de atividade antibacteriana foi realizado pelo método de difusão em disco de papel utilizando *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 e *Escherichia coli* ATTC 8739 como microorganismos teste. Apenas os extratos da raiz obtidos com os solventes acetato de etila, clorofórmio, ciclohexano, e etanol inibiram o crescimento de *S. aureus*. Nenhum dos extratos inibiu o crescimento de *E. coli*. O valor de Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos obtidos com acetato de etila e ciclohexano foi 15mg/mL e dos extratos clorofórmico e etanólico foi 30 mg/mL. Foram realizados testes de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na análise em CCD foram identificados padrões de bandas sugestivos da presença de flavonoides e cumarinas. Na análise em CLAE foram encontrados padrões de picos correspondentes a presença de quercetina e cafeína. Com o teste de afroxicidade foi detectada a presença de saponinas. Conclui-se que a atividade antibacteriana depende da parte da planta, sendo a eficiência influenciada pelo solvente usado na extração, que por sua vez está relacionado às diversas classes de compostos bioativos. Sugere-se a participação dos compostos encontrados na atividade antibacteriana do extrato da raiz de *M. citrifolia*. No entanto, outros estudos são necessários para a devida associação de metabólitos secundários com a atividade antibacteriana dos extratos da raiz de *M. citrifolia*.

Palavras chave: Atividade antibacteriana; *E. coli*; *M. citrifolia*; *S. aureus*

2.2 ABSTRACT

Antibacterial activity of *Morinda citrifolia* L. extracts on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Morinda citrifolia L. (Noni) is one plant associated with several biological properties, among them the antibacterial activity. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of organic extracts of *M. citrifolia* for subsequent use in food preservation. The plant material were collected near the town of Chã Grande, Pernambuco, Brazil. The organic extracts were obtained by cold exhaustion method with successive extractions following eluotropic series of solvents (cyclohexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol and methanol), 1:10 w/v. The test of antibacterial activity was conducted by the method of diffusion in paper disc using *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739 as test microorganisms. Only root extracts obtained with solvents ethyl acetate, chloroform, cyclohexane and ethanol inhibited the growth of *S. aureus*. None of the extracts inhibited the growth of *E. coli*. The value of Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the extracts with ethyl acetate and cyclohexane was 15 mg/ml and of the chloroform and ethanol extracts was 30 mg/ml. Chromatography tests were performed by thin layer (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). In the analysis of TLC were identified banding patterns suggesting the presence of flavonoids and coumarins. In the HPLC analysis were found peaks patterns suggestive of the presence of quercetin and caffeine. Afrogenicidade test detected the presence of saponins. It is concluded that antibacterial activity depends on the part of the plant, the efficiency being influenced by the solvent used in the extraction, which in turn is related to the various class of bioactive compounds. It is suggested the participation of compounds found in antibacterial activity of the root extract of *M. citrifolia*. However, further studies are required for proper association of secondary metabolites with antibacterial activity of *M. citrifolia* root extracts.

Keywords: Antibacterial activity; *E. coli*; *M. citrifolia*; *S. aureus*

2.3 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no tratamento de doenças é uma prática que iniciou com as civilizações antigas, existente até os dias atuais, e que continua crescendo no mundo. O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vem crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo (Varanda, 2006).

As plantas têm sido usadas há milhares de anos, tanto como alimento quanto para dar sabor e conservar os alimentos, para o tratamento de transtornos de saúde e prevenção de doenças. O conhecimento de suas propriedades curativas foi transmitido ao longo dos séculos dentro e entre as comunidades humanas. Os compostos ativos produzidos durante o metabolismo vegetal secundário são geralmente responsáveis pelas propriedades biológicas de algumas espécies de plantas utilizadas em todo o mundo para diversos fins (Silva & Fernandes Júnior, 2010).

Diversas doenças que acometem a humanidade são causadas por micro-organismos e dentre elas destacam-se as toxinfecções alimentares que de acordo com Cardoso & Carvalho (2006) são enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos e suas substâncias tóxicas, e constituem um importante problema sanitário.

A busca pela prevenção de doenças transmitidas por alimentos levou à construção de sistemas de segurança alimentar bastante sofisticados, mas em todo o mundo, sabe-se que este continua a ser um sério problema de saúde pública (Faleiro, 2011). O controle da deterioração dos alimentos por micro-organismos patogênicos é alcançado principalmente por controle químico, mas o uso de produtos químicos sintéticos é limitado devido a uma série de aspectos indesejáveis que incluem carcinogenicidade, teratogenicidade, toxicidade aguda e à exigência de períodos prolongados de degradação com o conseqüente desenvolvimento de problemas de poluição ambiental (Faleiro, 2011). Além disso, uma percepção do consumidor cada vez mais negativa em relação aos aditivos alimentares sintéticos tem estimulado um maior interesse em encontrar alternativas naturais que sejam capazes de substituir os aditivos sintéticos sem os efeitos indesejáveis daqueles compostos (Zink, 1997). A utilização de extratos vegetais para elaboração de conservantes naturais para alimentos é uma opção atraente para substituição dos

conservantes sintéticos (Hylgaard et al., 2012).

Dentre as plantas utilizadas com fins terapêuticos destaca-se a *M. citrifolia* que é associada a diversas propriedades medicinais, dentre elas à atividade antibacteriana. Muitas propriedades terapêuticas atribuídas à noni já possuem evidência científica, porém, vários estudos relatam possíveis efeitos tóxicos da planta, a exemplo de Millonig et al. (2005); Stadlbauer et al. (2005); Yüce et al. (2006) e Andrada et al. (2007) que relataram casos de hepatotoxicidade associados ao consumo da noni. Além disso, não existem pesquisas suficientes que comprovem a segurança da utilização da *M. citrifolia*. Ainda existe uma carência de estudos que relatem a atividade antibacteriana das várias partes da planta associada aos seus fitoconstituintes, desse modo, é necessário que estudos busquem evidenciar os reais benefícios da *M. citrifolia* e que doses seguras sejam definidas para utilização das possíveis propriedades benéficas da planta. De acordo com Lorenzi & Matos (2002), precauções contra o mau uso de plantas medicinais devem ser levadas em consideração, e a obediência às dosagens prescritas e o cuidado na identificação precisa do material utilizado podem evitar uma série de acidentes.

Diante do mencionado acima, o presente estudo buscou investigar o potencial antibacteriano de extratos obtidos da casca, semente, folha e raiz da noni na inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, micro-organismos comumente associados à infecção alimentar, fato que pode ser de grande utilidade para o controle microbiológico na indústria de alimentos. Além disso, objetivou-se realizar a análise de alguns compostos bioativos presentes na *M. citrifolia* que poderiam estar associados à atividade antibacteriana.

2.4 MATERIAL E MÉTODO

2.4.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos orgânicos

A planta utilizada para o estudo foi a *Morinda citrifolia* L. pertencente a família Rubiaceae e conhecida popularmente como “noni”. Diferentes partes da planta (casca, folha, raiz e semente) foram coletadas no mês de fevereiro de 2014 em uma granja situada no município de Chã Grande, Pernambuco, Brasil, (latitude 9092120; longitude 25-225846) (Figura 2.1). O material coletado foi acondicionado

em sacos plásticos e levado ao Laboratório Microbiologia dos Alimentos do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – CAV da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE para posterior processamento. Uma exsicata de *M. citrifolia* L. foi depositada no Herbário IPA sob o registro FIB nº 25/2011 nº 01.

Para a obtenção dos extratos, as partes vegetais (Figura 2.2) foram lavadas com água corrente para remover as sujidades e, em seguida, colocadas para secar em estufa a temperatura de 60 °C até alcançarem peso constante, sendo esta etapa realizada em 72 horas. As partes secas foram trituradas em moinho de laboratório modelo MA 630/1 (marca Marconi) e o pó obtido foi submetido à extração. Os extratos foram obtidos pelo método de esgotamento a frio com extrações sucessivas seguindo a série eluotrópica dos solventes (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol), na proporção 1:10 p/v (Doughari & Manzara, 2008). O extrato obtido foi filtrado com papel de filtro Whatman nº 1 e concentrado em evaporador rotatório modelo 801 (marca Fisatom) a temperatura de 60 °C até volume reduzido. Os extratos brutos foram armazenados em dessecador até alcançarem peso constante. Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula: $Re = (PES / PTV) \times 100$.

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); PES = Peso do extrato seco (g); PTV = Peso do triturado vegetal (g).

Localização da Área de Coleta

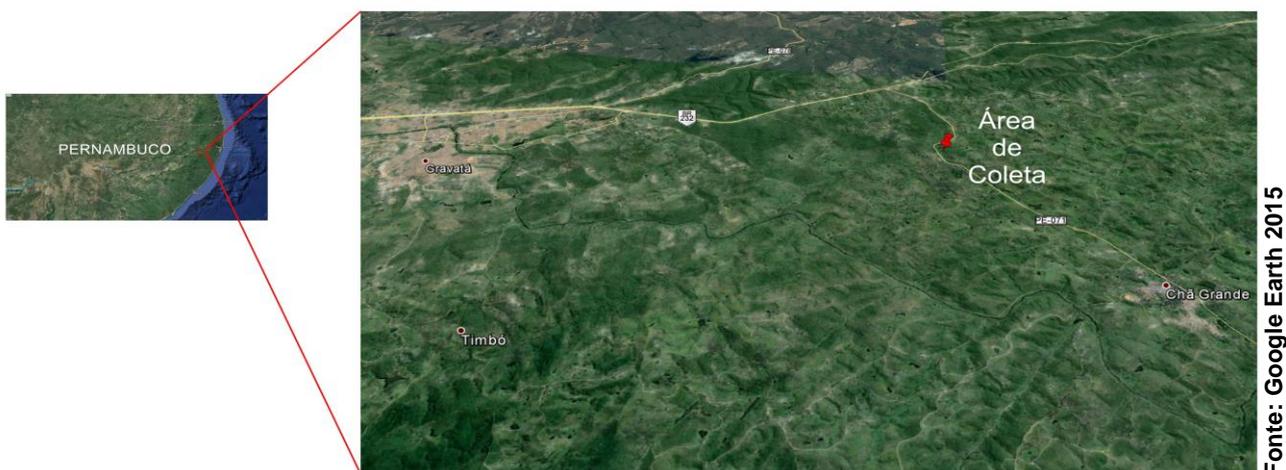


FIGURA 2.1 - Mapa do local onde foi realizada a coleta das amostras de *M. citrifolia*. Fonte: Google Earth 2015.

2.4.2 Padronização da densidade do inóculo

Os micro-organismos utilizados no estudo foram cepas liofilizadas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) obtidas da coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, as quais foram reativadas em meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) a temperatura de 35 °C por 24 horas. Para obtenção do inóculo bacteriano, foi preparada uma suspensão de células em solução salina 0,85 % padronizando-se a turbidez de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland (10^8 UFC/mL) segundo Bier (1981).



FIGURA 2.2 - Material vegetal obtido de plantas de *M. citrifolia*. A, B, C e D: casca, folha, raiz e semente, respectivamente.

2.4.3 Teste de atividade antibacteriana

O teste de atividade antibacteriana dos extratos de *M. citrifolia* foi realizado através do método de difusão em disco de papel de acordo com Bauer et al. (1966). Aliquotas dos extratos foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção das amostras na concentração de 150 mg/mL a serem utilizadas para os testes.

O inóculo bacteriano obtido foi distribuído uniformemente com o auxílio de

swabs esterilizados em placas de Petri contendo o meio Ágar Mueller-Hinton. Discos de papel foram impregnados com 20 µL na concentração de 150 mg/mL de cada extrato obtido e depositados nas placas de Petri. Foram utilizados como controle positivo os antibióticos de referência Norfloxacino (10 µg) e Cloranfenicol (30 µg) de acordo com a CLSI (2012).

Em seguida as placas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados e expressos em milímetros, sendo considerado o efeito antibacteriano positivo os halos de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (Silva et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Foi realizado o teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos por meio da técnica de microdiluição em caldo conforme o protocolo M7-A6 (CLSI, 2012). Para o teste, foi utilizada uma microplaca de 96 poços. Cada poço da placa recebeu 40 µL do inóculo, 80 µL do meio Caldo Mueller-Hinton e 30 µL das diluições seriadas (1:2 v/v) dos extratos brutos em concentrações finais que variaram de 30 a 1,875 mg/mL. Foi utilizada como controle positivo a mistura sem o extrato e como controle negativo a mistura sem a suspensão de células. A placa foi incubada com temperatura em torno de 37 °C por 24 horas. Posteriormente ao período de incubação, foram adicionados em cada poço da placa 20 µL de resazurina sódica a 0,01 % em solução aquosa esterilizada, e a placa foi reincubada por quatro horas. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados para determinar a menor concentração de cada extrato orgânico capaz de inibir o crescimento do micro-organismo testado. A resazurina permite a visualização da presença de crescimento bacteriano mais facilmente, uma vez que a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a cor vermelha indica presença de células viáveis em crescimento (Alves et al., 2008). Desse modo, a resazurina é um indicador de óxido-redução que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade de células microbianas (Montejano et al., 2005). A CMI foi definida como a menor concentração do antimicrobiano testado que inibiu completamente o crescimento microbiano. Alíquotas dos poços da placa de teste foram semeadas em

placa de Petri com Ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 24 horas. A menor concentração do extrato em que as cepas testadas não apresentaram capacidade de crescimento em Ágar Mueller-Hinton foi considerada como a concentração mínima bactericida (CMB).

2.4.5 Análise Cromatográfica

2.4.5.1 Cromatografia em Camada delgada (CCD)

Os ensaios em CCD foram realizados em placas de gel de sílica F_{-254nm} / Merck. A fase móvel utilizada era constituída de tolueno\dióxano\ácido acético (180:45:5 v/v/v), de acordo com a metodologia de Culberson (1972).

As bandas foram visualizadas por fluorescência em luz UV (254 e 365 nm) e como reveladores foram utilizados hidróxido de amônio e vanilina sulfúrica. Os valores de fator de retenção (Rf) das substâncias foram definidos e comparados com aqueles obtidos para as substâncias padrão: quercetina, cafeína e cumarina. Os padrões de quercetina e cafeína utilizados foram obtidos da Sigma, o padrão de cumarina utilizado foi um extrato metanólico de *Justicia pectoralis* que contém 1,2-benzopirona como cumarina (Fonseca et al., 2010). A planta *J. pectoralis* foi coletada no Jardim Didático do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. A obtenção dos extratos foi realizada seguindo a mesma metodologia utilizada para obtenção dos extratos de *M. citrifolia*, de acordo com Doughari & Manzara (2008).

Os extratos, foram diluídos em metanol espectroscópico (Grau HPLC) até uma concentração de 1,0 mg/mL, sendo aplicados à placa 20 µL das respectivas soluções e padrões.

2.4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE seguiram a metodologia de Legaz & Vicente (1983). Foi utilizado cromatógrafo líquido Thermo Fisher, modelo Ultmate 3000 acoplado a detector de UV com arranjo de Diodos (DAD), as leituras foram feitas a 254 nm, utilizando coluna de fase reversa C18. A fase móvel utilizada foi metanol/água, ácido acético (80:19,5:05, v/v/v), em sistema isocrático a temperatura de 21 °C.

Os extratos orgânicos da raiz de *M. citrifolia*, 0,1 mg /mL, foram diluídos em metanol espectroscópico. Os resultados foram avaliados mediante tempo de

retenção (TR) das substâncias na coluna e área dos picos cromatográficos, com comparação com os padrões de cafeína e quercetina.

2.4.5.3 Curva da concentração de quercetina

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução padrão de quercetina (1 mg/mL) dissolvida em metanol espectroscópico, foram realizadas diluições seriadas, sendo obtidas concentrações finais que variaram de 1 mg/mL a 0,0625 mg/mL. As leituras foram realizadas em CLAE e a curva analítica foi construída a partir do programa Microsoft Excel, no qual foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [$y = ax + b$] relacionando concentração de quercetina *versus* a área de cada pico observado.

2.4.6 Ensaio para determinação de saponinas

Para análise da presença de saponinas foi realizado o teste de afrogenicidade. O teste foi realizado por meio de aquecimento em placa de Petri, de 12 mL do extrato bruto seco em metanol, para eliminação do solvente. O produto resultante foi diluído em água destilada e colocado em tubo de ensaio, para posterior agitação manual (30 s) e repouso por aproximadamente duas horas (Costa, 2001). A presença de espuma persistente por mais de duas horas foi considerada como critério para determinar a presença de saponinas.

2.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

2.5.1 Rendimento dos extratos das partes vegetais de *M. citrifolia*

Os rendimentos dos extratos obtidos com os solventes de polaridade crescente ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol estão descritos na Tabela 2.1 Pôde-se observar que os extratos metanólicos apresentaram os maiores valores de rendimento, que foram de 16,42 %, 14,19 % e 13,80 %, valores bem maiores em relação aos dos extratos obtidos com os demais solventes, entre os quais, o maior valor foi de 10,66 % para o extrato obtido com etanol. A exceção foi o extrato da semente obtido com o metanol que apresentou valor de 1,81 %, foi o menor valor de rendimento em relação aos demais extratos da

semente obtidos com os outros solventes utilizados no estudo. Fato que pode ser associado à presença de compostos de maior polaridade nas diferentes partes de *M. citrifolia*, com exceção da semente.

TABELA 2.1 - Rendimento dos extratos obtidos de *M. citrifolia* com a utilização de diferentes solventes, a partir de 10g do material vegetal.

| Material vegetal | Solvente | Pesos (mg) | |
|------------------|------------------|------------|--------|
| | | EB | RE (%) |
| Casca | Ciclohexano | 150 | 1,50 |
| | Clorofórmio | 188 | 1,88 |
| | Acetato de etila | 102 | 1,02 |
| | Etanol | 354 | 3,54 |
| | Metanol | 1642 | 16,42 |
| Folha | Ciclohexano | 589 | 5,89 |
| | Clorofórmio | 727 | 7,27 |
| | Acetato de etila | 921 | 9,21 |
| | Etanol | 1066 | 10,66 |
| | Metanol | 1419 | 14,19 |
| Raiz | Ciclohexano | 155 | 1,55 |
| | Clorofórmio | 551 | 5,51 |
| | Acetato de etila | 259 | 2,59 |
| | Etanol | 438 | 4,38 |
| | Metanol | 1380 | 13,80 |
| Semente | Ciclohexano | 773 | 7,73 |
| | Clorofórmio | 814 | 8,14 |
| | Acetato de etila | 681 | 6,81 |
| | Etanol | 582 | 5,82 |
| | Metanol | 181 | 1,81 |

EB: extrato bruto; RE: rendimento.

2.5.2 Teste de atividade antibacteriana

Os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana estão apresentados na Tabela 2.2. Os extratos da planta não apresentaram ação frente a *E. coli*, porém, o crescimento de *S. aureus* foi inibido pelos extratos da raiz de *M. citrifolia* obtidos com os solventes acetato de etila, clorofórmio, ciclohexano e etanol. Esses resultados estão de acordo com Basri & Fan (2005) que afirmaram que extratos de plantas são geralmente mais ativos contra bactérias gram-positivas do que contra bactérias gram-negativas. Os autores associaram esse fato à presença da membrana externa das bactérias gram-negativas o que pode explicar este efeito de resistência.

Na Tabela 2.2 e Figura 2.3 são apresentados os dados de atividade inibitória dos extratos orgânicos testados contra o micro-organismo que se mostrou sensível. Pôde-se observar que o extrato da raiz obtido com acetato de etila apresentou o maior valor de halo de inibição com média de 15,3 mm; seguido pelo extrato clorofórmico que apresentou média de 14 mm, pelo extrato ciclohexânico com média de 13,3 mm e pelo extrato etanólico com média de 11,3 mm.

Nos trabalhos realizados por Jayaraman et al. (2008); Sunder et al. (2011) e Natheer et al. (2012) foi investigada a atividade antibacteriana de extratos de várias partes de *M. citrifolia* com a utilização de vários solventes. No estudo de Jayaraman et al. (2008) foi investigada a atividade antibacteriana de extratos do fruto de *M. citrifolia* obtidos com metanol, acetato de etila e hexano. Os extratos foram testados na inibição de cepas de bactérias, dentre elas *S. aureus* e *E. coli*. O extrato metanólico foi ativo contra todas as bactérias testadas, enquanto o extrato obtido com acetato de etila foi ativo contra a maioria das bactérias, exceto contra *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. O extrato hexânico foi ineficaz contra todas as bactérias testadas.

TABELA 2.2 - Atividade antibacteriana de extratos da raiz de *M. citrifolia* na inibição de *S. aureus*.

| Extratos | Zona de inibição (mm) |
|------------------|-----------------------|
| | Média ± desvio padrão |
| Ciclohexânico | 13,30 ± 0,57 |
| Clorofórmico | 14,00 ± 0,00 |
| Acetato de etila | 15,30 ± 0,57 |
| Etanólico | 11,30 ± 0,57 |

No trabalho realizado por Sunder et al. (2011) foi estudada a atividade antibacteriana de extratos do fruto, folha e semente de *M. citrifolia*, obtidos com metanol, clorofórmio e acetona na inibição de cinco bactérias, dentre elas *S. aureus* e *E. coli*. Todos os micro-organismos foram sensíveis aos extratos, porém os maiores de valores de inibição foram obtidos com o extrato metanólico da semente. Na pesquisa de Natheer et al. (2012) foi investigada a atividade antibacteriana de extratos do fruto, folha e casca de *M. citrifolia* obtidos com metanol, etanol e acetato de etila. Os extratos foram testados na inibição de 12 bactérias, dentre elas *S. aureus* e *E. coli*. A maioria dos extratos testados apresentou atividade antibacteriana. O extrato da folha obtido com metanol apresentou o maior valor de halo de inibição. Desse modo, em todos os trabalhos os extratos obtidos com

metanol apresentaram os melhores resultados, enquanto no presente trabalho os extratos obtidos com metanol não apresentaram atividade antibacteriana. No presente estudo a única parte vegetal que apresentou atividade antibacteriana foi a raiz, no entanto, nos trabalhos citados acima não foi estudada essa parte da planta.

No trabalho de Sibi et al. (2012) foram estudadas as propriedades antimicrobianas de extratos metanólicos da folha, caule e raiz de *M. citrifolia*. Os extratos das raízes e folhas apresentaram significativa atividade antimicrobiana e o extrato metanólico da raiz apresentou os melhores resultados, principalmente contra *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, porém também houve inibição significativa de *S. aureus* e *E. coli*. Fato que diverge dos resultados encontrados na presente pesquisa, onde o extrato metanólico da raiz de *M. citrifolia* não inibiu o crescimento de cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

O extrato metanólico da raiz apresentou um maior valor de rendimento em relação aos extratos da raiz obtidos com os demais solventes, porém, este extrato foi o único que não apresentou atividade antibacteriana frente à cepa de *S. aureus*. Diante disso, pode-se inferir que apesar de o extrato metanólico da raiz ter extraído maior quantidade de fitoconstituintes, estes podem não ser os componentes associados a atividade antibacteriana, enquanto o extrato obtido com acetato de etila, mesmo com menor valor de rendimento possivelmente carrega metabólitos secundários em quantidade suficiente para apresentar atividade antibacteriana, o que resultou nos maiores valores de halos de inibição. Fato que diverge da literatura, onde o metanol é referido como um solvente adequado para extração de fitoconstituintes da raiz de *M. citrifolia* associados a atividade antibacteriana. No entanto, de acordo com Silveira et al. (2011) deve-se considerar que o vegetal pode apresentar variação na sua composição em constituintes ativos, dependendo de diversos fatores, o que pode representar também variação na efetividade biológica. Enquanto Kashi et al. (2011) relataram que as amostras coletadas de origens geográficas diferentes, com diferentes climas e vegetações mostram diferentes atividades antibacterianas.

Essa variação na constituição fitoquímica do vegetal também pode influenciar na sua interação com o solvente utilizado para obtenção do extrato, o que pode acarretar resultados distintos nos trabalhos realizados com amostras provenientes de locais diferentes.

As cepas de *S. aureus* e *E. coli* apresentaram sensibilidade à ação dos

antibióticos de referência Norfloxacino e Cloranfenicol, de acordo com os valores preconizados pela CLSI (2012).

2.5.3 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de extratos da raiz de *M. citrifolia*

Quanto à concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos que apresentaram efeito antibacteriano positivo, com a adição da resazurina foi observada mudança de coloração para vermelho bastante evidente apenas no controle positivo, fato que indicou crescimento bacteriano. Nos demais poços da placa não foi possível perceber com clareza a mudança de coloração devido a forte pigmentação da raiz da noni, mesmo com a adição do corante específico para evidenciar crescimento bacteriano. No entanto, a partir do teste para determinação da CMB foi possível demonstrar em quais tratamentos ocorreu o crescimento do micro-organismo e em quais deles não houve crescimento.

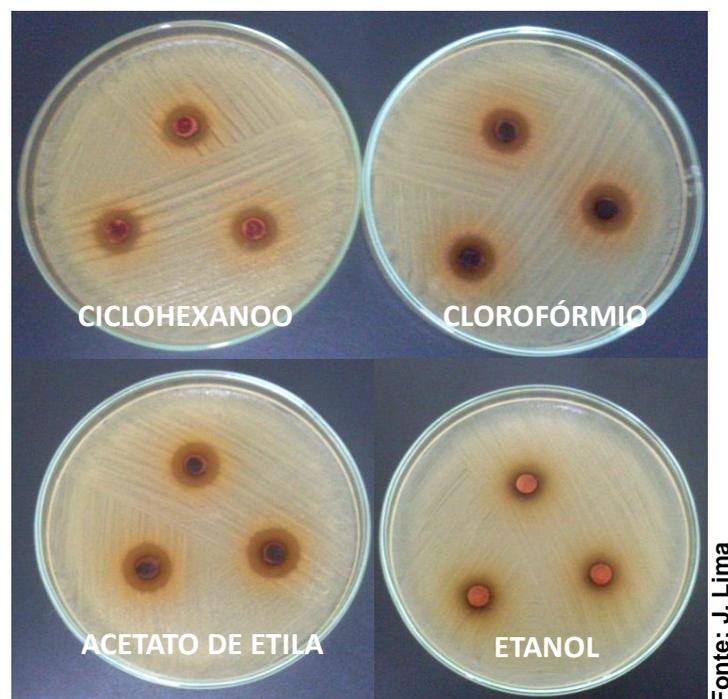


FIGURA 2.3 – Formação de halos de inibição do crescimento de *S. aureus* com a utilização de extratos da raiz de *M. citrifolia* obtidos com os solventes ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol.

Como resultado, verificou-se que houve crescimento bacteriano na maioria das diluições. Não houve crescimento celular com os extratos obtidos com acetato de etila e ciclohexano apenas nas concentrações de 30 mg/mL e 15 mg/mL, sendo definido 15 mg/mL como valor de CMB destes extratos. Enquanto que nos extratos obtidos com os solventes clorofórmio e etanol não houve crescimento bacteriano apenas na concentração de 30 mg/mL, valor definido como CMB destes extratos (Tabela 2.3).

TABELA 2.3 - Teste da Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos da raiz de *M. citrifolia* frente à cepa de *S. aureus*.

| Concentrações dos extratos (mg/mL) | Acetato de etila | Clorofórmio | Ciclohexano | Etanol |
|------------------------------------|------------------|-------------|-------------|--------|
| 30,000 | - | - | - | - |
| 15,000 | - | + | - | + |
| 7,500 | + | + | + | + |
| 3,750 | + | + | + | + |
| 1,875 | + | + | + | + |

+ Houve crescimento bacteriano
- Não houve crescimento bacteriano

Silveira et al. (2011) em estudo da atividade antibacteriana de frutos de *M. citrifolia*, realizaram teste de CMI através de macrodiluição e também relataram dificuldade para visualização dos resultados devido à intensidade na cor do material analisado, desse modo adicionaram 0,2 mL de cloridrato de trifeniltetrazólio (CTT) 2 %, para facilitar a visualização.

Dentre os estudos encontrados sobre a atividade antibacteriana de várias partes de *M. citrifolia*, apenas em um estudo foi analisada a atividade antibacteriana da raiz da noni e neste, não foram realizados testes de CMI e CMB, com isso, não foram encontrados dados na literatura para comparar os valores encontrados no presente estudo. Natheer et al. (2012) estudaram a atividade antibacteriana de extratos de frutos, folhas e caule de *M. citrifolia* obtidos com os solventes metanol, etanol e acetato de etila, na inibição de *S. aureus*, *E. coli* e outras bactérias. Houve inibição do crescimento dos micro-organismos testados e o extrato metanólico apresentou o melhor resultado. Determinaram o valor de 25 mg/mL como concentração mínima inibitória dos extratos do fruto, folha e casca de *M.*

citrifolia testados frente as cepas de *E. coli* e *S.aureus*. No estudo de Natheer et al. (2012) foi realizado apenas teste de CMI dos extratos que foi bem aproximado dos valores de CMB encontrados no presente trabalho com a raiz da planta.

No estudo de Candida et al. (2014), onde foi avaliada a atividade antibacteriana de extrato etanólico do fruto de *M. citrifolia* cultivados no sudeste do Brasil, o extrato etanólico apresentou atividade antibacteriana. *S. aureus* foi menos resistente em comparação a *E. coli*, e os valores de CMI na inibição dos micro-organismos foram 1 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente.

2.5.4 Análise Cromatográfica

2.5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O ensaio em CCD dos extratos da raiz de *M. citrifolia* revelou um padrão distinto de bandas. Com a utilização do revelador vanilina sulfúrica, foi possível observar três padrões de bandas com Rf de 0,72 e coloração amarelada, sugestivos da presença de flavonoides (Wagner & Bladt, 1996) nos extratos clorofórmico, etanólico e obtido com acetato de etila (Tabela 2.4), no entanto, as bandas sugestivas da presença de flavonoides não corresponderam ao padrão de quercetina utilizado (Rf 0,23), provavelmente pelo fato de se tratar de outro tipo de flavonoide. Esses resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com a literatura pelo fato de a presença de flavonóides na raiz da noni ser relatada por autores, a exemplo de Sibi et al. (2012). Enquanto Ikeda et al. (2009) também relataram a presença de cumarinas na raiz da noni.

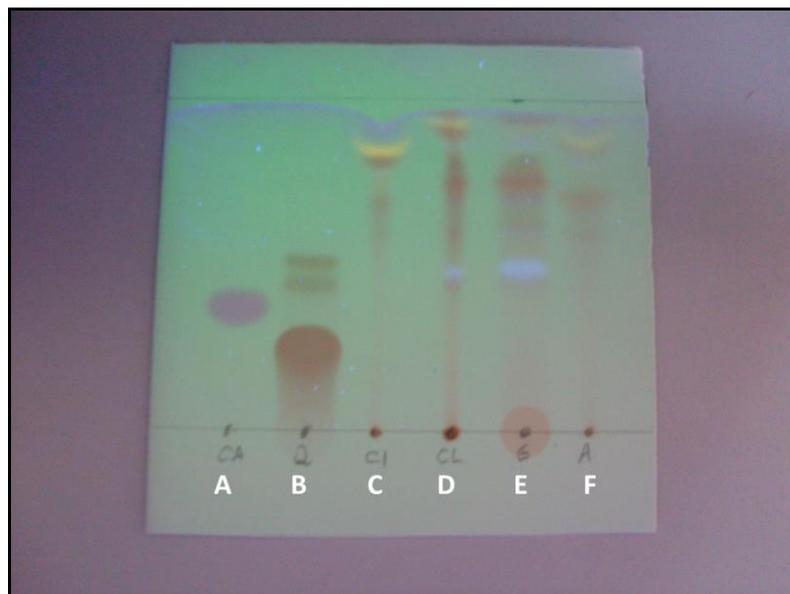
Os testes para detecção de cumarinas identificaram padrões de bandas de coloração azul brilhante, sugestivos da presença de cumarinas (Wagner & Bladt, 1996) nos extratos clorofórmico e etanólico da raiz de *M. citrifolia* (Tabela 2.4 e Figura 2.4) As bandas sugestivas da presença de cumarinas na noni apresentaram valores de Rf de 0,54, valor semelhante à banda correspondente a cumarina da *Justicia pectoralis* (Rf 0,52), porém não foram os mesmos valores, o que pode ser explicado pela existência de diferentes cumarinas na *Justicia pectoralis* e na *M. citrifolia*. Segundo Fonseca et al. (2010) e Leal et al. (2000) na *J. pectoralis* está presente a cumarina 1,2-benzopirona (Figura 2.5) e a umbeliferona (7-hidroxycumarina) (Figura 2.6). Enquanto na *M. citrifolia* foi realizada a quantificação dos derivados de cumarina tais como escopoletina (Figura 2.7), 4-hidroxycumarina (Figura 2.8) e umbeliferona (7-hidroxycumarina) (Figura 2.6), também

presente na *J. pectoralis* (Ikeda et al., 2009). Portanto é possível que as bandas observadas no extrato de noni, no presente trabalho, correspondam às cumarinas observadas para o vegetal por Ikeda et al. (2009), com exceção da umbeliferona que é comum nos dois vegetais. Segundo Deng et al. (2007) dentre os compostos isolados de *M. citrifolia*, a escopoletina, um derivado de cumarina, é um dos compostos mais representativos da planta e contribui para suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante. Fato que pode ser relacionado com a atividade antibacteriana observada no presente trabalho.

TABELA 2.4 - Resultado da avaliação fitoquímica em cromatografia de camada delgada dos extratos da raiz de *M. citrifolia* obtidos com diferentes solventes

| Metabólitos Secundários | Extratos da raiz de <i>M. citrifolia</i> | | | |
|-------------------------|--|-------------|-------------|--------|
| | Acetato de etila | Ciclohexano | Clorofórmio | Etanol |
| Flavonoides | + | - | + | + |
| Alcaloides | - | - | - | - |
| Cumarinas | - | - | + | + |

Legenda: (+) Presença do metabólito secundário
 (-) Ausência do metabólito secundário



Fonte: J. Lima

FIGURA 2.4 - Cromatografia em camada delgada observada em luz UV de 365nm demonstrando a presença de padrões de bandas de coloração azul brilhante, sugestivos da presença de cumarinas. A, B, C, D, E e F: padrão de cafeína, padrão de quercetina, extrato ciclohexânico, extrato clorofórmico, extrato etanólico e extrato obtido com acetato de etila, respectivamente.

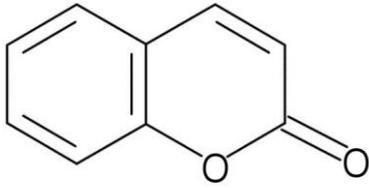


FIGURA 2.5 – Fórmula estrutural da coumarina 1,2-benzopirona

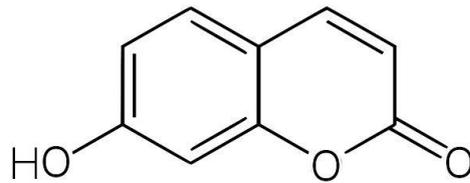


FIGURA 2.6 – Fórmula estrutural da coumarina umbeliferona (7-hidroxicoumarina)

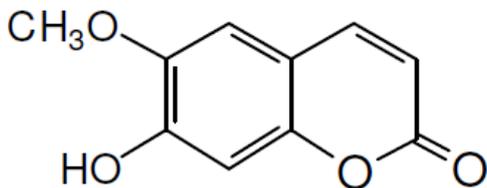


FIGURA 2.7 – Fórmula estrutural da coumarina escopoletina

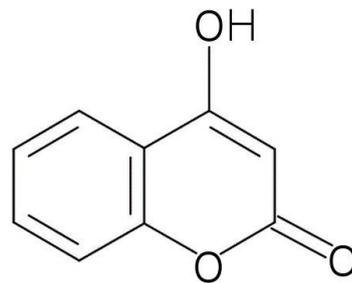


FIGURA 2.8 – Fórmula estrutural da coumarina 4- hidroxicoumarina

Diversos outros compostos não identificados foram observados na análise em CCD. No extrato ciclohexânico foram encontradas substâncias com os seguintes valores de fator de retenção (R_f): 0,63 e 0,77. No extrato clorofórmico foram encontradas substâncias com R_f de 0,69 e 0,86. No extrato etanólico pôde-se visualizar substâncias com R_f de 0,69. Enquanto no extrato obtido com acetato de etila foram encontradas substâncias com R_f de 0,65 e 0,83 (Figura 2.4).

Não foram encontradas bandas correspondentes ao padrão de cafeína utilizado. O valor de R_f da cafeína foi 0,29.

2.5.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Na análise em CLAE foram identificados padrões de picos distintos. No extrato obtido com acetato de etila foram revelados 11 picos, dois com maiores valores de área relativa, com tempos de retenção de 6,097 min e 9,497 min, além de dois menores com TR de 13,283 min e 13,597 min (Figura 2.9).

A análise do extrato clorofórmico revelou 11 picos, dois com maiores valores de área relativa, com tempos de retenção de 9,493 min e 2,720 min, além de três menores com TR de 21,167 min, 21,690 min; e 34,143 min (Figura 2.10).

Com o extrato ciclohexânico foram revelados 9 picos, dois com maiores valores de área relativa, com tempos de retenção de 8,393 min e 9,487 min, além de dois menores com TR de 21,677 min e 22,297 min (Figura 2.11).

A análise em CLAE do extrato etanólico revelou a presença de 14 picos, três com maiores valores de área relativa, com tempos de retenção de 3,397 min; 6,110 min e 2,710 min. Além de três menores com TR de 3,780 min; 18,113 min e 17,720 min. Foram identificados no extrato etanólico picos correspondentes a quercetina e cafeína (Figuras 2.12 e 2.13) O pico corresponde a quercetina apresentou tempo de retenção de 6,586 min. A concentração da quercetina foi de 0,050 mg/mL, obtida pelo cálculo através da curva de concentração de quercetina. O pico correspondente a cafeína apresentou tempo de retenção de 4,100 min (Figuras 2.12 e 2.13).

Nos demais extratos da raiz obtidos com acetato de etila, ciclohexano e clorofórmio não foram observados padrões de picos correspondentes a cafeína e quercetina.

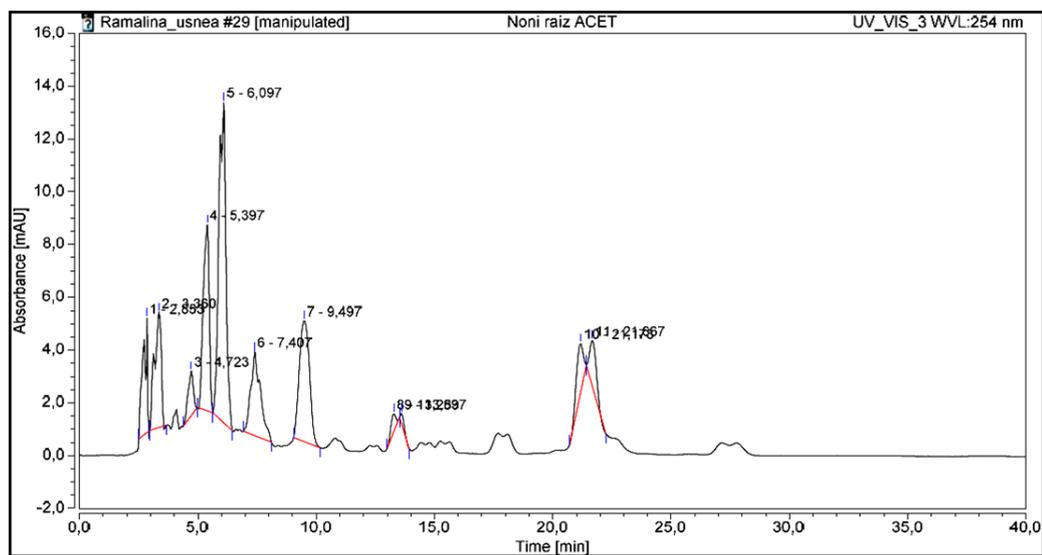


FIGURA 2.9 - Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de *M. citrifolia* obtido com acetato de etila.

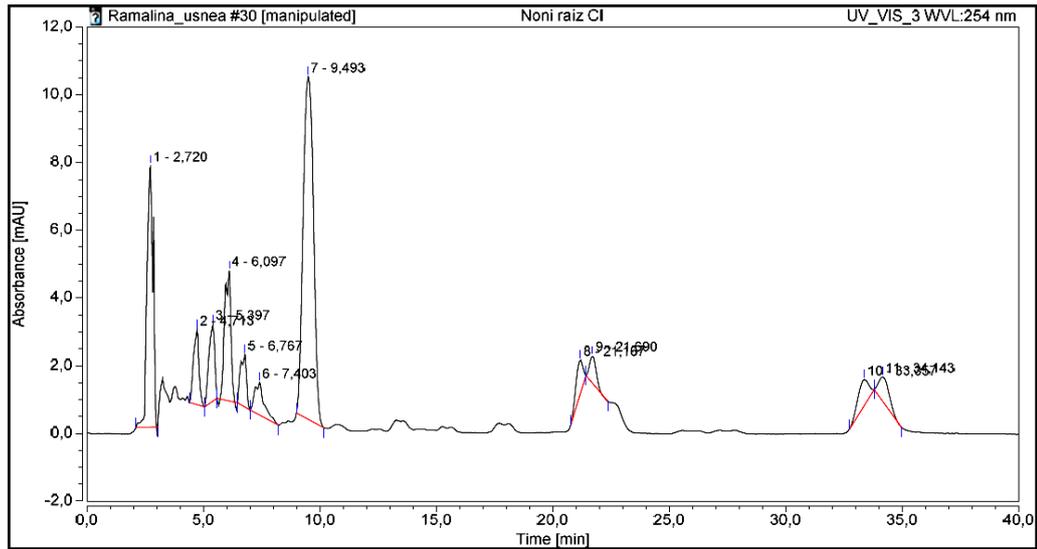


FIGURA 2.10 - Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de *M. citrifolia* obtido com clorofórmio.

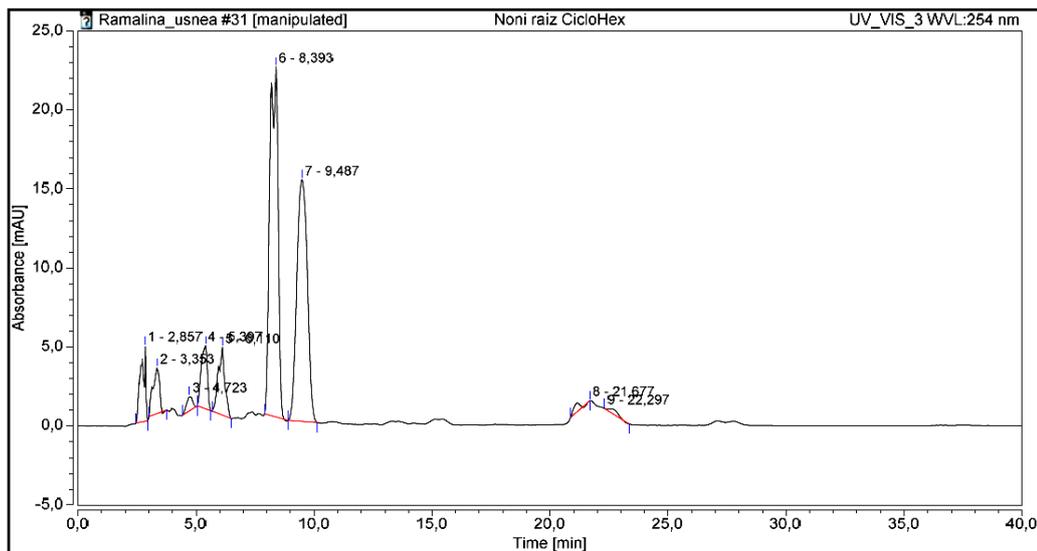


FIGURA 2.11 - Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de *M. citrifolia* obtido com ciclohexano.

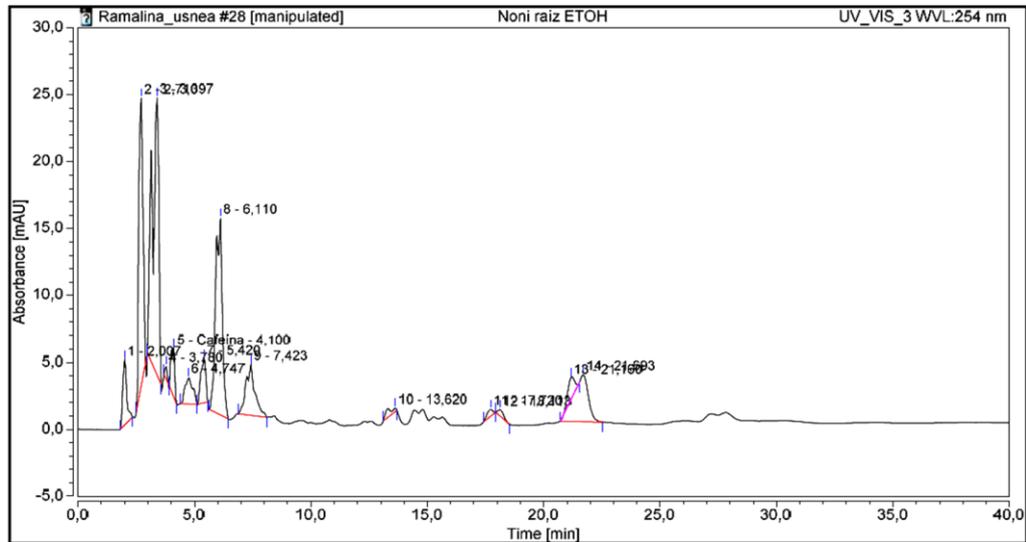


FIGURA 2.12 - Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de *M. citrifolia* obtido com etanol.

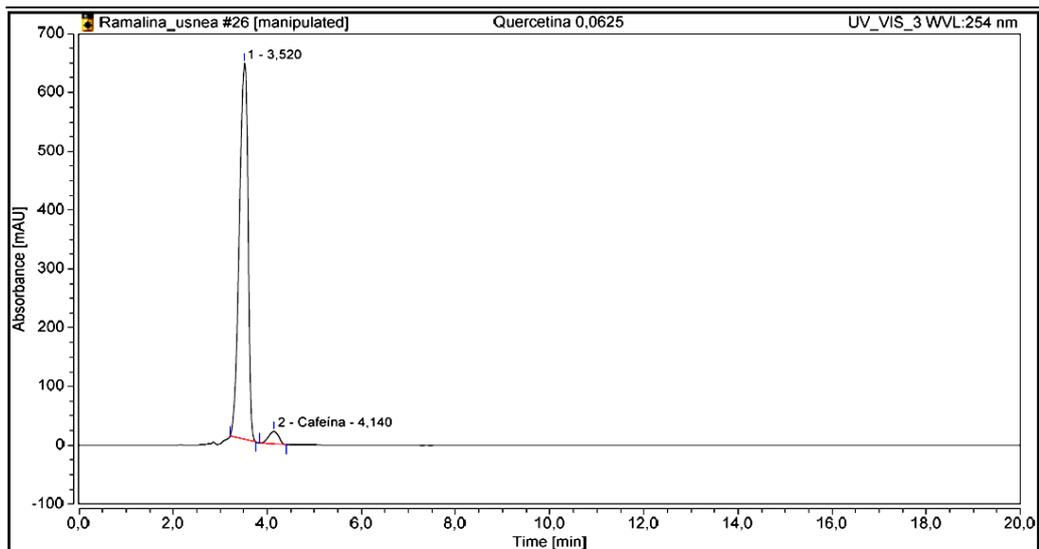


FIGURA 2.13 - Cromatograma em CLAE do extrato da raiz de *M. citrifolia* revelando padrões de picos correspondentes a presença de quercetina e cafeína.

No estudo desenvolvido por Deng et al. (2008), por meio de análise em CLAE, foi identificada a presença de quercetina em folhas de *M. citrifolia*, no entanto não foram encontrados estudos que relatassem a presença de quercetina na raiz da noni. Na literatura também não foi relatada a presença de cafeína em *M. citrifolia*.

Na análise em CCD foram identificadas bandas sugestivas da presença de flavonoides, porém estes não corresponderam ao padrão de quercetina utilizado, podendo-se inferir que seria outro tipo de flavonoide, porém em CLAE, foi observado pico correspondente ao TR da quercetina, possivelmente a análise em CCD não foi sensível a

presença deste composto. Contudo, sabe-se que existem diferentes tipos de flavonoides na noni como campferol (Deng et al., 2007) e a rutina (Wang et al.,1999; Sang et al.,2001) além de outros tipos. Da mesma forma, existem diferentes tipos de quercetina na noni como a Quercetina 3-O- β -D-glucopiranosídeo (Sang et al., 2002) e a Quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosídeo (Farine et al.,1996; Sang et al., 2002; Cardon , 2003; Wang e Su, 2001) entre outras.

2.5.4.3 Curva da concentração de quercetina

Foram obtidas diferentes concentrações do padrão de quercetina utilizado, estas foram analisadas em CLAE com objetivo de comparar as diferentes concentrações com as áreas de pico observadas (Tabela 2.5).

TABELA 2.5 – Relação entre a concentração de quercetina e a área de pico observada em CLAE.

| Concentração de Quercetina (mg/mL) | Área de Pico (mAU*min) |
|------------------------------------|------------------------|
| 0,0625 | 135,5510 |
| 0,1250 | 277,4170 |
| 0,2500 | 556,4870 |
| 0,5000 | 858,3620 |
| 1,0000 | 1650,9340 |

A partir dos valores de concentração de quercetina e dos picos cromatográficos encontrados, foi criada uma reta de regressão linear para determinar a relação existente entre a variável dependente (área de pico) e a variável independente (concentração de quercetina). Foi obtida a equação da reta $y = 1573,1x + 86,17$ e o coeficiente de correlação da reta que foi 0,99, valor que representa uma correlação fortíssima entre os dados analisados. (Figura 2.14).

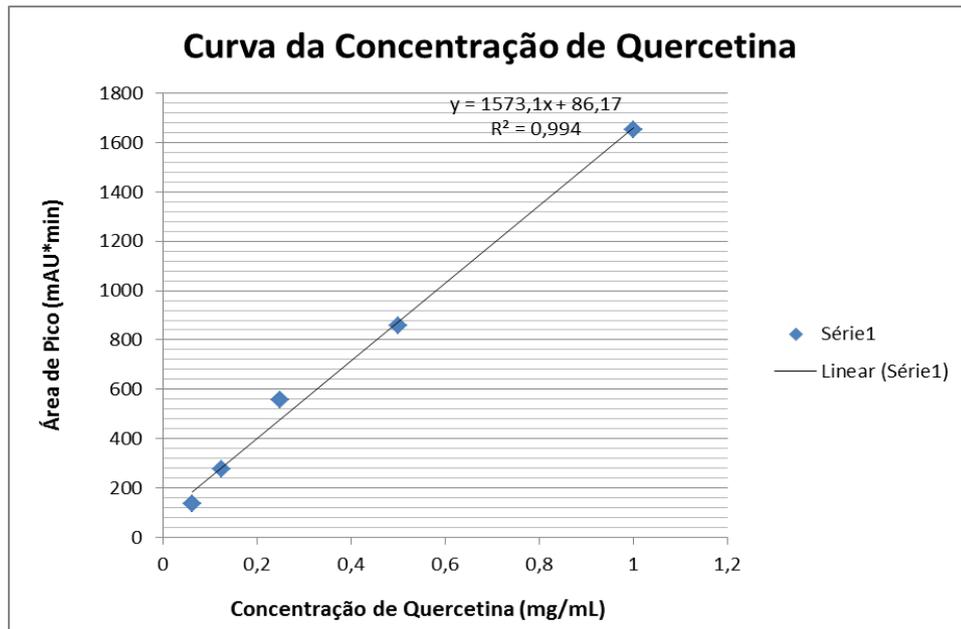


FIGURA 2.14 - Curva de calibração da quercetina (mg/mL), obtida para determinação dos teores de quercetina em extratos da raiz de *M. citrifolia*.

2.5.5 Teste de afrogenicidade

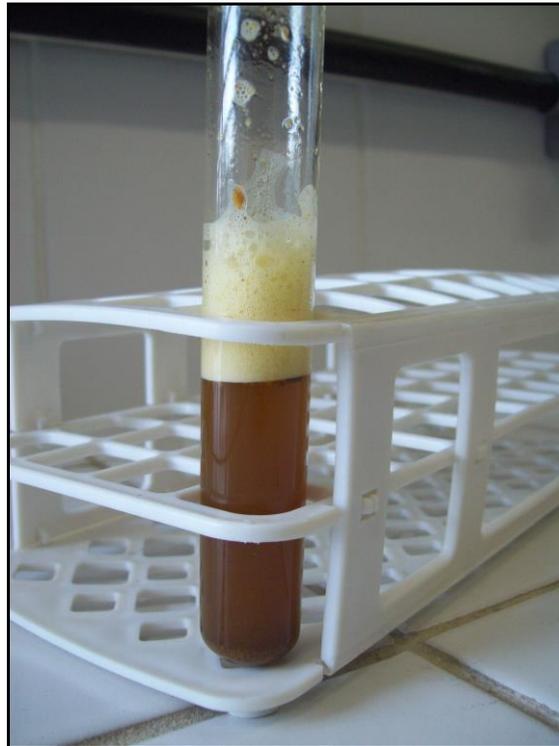
Com o teste de afrogenicidade foi detectada a presença de saponinas, pois foi observada a presença de espuma persistente por mais de duas horas nos extratos da raiz de *M. citrifolia* (Figura 2.15). A identificação desse composto pode estar diretamente relacionada à atividade antibacteriana, visto que a atividade antibacteriana e antifúngica de saponinas isoladas de plantas tem sido reportada por vários estudos (Campbell, 1995; Soetan et al., 2006; Barile et al., 2007). Entretanto segundo Soetan (2003), as saponinas apresentam ineficácia frente a bactérias gram-negativas devido à pobre penetração na membrana celular. Fato que está de acordo com os resultados do presente trabalho, pois foi confirmada a presença de saponinas e a atividade antibacteriana da noni, porém, os extratos foram ineficazes frente à bactéria gram-negativa. Sparg et al. (2004) também relatam sobre a propriedade antibacteriana de saponinas.

Outro composto identificado no presente estudo e que também tem sido referido na literatura como composto com atividade antibacteriana são as cumarinas, e exemplo do trabalho de Duncan et al. (1998). De acordo com Borges et al. (2005) as cumarinas apresentam propriedades antibacterianas e são efetivas contra bactérias gram-positivas, incluindo espécies de *Staphylococcus*. Fato que está de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, onde a cepa de *S. aureus* foi inibida por extratos da raiz de *M. citrifolia*.

Os flavonoides também tem sido relatados na literatura como agentes antibacterianos, a exemplo de Linuma et al. (1994). Menezes (2005) também se referem aos flavonoides como agentes antibacterianos. Cushnie & Lamb (2005) se referem aos flavonoides como compostos com várias atividades biológicas, dentre elas atividade antibacteriana. Os autores também citam a quercetina como um tipo de flavonoide capaz de inibir o crescimento bacteriano. Camargo & Raddi (2008) também relatam a atividade antibacteriana da quercetina. No entanto Behling et al. (2004) afirmam que dentre as atividades biológicas da quercetina destacam-se o potencial antioxidante e anticarcinogênico. Sendo esse composto associado principalmente a essas propriedades.

Pruthviraj et al. (2011) afirmam que a cafeína é um alcaloide largamente aceito e utilizado como um estimulante do sistema nervoso central devido ao seu efeito vasoconstritor, no entanto, mesmo sendo esta sua atividade biológica mais conhecida, a cafeína também possui atividade antimicrobiana e antioxidante. É possível que possa haver alguma relação entre a atividade antibacteriana descrita no presente trabalho e a presença de cafeína, porém este fato precisa ser analisado, além disso, foram identificadas substâncias na *M. citrifolia* com atividade antibacteriana bastante conhecida e discutida na literatura, as quais poderiam ser as prováveis responsáveis pela propriedade encontrada, no entanto, também não se pode descartar a existência de efeito sinérgico entre diferentes substâncias com propriedade antibacteriana, fato que precisa ser estudado posteriormente.

A atividade antibacteriana observada também poderia estar relacionada a outros metabólitos secundários existentes na noni que não foram identificados no presente trabalho, visto que existem vários estudos que identificaram outras classes de compostos bioativos, como no trabalho de Sibi et al. (2012) que realizaram uma análise dos fitoconstituintes presentes na raiz de *M. citrifolia* e verificaram a presença de fenóis, taninos, esteroides e glicosídeos, além da presença de flavonoides e saponinas que também foram identificados no presente trabalho.



Fonte: J. Lima

FIGURA 2.15 – Teste da presença de saponinas, com espuma persistente por mais de duas horas, confirmando a presença do composto.

No presente estudo foram verificados na raiz de *M. citrifolia*, picos sugestivos da presença de cafeína que é um alcaloide. No entanto, na literatura não foram encontrados dados referentes a presença de cafeína em *M. citrifolia*. As divergências observadas em relação aos resultados do presente estudo e os resultados encontrados na literatura podem ser atribuídas a diferenças que possam existir na constituição fitoquímica da *M. citrifolia* cultivada no Brasil, bem como nos demais países aonde as pesquisas com a noni vêm sendo realizadas. Sabe-se que diferenças climáticas podem interferir na produção dos metabólitos secundários das plantas tanto qualitativamente quanto quantitativamente. A atividade antibacteriana depende da parte da planta, sendo a eficiência influenciada pelo solvente usado na extração, que por sua vez está relacionado às classes de compostos bioativos presentes.

Diante da comprovação da atividade antibacteriana da raiz de *M. citrifolia* cultivada na Zona da Mata de Pernambuco, os resultados obtidos com este trabalho podem ser promissores para posteriores estudos com objetivo de avaliar os extratos como conservantes naturais para alimentos de forma que possam, porventura, substituir conservantes sintéticos e o grande teor de sódio que é adicionado aos alimentos

processados e que tem se tornado um fato preocupante com relação a saúde da população.

Desse modo, conclui-se que extratos da raiz de *M. citrifolia* apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, sendo a seguinte ordem quanto a eficiência da ação: Extrato obtido com acetato de etila > extrato clorofórmico > extrato ciclohexânico > extrato etanólico. Sugere-se a participação dos compostos identificados pelos métodos cromatográficos na atividade antibacteriana, mas outros estudos são necessários para a devida associação de metabólitos secundários com a atividade antibacteriana dos extratos da raiz de *M. citrifolia*.

2.6 Referências Bibliográficas

- ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1224-1229, 2008.
- ANDRADA, J.M.L.C. et al. Hepatotoxicidad grave asociada al consume de Noni (*Morinda citrifolia*). **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v.99, n.3, p.179-181, 2007.
- BARILE, E. et al. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**, v.68, n.5, p.596-603, 2007.
- BASRI, D.F.; FAN, S.H. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n.1, p. 26-29, 2005.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- BEHLING, E.B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BIER, O. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene**. 21^a ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1981. 709 p.
- BORGES, F. et al. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.887-916, 2005.
- CAMARGO, M.S; RADDI, M.S.G. Efeito da quercetina sobre o crescimento e atividade hemolítica de *Staphylococcus aureus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.71 – 78, 2008. Disponível em: <http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/12366>. Acesso em: 26 mar. 2015.
- CAMPBELL, J.B. Saponins. In: (Stewart-Tull, D. E. S., ed.), WILEY, J. **The theory and practical application of adjuvants**. Chichester, 1995. p. 95–127.
- CANDIDA, T. et al. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.29, n.2, p.10-14, 2014.
- CARDON, D. **Le monde des teintures naturelles**. Éditions Belin, Paris. 2003
- CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, n.2, p.95-101, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11, 2012.

- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 992p.
- CULBERSON, C.F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v.72, p.113-125, 1972.
- CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids.** Int J Antimicrob Agents. v.26, n.5, p.343-56, 2005.
- DENG, S. et al. Lipoxigenase inhibitory constituents of the fruits of Noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. **Journal of Natural Products**, v.70, p.859-862, 2007.
- DENG, S.; WEST, B.J.; JENSEN, C.J. Simultaneous characterisation and quantitation of flavonol glycosides and aglycones in noni leaves using a validated HPLC-UV/MS method. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p.526–529, 2008.
- DOUGHARI, J.; MANZARA, S. In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p.067-072, 2008.
- DUNCAN, S.H.; FLINT, H.J.; STEWART, C.S. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* 0157 mediated by dietary plant metabolites. **FEMS Microbiology Letters**, v.164, p.283-58, 1998.
- FALEIRO, M.L. The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas A (Ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Formatex Research Center, p. 1143-1156, 2011.
- FARINE, J.P. et al. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. **Phytochemistry**, v.41, p.433–438, 1996.
- FONSECA, F.N.; SILVA, A.H.; LEAL, L.K.A.M. *Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analyses by HPLC-PDA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.871-7, 2010.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n.12, p.1-24, 2012.
- IINUMA, M. et al. Flavanones with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 892-895, 1994.
- IKEDA, R. et al. Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v.113, p.1169–1172, 2009.
- JAYARAMAN, S.K.; MANOHARAN, M.S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal of Integrative Biology**, v.3, n.1, p.44-49, 2008.
- KASHI, T.S.J. et al. Evaluating the *in-vitro* antibacterial effects of Iranian propolis on oral microorganisms. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n.2, p.363-368, 2011.
- LEAL, L.K. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J Ethnopharmacol**, v.70, p.151-159, 2000.
- LEGAZ, M.E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiology**, v.71, p. 300-302, 1983.
- LORENZI, H.F.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Ed: Nova Odessa, São Paulo, 2002. 512p.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.405-411, 2005.

- MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.17, n.4, p.445-447, 2005.
- MONTEJANO, H.A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S.G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v.64, n.2, p.117–124, 2005.
- NATHEER, S.E. et al. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.6, n.11, p.783-788, 2012.
- PRUTHIVIRAJ, P. et al. Evaluation of antibacterial activity of caffeine. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v.2, n.4, p.1354-1357, 2011.
- SANG, S. et al. Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.4478–4481, 2001.
- SANG, S. et al. 2002. Chemical components in Noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). In: Ho, C.T.; Zheng, Q.Y. (Eds.), **Quality Management of Nutraceuticals. ASC Symposium Series 803, American Chemistry Society**, Washington, DC, 2002. p. 134–150.
- SIBI, G. et al. Phytoconstituents and their influence on antimicrobial properties of *Morinda citrifolia* L. **Research Journal of Medicinal Plant**, v.6, n.6, p.441-448, 2012.
- SILVA N.C.C.; FERNANDES, J.A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16, n.3, p.402-13, 2010.
- SILVA, J.G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.572-577, 2007.
- SILVEIRA, L.M.S. et al. Atividade antibacteriana de amostras de fruto do noni (*Morinda citrifolia* L. - *Rubiaceae*) vendidas em feiras livres de São Luís, Maranhão. **Revista Saúde & Ciência**, v.2, n.1, p.31-37, 2011.
- SOETAN, K. O. **Evaluation of some pharmaceutical and haematological activities of saponins in guinea corn (*Sorghum bicolor* L Moench)**. 2003. M.Sc Dissertation, Department of Biochemistry, College of Medicine, University of Ibadan.
- SOETAN, K. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.2405-2407, 2006.
- SPARG, S.G.; LIGHAT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.
- STADLBAUER, V. et al. Hepatotoxicity of Noni juice: Report of two cases. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n.30, p.4758-4760, 2005.
- SUNDER, J. et al. Antibacterial Activity in Solvent Extract of Different Parts of *Morinda citrifolia*. **Plant. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, n.8, p.1404-1407, 2011.
- VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.27, n.1, p.1-7, 2006.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer Verlag, 1996. 385p.
- WANG, M.; et al. Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.4880–4882, 1999.
- WANG, M.Y.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, p.161–168, 2001.
- YÜCE, B. et al. Hepatitis induced by Noni juice from *Morinda citrifolia*: a rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? **Digestion**, v.73, n.2-3, p.167-170, 2006.

ZINK, D.L. The impact of consumer demands and trends on food processing. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.3, p.467–469, 1997.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A utilização de plantas no tratamento de enfermidades humanas é uma prática antiga realizada pela sociedade. Diante da comprovação de atividade antibacteriana em espécies vegetais, sua utilização na conservação de alimentos pode ser um fato promissor para a indústria de alimentos. Segundo Ribeiro et al. (2012) diversos micro-organismos podem ser veiculados por alimentos causando doenças nos seres humanos. Diante disso, a utilização de extratos vegetais para elaboração de conservantes naturais para alimentos é uma opção atraente que poderá substituir o uso dos conservantes sintéticos (HYLDGAARD et al., 2012). Tal situação aumentou o interesse no uso de compostos antimicrobianos naturais tais como extratos de especiarias e ervas para a conservação de alimentos (SHAN et al., 2007). Com isso, esse trabalho foi planejado com o propósito de avaliar a atividade antibacteriana de extratos de várias partes de *M. citrifolia* na inibição de *S. aureus* e *E. coli*, comumente associados a contaminação de alimentos. A grande vantagem da utilização destes extratos naturais é o seu baixo custo, o que pode contribuir para a diminuição do elevado gasto com a elaboração de conservantes sintéticos para alimentos. Com os resultados obtidos no presente estudo foi possível detectar atividade antibacteriana de extratos da raiz de *M. citrifolia* na inibição do crescimento de cepas de *S. aureus*. Foi observada atividade de inibição nos extratos obtidos com acetato de etila, ciclohexano, clorofórmio e etanol. O extrato obtido com acetato de etila apresentou os maiores valores de halos de inibição, fato que demonstra que esse extrato é o mais eficaz para o desenvolvimento de conservantes naturais. Foi detectada a presença de saponinas nos extratos da raiz por meio do teste de afrogenicidade e com as análises em CCD detectou-se a presença de bandas sugestivas da presença de flavonoides nos extratos clorofórmico, etanólico e obtido com acetato de etila e cumarinas nos extratos clorofórmico e etanólico. Na análise em CLAE, foram identificados picos correspondentes a presença de quercetina e cafeína no extrato etanólico. Pode-se fazer uma associação entre a presença dessas substâncias e a atividade biológica observada nos extratos, pois as substâncias identificadas são referidas na literatura como agentes antibacterianos. (Campbell, 1995; Duncan et al., 1998; Menezes, 2005; Camargo e Raddi, 2008; Ibrahim et al., 2006)

O resultado de inibição da cepa de *S. aureus* foi bastante promissor para o possível emprego da planta no desenvolvimento de conservantes naturais para prevenir a contaminação por esse micro-organismo. De acordo com Zecconi e Hahn (2000) *S. aureus* desempenha importante papel na epidemiologia de doenças veiculadas por alimentos, pois produz toxinas termorresistentes causadoras de gastroenterites alimentares no ser humano, e ainda possui fatores de virulência que conferem alta resistência aos antimicrobianos. No que se refere às características das toxinas produzidas por *S. aureus*. As enterotoxinas produzidas pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas produzidas tanto por bactérias do gênero *Staphylococcus*, como *Streptococcus*. Estas toxinas podem causar choque tóxico e estão comumente associadas com intoxicações alimentares e diversas formas de alergias e doenças autoimunes (BALABAN; RASOOLY, 2000).

A produção de toxinas termorresistentes aumenta muito o risco de contaminação por esse patógeno, pois mesmo com o emprego de tratamentos térmicos, métodos bastante utilizados na indústria de alimentos, corre-se o risco de não ser suficiente para eliminar as toxinas presentes, o que representa extremo perigo para a saúde do consumidor. De acordo com Almeida et al. (1998) a maior preocupação quanto à sua presença incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de toxinas resistentes à pasteurização. Enquanto as células de *S. aureus* são termolábeis e facilmente eliminadas por processos moderados de temperatura, as enterotoxinas são termoestáveis e resistentes a temperaturas elevadas (FREITAS; MAGALHÃES, 1990). Mesmo com o fato de ser quase incomum a fatalidade de intoxicação alimentar por *S. aureus*, ela ocorre ocasionalmente em indivíduos debilitados imunologicamente, idosos e crianças em tenra idade (GONÇALVES; FRANCO, 1996). As toxinas produzidas por *S. aureus* são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (JAY, 1994). Fato que eleva consideravelmente o risco de intoxicação alimentar pelo consumidor. Diante disso, percebe-se a importância na busca por métodos que possam prevenir a contaminação dos alimentos por esse micro-organismo e desse modo, evitar a formação de toxinas em alimentos industrializados.

Com os resultados encontrados no presente estudo, pôde-se concluir que:

- Os extratos obtidos com os solventes acetato de etila, ciclohexano, clorofórmio e etanol, da raiz da planta *M. citrifolia*, cultivada na Zona da Mata de Pernambuco, apresentaram atividade antibacteriana frente à cepa de *S. aureus*.

- O extrato obtido com acetato de etila foi o mais ativo na inibição da cepa testada enquanto o extrato etanólico foi o menos ativo.
- Foi verificada a presença de saponinas com o teste de afrogenicidade
- Foi identificada a presença de quercetina e cafeína com as análises em CLAE.
- Foram identificados padrões distintos de bandas sugestivos da presença de flavonoides e cumarinas com as análise em CCD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAC, F. R.; SILVA, I. S. Estudo da ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite humano ordenhado. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 8-12 de julho de 1998. Brasília (DF), 1998. p. 10.

ANDRADA, J. M. L.C. et al. Hepatotoxicidad grave asociada al consume de noni (*Morinda citrifolia*). *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, v. 99, n. 3, p. 179-181, 2007.

ATKINSON, N. Antibacterial substances from flowering plants: Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. *Australian Journal of Experimental Biology*, v. 34, p. 17–26, 1956.

AVATO, P. et al. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure activity relationship. *Phytotherapy research*, v. 20, n. 6, p. 454-457, 2006.

AIYELAAGBE, O. O. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. *Fitoterapia*, v. 72, p. 544-546, 2001.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcal enterotoxins: a review. International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 1-10, 2000.

BARILE, E. et al. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, v. 68, p. 596–603, 2007.

BARROS, S. P. N. *Caracterização química e bioquímica da polpa e produtos de noni (Morinda citrifolia L.)*. 2009. 87p. Dissertação de mestrado - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2009.

BERGAMASCHI, K. B. *Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento*. 2010. 96p. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, constante do anexo desta Portaria. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 3 de dezembro, de 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96fa548047458ef597fdd73fbc4c6735/RESOLUCAO_16_1999.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 27 set. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 18 de março de 2004. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>> Acesso em: 29 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 278, de 22 de setembro de 2005. Aprova as categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro. DOU. Diário Oficial da União, Poder executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3f22438047457bfe88cedc3fbc4c6735/RDC_278_2005.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 27 set. 2014.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Informe técnico nº 25, de 29 de maio de 2007. Esclarecimentos sobre a comercialização do suco de fruta noni (*Morinda citrifolia*). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Informes+Tecnicos>> Acesso em: 27 set. 2014

- BUSHNELL, O. A.; FUKUDA, M.; MAKINODIAN, T. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. *Pacific Science*, v. 4, p. 167–183, 1950.
- CAMARGO, M. S; RADDI, M. S. G. Efeito da quercetina sobre o crescimento e atividade hemolítica de *Staphylococcus aureus*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 71-78, 2008.
- CAMPBELL, J. B. Saponins. In: Stewart-Tull, D. E. S. *The theory and practical application of adjuvants*. Wiley, Chichester, 1995. p. 95–127.
- CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção Alimentar por *Salmonella* spp. *Revista do Instituto da Ciência e da Saúde*, v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006.
- CHAN-BLANCO, Y. et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 645–654, 2006.
- COSTA, A. B. *Atividade antioxidante in vitro e antifúngica do noni (Morinda citrifolia L.)*. 2011. 86p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2011.
- DAVIES, C.; MUGGLESTONE, C. A single centre, double-blind, three dose level, parallel group, placebo controlled safety study with Tahitian Noni_Juice in healthy subjects (study nr 5124). Surrey, UK: BIBRA International Ltd. 2003.
- DENG, S. et al. Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 859-862, 2007.
- DESHMUKH, S. R. et al. Tissue specific expression of Anthraquinones, flavonoids and phenolics in leaf, fruit and root suspension cultures of Indian Mulberry (*Morinda citrifolia* L.). *Plant Omics Journal*, v. 4, n. 1, p. 6-13, 2011.
- DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3 ed, Chichester: John Wiley & Sons, 2009. Cap.5, p.187-306.
- DITTMAR, A. *Morinda citrifolia* L. - Use in indigenous Samoan medicine. *Journal of Herbs, Spices and Medicine Plants*, v. 1, p. 77–92, 1993.

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

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.; STEWART, C. S. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* 0157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiol Lett*, v. 164, p. 283-58, 1998.

EUROPEAN COMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE OF FOOD. *Opinion of the Scientific Committee on Food of Tahitian Nonis Juice*. SCF/CS/ DOS/18 ADD 2. Belgium, 2002.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas A (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex Research Center, p. 1143-1156, 2011.

FEIJÓ, A. M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. 1, p. 50-56, 2012.

FRANCHI, L. P. et al. Ausência de efeito tóxico-genético de *Morinda citrifolia* (NONI) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 5, n. 3, p. 46-53, 2008. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/5371/4419>> Acesso em: 29 dez. 2014.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-319, 1990.

FUEYO, J. M; MENDOZA, M. C; MARTIN, M. C. Enterotoxins and toxic shock síndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetics findings. *Microbes and infection*, v. 7, p. 187-194, 2005.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. Coliformes fecais, *Salmonela* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 3, n. 1, p. 5-9, 1996.

HEINICKE, R. M. The pharmacologically active ingredient of noni. *Pacific Tropical Botanical Garden Bulletin*, v. 15, p. 10-14, 1985.

- HIRAMATSU, T. et al. Induction of normal phenotypes in RAS transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Letters*, v. 73, p. 161-166, 1993.
- HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytotherapy Research*, v. 13, p. 380–387, 1999.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.
- IBRAHIM, S. A. et al. Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chemistry*, v. 99, p. 645-650, 2006.
- JAY, J. M. *Microbiología moderna de los alimentos*. Zagarosa: Acribia, 1994. 804 p.
- JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *International Journal of Integrative Biology*, v. 3, n. 1, p. 44-49, 2008.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. Plantas Mediciniais: Cura Segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- KAABER K. TAHITIAN NONI® Juice: active systemic anaphylaxis test in the guinea pig. Scantox BiologiskLaboratorium A/S, DK-426, Lille Skensved, Denmark, 2000.
- KAMIYA, K. et al. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 52, p. 5843-5848, 2004.
- KAMIYA, K. et al. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*, v. 118, p. 725-730, 2010.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.
- KONOWALCHUK, J. et al. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infection and Immunity*, v. 20, p. 575-577, 1978.

KRISHNAIAH, D.; NITHYANANDAM, R.; SARBATLY, R. Phytochemical constituents and activities of *Morinda citrifolia* L. In: *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*, Dr VENKETESHWER RAO (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, 2012. p. 127-150. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/phytochemical-constituents-and-activities-of-morinda-citrifolia-l>> Acesso em: mar. 2014.

KUMAR, K. T. et al. Evaluation of Antibacterial, Antifungal and Anthelmintic Activity of *Morinda citrifolia* L. (noni). *International Journal of PharmTech Research*, v. 2, n. 2, p. 1030-1032, 2010.

LEVAND, O.; LARSON, H.O. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, v. 36, n. 2, p. 186-187, 1979.

LI, R. W. et al. A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 85, n. 1, p. 25-32, 2003.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, p. 47-65, 1999.

LOCHER, C. P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, n. 1, p. 23-32, 1995.

LOPES, L. C.; ALMEIDA, J. V. P. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da fruta *Morinda citrifolia* L. (noni) em cepas de *S. aureus* e *E. coli*. *Higiene Alimentar*, v. 25, p. 162-169, 2011.

MASUDA, M. et al. Inhibitory effects of constituents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. *Journal Natural of Medicine*, v. 63, n. 3, p. 267-273, 2009.

McCLATHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Integrative Cancer Therapies*, v. 1, n. 2, p. 110-20, 2002.

McKOY, M. G.; THOMAS, E. A.; SIMON, O. R. Preliminary Investigation of the Antiinflammatory Properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (noni). *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, v. 45, p. 76-78, 2002.

- MENDONÇA, R. C. S. Patógenos na indústria de carnes e derivados. In: MENDONÇA, R. C. S. et al. *Qualidade e segurança na produção e consumo*. Viçosa: Gráfica Universitária, 2003. p. 21-48.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, p. 405-411, 2005.
- MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; Ito, K. (Eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). Washington, DC: American Public Health Association, 2001. p. 331-341.
- MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a noni preparation (*Morinda citrifolia*). *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 17, n. 4, p. 445-447, 2005.
- MITHEN, R. F. et al. The Nutritional Significance and Bioavailability of Glucosinolates in Human Foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 967-984, 2000.
- MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v. 72, p. 145-171, 2001.
- MÜLLER, J. C. *Toxicidade reprodutiva da Morinda citrifolia Linn*. 2007. 88p. Dissertação de mestrado, Pós-graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.
- NATHEER, S. E. et al. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, n. 11, p. 783-788, 2012.
- NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009.
- NELSON, S. C; ELEVITCH, C. R. *Noni: the complete guide for consumers and growers*. Permanent Agriculture Resources, Holualoa-Hawaii, 2006. 104p.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Ginebra, 2002. 67 p.

- PASSOS, E. C. et al. Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, São Paulo/Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 67, n. 3, p. 237-240, 2008.
- PAWLUS, A. D.; KINGHORN, A. D. Review of ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, n. 12, p. 1587-1609, 2007.
- PRASHANTH, D.; ASHA, M. K. AMIT, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 171-173, 2001.
- PRODUCT SAFETY LABS (PSL). Acute oral toxicity study in rats - limit test: Tahitian Noni puree. Product Safety Labs (Eurofins Scientific, Inc.), East Brunswick, New Jersey, US, 1999.
- RADDI, M. S. G; LEITE, C. Q. F; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus* : portadores entre manipuladores de alimentos. *Revista de Saúde Pública*, v. 22, n. 1, p. 36-40, 1988.
- REIS, R. M.; CARNEIRO, L. C. Indicador higiênico-parasitário em manipuladores de alimentos em morrinhos, Go. *Estudos de biologia*, v. 29, p. 313-317, 2007.
- RIBEIRO, D. S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Ciências Agrárias*, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.
- RIDZWAN, B. H. et al. The effect of *Morinda citrifolia* on isolated rat hearts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 5, n. 10, p. 1094-1097, 2002.
- SALUDES, J. P. et al. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). *Phytotherapeutic Research*, v. 16, n. 7, p. 683-685, 2002.
- SARTORI, C. J. *Avaliação dos Teores de Compostos Fenólicos nas Cascas de Anadenanthera peregrina (Angico-vermelho)*. 2012. 94 p. Dissertação de mestrado, Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira – Universidade Federal de Lavras. 2012.
- SCOTLAND, S. M. et al. Cytotoxic. Enteropathogenic Escherichia Coli. *Lancet*, v. 315, p. 90, 1980.
- SELVAM, P. et al. Antimicrobial Activity of Fruit Extracts of *Morinda citrifolia*. *Journal of Applied Chemical Research*, v. 10, p. 61-63, 2009.

- SHAN, B. et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, v. 117, p.112–119, 2007.
- SIBI, G. et al. Phytoconstituents and their influence on antimicrobial properties of *Morinda citrifolia* L. *Research Journal of Medicinal Plant*, v. 6, n. 6, p. 441-448, 2012.
- SILVA, N.C.C.; FERNANDES, J. A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 16, n. 3, p. 402-13, 2010.
- SILVEIRA, L. M. S. et al. Atividade antibacteriana de amostras de fruto do noni (*Morinda citrifolia* L. - Rubiaceae) vendidas em feiras livres de São Luís, Maranhão. *Revista Saúde & Ciência*, v. 2, n. 1, p. 31-37, 2011.
- SOETAN, K. O. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 23, p. 2405-2407, 2006.
- SOLOMON, N. *The Noni Phenomenon*. Direct Source Publishing, Utah, 1999. 296p.
- STADLBAUER, V. et al. Hepatotoxicity of noni juice: Report of two cases. *World Journal Gastroenterology*, v. 11, n. 30, p. 4758-4760, 2005.
- SUNDER, J. et al. Antibacterial activity in solvent extract of different parts of *Morinda citrifolia* plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 3, n. 8, p. 1404-1407, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- THOMSON, R. H. *Naturally occurring quinines* (2nd ed.), London and New York: Academic Press (Appropriate sections), 1971.
- TIBBETTS, R. J.; LIN, T. L.; WU, C. C., Phenotypic evidence for inducible multiple antimicrobial resistance in *Salmonella choleraesuis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 218, n. 2, p. 333-338, 2003.
- USHA, R.; SASHIDHARAN, S.; PALANISWAMY, M. Antimicrobial activity of a rarely known species, *Morinda citrifolia* L. *Ethnobotanical Leaflets*, v. 14, p. 306-311, 2010.
- VAN BELKUM, A. et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 199, n. 12, p. 1820–1826, 2009.

- VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, p.1-7, 2006.
- VEIGA, R. F. A. et al. Noni: Frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. *O Agrônomo*, v. 57, n. 1, p. 20-21, 2005.
- WANG, M.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (noni). *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 952, p. 161-168, 2001.
- WANG, M. Y. et al. *Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, 2002.
- WEST, B. J. et al. A safety review of noni fruit juice. *Journal of Food Science*, v. 71, n. 8, p. 100-106, 2006.
- YOUNOS, C. et al. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, v. 56, n. 5, p. 430-434, 1990.
- YÜCE, B. et al. Hepatitis induced by noni juice from *Morinda citrifolia*: a rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? *Digestion*, v. 73, n. 2-3, p. 167-170, 2006.
- ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and health risk. *Bulletin of IDF*, v. 345, p. 15-18, 2000.
- ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*, v. 78, n. 2, p. 227-231, 2002.
- ZINK, D. L. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Journal of Emerging Infectious Diseases*, v. 3, p. 467-469, 1997.

ANEXOS

- Regras seguidas no capítulo 2.

A **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - RBPM** é publicação trimestral, exclusivamente eletrônica a partir de 2012, e destina-se à divulgação de trabalhos científicos originais, revisões bibliográficas, e notas prévias, que deverão ser inéditos e contemplar as grandes áreas relativas ao estudo de plantas medicinais. Manuscritos que envolvam ensaios clínicos deverão vir acompanhados de autorização da Comissão de ética pertinente para realização da pesquisa. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol, sendo obrigatória a apresentação do resumo em português e em inglês, independente do idioma utilizado. Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm.sbpm@gmail.com, com letra Arial 12, espaço duplo, margens de 2 cm, em "Word for Windows". Os artigos, em qualquer modalidade, não devem exceder 20 paginas. No e-mail, enviar telefone para eventuais contatos urgentes.

Para a publicação, os artigos aprovados submetidos à RBPM a partir de 1º de Abril de 2013 (inclusive), terão custo de tramite de 300 reais (trezentos reais) a ser efetivado pelos autores/responsáveis somente na ocasião do recebimento da carta de aceitação do artigo, quando receberão o respectivo boleto e instruções para o pagamento.

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS PRÉVIAS

Revisões e Notas prévias deverão ser organizadas basicamente em: Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, Abstract, Key words, Texto, Agradecimento (se houver) e Referência Bibliográfica.

Atenção especial deve ser dada aos artigos de Revisão evitando a citação Ipsis-litteris de textos, que configura plágio por lei.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os artigos deverão ser organizados em:

TÍTULO: Deverá ser claro e conciso, escrito apenas com a inicial maiúscula, negrito, centralizado, na parte superior da página. Se houver subtítulo, deverá ser em seguida ao título, em minúscula, podendo ser precedido de um número de ordem em algarismo romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico (binômio latino e autor) entre parênteses.

AUTORES: Começar pelo último sobrenome dos autores por extenso (nomes intermediários somente iniciais, sem espaço entre elas) em letras maiúsculas, 2 linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor deverá ser colocado um número sobrescrito que deverá corresponder ao endereço: instituição, endereço da instituição (rua e número ou Caixa Postal, cidade, sigla do estado, CEP, e-mail). Indicar o autor que deverá receber a correspondência. Os autores devem ser separados com ponto e vírgula.

RESUMO: Deverá constar da mesma página onde estão o título e os autores, duas linhas abaixo dos autores. O resumo deverá ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, resumo do material e método, principais resultados e conclusão. Não deverá apresentar citação bibliográfica.

Palavras-chave: Deverão ser colocadas uma linha abaixo do resumo, na margem esquerda, podendo constar até cinco palavras.

ABSTRACT: Apresentar o título e resumo em inglês, no mesmo formato do redigido em português, com exceção do título, apenas com a inicial em maiúscula, que virá após a palavra ABSTRACT.

Key words: Abaixo do Abstract deverão ser colocadas as palavras-chave em inglês, podendo constar até cinco palavras.

INTRODUÇÃO: Na introdução deverá constar breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. As citações de autores no texto deverão ser feitas de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986) ou quando houver mais de dois autores Santos et al. (1996).

MATERIAL E MÉTODO (CASUÍSTICA): Deverá ser feita apresentação completa das técnicas originais empregadas ou com referências de trabalhos anteriores que as

descrevam. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Na metodologia deverão constar os seguintes dados da espécie estudada: nome popular; nome científico com autor e indicação da família botânica; nome do botânico responsável pela identificação taxonômica; nome do herbário onde a exsicata está depositada, e o respectivo número (Voucher Number); época e local de coleta, bem como, a parte da planta utilizada.

RESULTADO E DISCUSSÃO: Poderão ser apresentados separados, ou como um só capítulo, contendo a conclusão sumarizada no final.

AGRADECIMENTO: deverá ser colocado neste capítulo (quando houver).

REFERÊNCIA: As referências devem seguir as normas da ABNT 6023 e de acordo com os exemplos:

Periódicos:

AUTOR(ES) separados por ponto e vírgula, sem espaço entre as iniciais. Título do artigo. **Nome da Revista, por extenso**, volume, número, página inicial-página final, ano.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, n.2, p.267-73, 1989.

Livros:

AUTOR. **Título do livro**. Edição. Local de publicação: Editora, Ano. Total de páginas. MURRIA, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry**. 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

Capítulos de livros:

AUTOR(ES) DO CAPÍTULO. Título do Capítulo. In: AUTOR (ES) do LIVRO. **Título do livro**: subtítulo. Edição. Local de Publicação: Editora, ano, página inicial-página final. HUFFAKER, R.C. Protein metabolism. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology: a treatise**. Orlando: Academic Press, 1983. p.267-33.

Tese **ou** **Dissertação:**

AUTOR. **Título em destaque**: subtítulo. Ano. Total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Local.

OLIVEIRA, A.F.M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil**. 1995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em

Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Trabalho de Evento:
 AUTOR(ES). Título do trabalho. In: Nome do evento em caixa alta, número, ano, local. **Tipo de publicação em destaque...** Local: Editora, ano. página inicial-página final.
 VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: INTERNATIONAL SAVANNA SYMPOSIUM, 3., 1996, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 1996. p.169-71.

Publicação Eletrônica:
 AUTOR(ES). Título do artigo. **Título do periódico em destaque**, volume, número, página inicial-página final, ano. Local: editora, ano. Páginas. Disponível em: <<http://www.....>>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano. PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004. Disponível em:<http://www.scielo.br>. Acesso em: 18 abr. 2005.

Não citar resumos e relatórios de pesquisa, a não ser que a informação seja muito importante e não tenha sido publicada de outra forma. Comunicações pessoais devem ser colocadas no rodapé da página onde aparecem no texto e evitadas se possível. Devem ser também evitadas citações do tipo: Almeida (1994) citado por Souza (1997).

TABELAS: Devem ser inseridas no texto, com letra do tipo Arial 10, espaço simples. A palavra TABELA (Arial 12) deve ser em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico; já quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Tabela).

FIGURAS: As ilustrações (gráficos, fotográficas, desenhos, mapas) devem ser em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, e inseridas no texto. Quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Figura). As legendas e eixos devem ser em Arial 10, enviadas em arquivos separados, com resolução 300 DPI, 800x600, com extensão JPG ou TIFF, para impressão de publicação.

Processo de avaliação: Os manuscritos são analisados por, pelo menos, dois pareceristas, segundo um roteiro de análise baseado principalmente no conteúdo científico. Os pareceristas recomendarão a aceitação com ou sem necessidade de retornar; recusa, ou sugerir reformulações, e que, neste caso, o artigo reformulado retornará ao parecerista até que a avaliação seja concluída. Quando no mínimo 2 pareceristas aprovarem, sem necessidade de retornar, o artigo estará pronto para ser publicado e o autor receberá a carta de aceite bem como as instruções para pagamento dos custos de tramite (R\$300 reais)*. Os

nomes dos pareceristas permanecerão em sigilo, omitindo-se também perante estes os nomes dos autores.

* Somente os artigos aprovados que foram submetidos a partir de 1º de abril de 2013 terão custo para publicação.

Direitos autorais: Ao encaminhar um manuscrito para a RBPM os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias.

ATENÇÃO: Artigos que não estiverem de acordo com essas normas serão devolvidos.

Observação: São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Contudo, reserva-se ao Conselho Editorial, o direito de sugerir ou solicitar modificações que julgarem necessárias.

Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm.sbp@gmail.com

Tabela I - Resultados da análise do extrato etanólico da raiz de *M. citrifolia* em CLAE.

| Integration Results | | | | | | | |
|---------------------|-----------|--------------------|---------------|---------------|-----------------|-------------------|--------------|
| No. | Peak Name | Retention Time min | Area mAU*min | Height mAU | Relative Area % | Relative Height % | Amount mg/mL |
| 1 | | 2,007 | 0,942 | 4,831 | 3,86 | 5,90 | n.a. |
| 2 | | 2,710 | 4,342 | 21,555 | 17,78 | 26,33 | n.a. |
| 3 | | 3,397 | 6,586 | 20,765 | 26,98 | 25,36 | n.a. |
| 4 | | 3,780 | 0,102 | 0,974 | 0,42 | 1,19 | n.a. |
| 5 | Cafeina | 4,100 | 0,624 | 3,594 | 2,55 | 4,39 | 0,4920 |
| 6 | | 4,747 | 0,747 | 1,971 | 3,06 | 2,41 | n.a. |
| 7 | | 5,420 | 0,818 | 3,267 | 3,35 | 3,99 | n.a. |
| 8 | | 6,110 | 4,894 | 14,714 | 20,04 | 17,97 | n.a. |
| 9 | | 7,423 | 1,683 | 3,791 | 6,89 | 4,63 | n.a. |
| 10 | | 13,620 | 0,198 | 0,282 | 0,81 | 0,34 | n.a. |
| 11 | | 17,720 | 0,155 | 0,500 | 0,63 | 0,61 | n.a. |
| 12 | | 18,113 | 0,131 | 0,457 | 0,54 | 0,56 | n.a. |
| 13 | | 21,160 | 0,534 | 1,654 | 2,19 | 2,02 | n.a. |
| 14 | | 21,693 | 2,661 | 3,519 | 10,90 | 4,30 | n.a. |
| Total: | | | 24,416 | 81,873 | 100,00 | 100,00 | |

Tabela II- Resultados da análise em CLAE do extrato da raiz de *M. citrifolia* obtido com acetato de etila.

| Integration Results | | | | | | | |
|---------------------|-----------|--------------------|---------------|---------------|-----------------|-------------------|--------------|
| No. | Peak Name | Retention Time min | Area mAU*min | Height mAU | Relative Area % | Relative Height % | Amount mg/mL |
| 1 | | 2,853 | 0,931 | 4,343 | 6,54 | 10,34 | n.a. |
| 2 | | 3,360 | 1,439 | 4,351 | 10,11 | 10,36 | n.a. |
| n.a. | Cafeina | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| 3 | | 4,723 | 0,441 | 1,681 | 3,10 | 4,00 | n.a. |
| 4 | | 5,397 | 2,042 | 7,062 | 14,34 | 16,81 | n.a. |
| 5 | | 6,097 | 4,147 | 12,158 | 29,13 | 28,94 | n.a. |
| 6 | | 7,407 | 1,497 | 3,171 | 10,51 | 7,55 | n.a. |
| 7 | | 9,497 | 2,294 | 4,592 | 16,11 | 10,93 | n.a. |
| 8 | | 13,283 | 0,166 | 0,679 | 1,16 | 1,62 | n.a. |
| 9 | | 13,597 | 0,068 | 0,365 | 0,48 | 0,87 | n.a. |
| 10 | | 21,173 | 0,644 | 1,861 | 4,52 | 4,43 | n.a. |
| 11 | | 21,667 | 0,569 | 1,754 | 4,00 | 4,17 | n.a. |
| Total: | | | 14,237 | 42,016 | 100,00 | 100,00 | |

Tabela III- Resultados da análise do extrato clorofórmico da raiz de *M .citrifolia* em CLAE.

| Integration Results | | | | | | | |
|---------------------|-----------|-----------------------|-----------------|---------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| No. | Peak Name | Retention Time min | Area mAU*min | Height mAU | Relative Area % | Relative Height % | Amount mg/mL |
| 1 | | 2,720 | 2,269 | 7,736 | 18,66 | 24,16 | n.a. |
| n.a. | Cafeina | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| 2 | | 4,713 | 0,587 | 2,215 | 4,83 | 6,92 | n.a. |
| 3 | | 5,397 | 0,658 | 2,265 | 5,41 | 7,07 | n.a. |
| 4 | | 6,097 | 1,161 | 3,855 | 9,54 | 12,04 | n.a. |
| 5 | | 6,767 | 0,455 | 1,556 | 3,74 | 4,86 | n.a. |
| 6 | | 7,403 | 0,436 | 0,967 | 3,58 | 3,02 | n.a. |
| 7 | | 9,493 | 5,178 | 10,125 | 42,57 | 31,62 | n.a. |
| 8 | | 21,167 | 0,359 | 1,013 | 2,95 | 3,16 | n.a. |
| 9 | | 21,690 | 0,257 | 0,804 | 2,11 | 2,51 | n.a. |
| 10 | | 33,357 | 0,420 | 0,767 | 3,45 | 2,40 | n.a. |
| 11 | | 34,143 | 0,384 | 0,719 | 3,16 | 2,24 | n.a. |
| Total: | | | 12,163 | 32,024 | 100,00 | 100,00 | |

Tabela IV- Resultados da análise do extrato ciclohexânico da raiz de *M .citrifolia* em CLAE

| Integration Results | | | | | | | |
|---------------------|-----------|-----------------------|-----------------|---------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| No. | Peak Name | Retention Time min | Area mAU*min | Height mAU | Relative Area % | Relative Height % | Amount mg/mL |
| 1 | | 2,857 | 1,142 | 4,764 | 5,18 | 8,78 | n.a. |
| 2 | | 3,353 | 0,936 | 2,881 | 4,24 | 5,31 | n.a. |
| n.a. | Cafeina | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| 3 | | 4,723 | 0,259 | 0,894 | 1,17 | 1,65 | n.a. |
| 4 | | 5,397 | 1,199 | 3,988 | 5,44 | 7,35 | n.a. |
| 5 | | 6,110 | 1,384 | 4,253 | 6,28 | 7,84 | n.a. |
| 6 | | 8,393 | 8,946 | 22,149 | 40,56 | 40,84 | n.a. |
| 7 | | 9,487 | 7,927 | 15,299 | 35,94 | 28,21 | n.a. |
| 8 | | 21,677 | 0,149 | 0,000 | 0,67 | 0,00 | n.a. |
| 9 | | 22,297 | 0,114 | 0,000 | 0,52 | 0,00 | n.a. |
| Total: | | | 22,057 | 54,227 | 100,00 | 100,00 | |