

Efeito do suco de noni (*Morinda citrifolia* L.) em ratos submetidos a estresse por imobilização

Effect of noni juice (Morinda citrifolia L.) in rats subjected to immobilization stress

Halbannara Louyse de Pádua Teixeira¹, Priscila Drudi dos Santos², Luana Araújo Lopes³, Waldir Rocha Azevedo Neto⁴, Wataro Nelson Ogawa⁵

RESUMO

Introdução: o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) é ativado em situações de estresse com consequente depleção de ácido ascórbico nas glândulas adrenais (AAA). O noni (N) tem sido foco de pesquisas devido a variados benefícios terapêuticos, incluindo ação ansiolítica, porém, estudos associados a estresse são escassos.

Objetivo: mensurar o conteúdo de ácido ascórbico das adrenais de ratos submetidos a estresse e tratados com suco de noni e dos respectivos controles.

Material e métodos: Após aprovação do CEUA sob protocolo número 017, os animais foram divididos em grupos: sem estresse + água (C, 6 ratos); sem estresse + suco de noni a 30 % durante 7 dias (CN7, 8 ratos) e 14 dias (CN14, 7 ratos); com estresse + água (E, 8 ratos); com estresse + suco de noni a 30 % durante 14 dias (EN14, 5 ratos), sendo que o fator estressor consistiu na contenção dos animais em garrafas pet. Sob anestesia, as adrenais foram excisadas, pesadas e maceradas com ácido metafosfórico. Leituras espectrofotométricas das alíquotas do filtrado reagidas com 2,6-diclorofenol-indofenol foram padronizadas para peso glandular e corpóreo e AAA expresso em $\mu\text{g}/100 \text{ mg}/100 \text{ g}$.

Resultados: houve depleção de AAA ($p = 0,0001$) no grupo E ($31,8 \pm 7,8$) em relação ao C (66 ± 18), evidenciando estresse por imobilização, o qual foi revertido embora não significativo no EN14 ($39,3 \pm 5$). Não houve diferença significativa entre os grupos CN7 ($56,9 \pm 17,8$) e CN14 ($47,3 \pm 7,6$) comparados a C. Quanto ao peso das adrenais, observou-se uma atrofia significativa ($p < 0,0001$) no grupo CN14 ($17,7 \pm 1,8 \text{ mg}$) em comparação ao C ($32,3 \pm 7,6 \text{ mg}$), sugerindo que em animais não estressados possa ocorrer um bloqueio no eixo HHA por ação mediadora de compostos contidos no suco de noni.

Conclusão: a imobilização induz estresse e o suco de noni industrializado apresenta uma possível propriedade adaptógena, porém não conclusivamente antiestressora.

Descritores: *Morinda citrifolia* L. Noni. Estresse fisiológico. Imobilização.

ABSTRACT

Introduction: Hypothalamic-Hypophysis-Adrenal axis (HHA) is activated in stress situations with consequent depletion of ascorbic acid in the adrenal glands (AAA). Noni (N) has been the focus of research due to a variety of therapeutic benefits, including anxiolytic action; however, studies associated with stress are scarce.

Objective: to measure the ascorbic acid content of the adrenals of rats submitted to stress and treated with noni juice and the respective controls.

Material and methods: After approval by CEUA under protocol number 017, the animals were divided into groups: no stress + water (C, 6 rats); no stress + 30% noni juice for 7 days (CN7, 8 rats) and 14 days (CN14, 7 rats); with stress + water (E, 8 rats); with stress + 30% noni juice for 14 days (EN14, 5 rats), and the stressor consisted in the containment of the animals in pet bottles. Under anesthesia, the adrenals were excised, weighed and macerated with metaphosphoric acid. Spectrophotometric readings of the filtrate aliquots reacted with 2,6-dichlorophenol-indophenol were standardized for glandular and body weight and AAA expressed in $\mu\text{g} / 100 \text{ mg} / 100 \text{ g}$.

Results: There was depletion of AAA ($p=0.0001$) in group E (31.8 ± 7.8) with respect to C (66 ± 18), evidencing immobilization stress, which was reversed although not significant in EN14 (39.3 ± 5). There was no significant difference between groups CN7 (56.9 ± 17.8) and CN14 (47.3 ± 7.6) compared to group C. Regarding adrenal weight, a significant atrophy was observed ($p<0.0001$) in the CN14 group ($17.7 \pm 1.8 \text{ mg}$) compared to C ($32.3 \pm 7.6 \text{ mg}$), suggesting that in non-stressed animals a blockage in the HHA axis could occur due to the mediating action of compounds contained in the juice of noni.

Conclusion: immobilization induces stress and industrialized noni juice presents a possible adaptogenic property, but not conclusively anti-stress.

Descriptors: Immobilization. *Morinda citrifolia* L. Noni. Physiological stress.

¹ Bacharel em Farmácia pelo Centro Universitário UnirG. Gurupi (TO), Brasil. E-mail: halbannaralpt@gmail.com

² Bacharel em Farmácia pelo Centro Universitário UnirG. Gurupi (TO), Brasil.

³ Acadêmica do 9º período do curso de Medicina do Centro Universitário UnirG. Gurupi (TO), Brasil.

⁴ Acadêmico do 9º período do curso de Medicina do Centro Universitário UnirG. Gurupi (TO), Brasil.

⁵ Bacharel em Ciências Biológicas, Modalidade Médica, FMRP-USP. Doutor em Ciências Biomédicas, FMRP-USP. Professor Titular III do Centro Universitário UnirG, Gurupi (TO), Brasil. E-mail: wspin7@gmail.com

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
Halbannara Louyse de Pádua Teixeira. Rua 7, nº 248, Centro. Gurupi – TO. CEP: 77405130.

INTRODUÇÃO

A planta *Morinda citrifolia* L., conhecida como noni, vem sendo bastante utilizada com grande apelo comercial em virtude do potencial terapêutico atribuído a ela para as mais diversas enfermidades. O extrato industrializado de seus frutos tem sido livremente vendido em feiras e outros estabelecimentos comerciais, entretanto seu uso ainda não foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹ pela insuficiência de evidências científicas em modelos animais e ensaios clínicos toxicológicos para se estabelecer doses seguras.

Desde que a comunidade científica começou a mostrar interesse pela *M. citrifolia* já foram comprovadas a ação analgésica, antiinflamatória, antibacteriana, anti-helmíntica, antifúngica, antioxidante, antitumoral, hipoglicemiante, imunestimulante, ansiolítica, além da inibição de baixa densidade de lipoproteína de oxidação.² Apesar da vasta literatura a respeito das ações benéficas atribuídas ao noni, ainda há controvérsias em relação às suas propriedades terapêuticas e adaptógenas. O termo adaptógeno refere-se a plantas ou substâncias utilizadas cronicamente em prol da manutenção do bom funcionamento do organismo.³

Davydov e Krikorian⁴ relatam que algumas plantas adaptógenas como *Panax ginseng*, possuem componentes com estruturas análogas que mimetizam hormônios esteroidais e catecolaminas. Tais constituintes incluem metabólitos secundários como compostos triterpênicos e outras saponinas, os quais podem contribuir para atenuar os mecanismos de *feedback* negativo do eixo neuroendócrino estressor Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), ativado em situações de estresse e liberação de hormônios de estresse (glicocorticóides, mineralocorticóides e catecolaminas) pelas glândulas adrenais. Constituintes triterpênicos e outras saponinas já foram descritos em extrato etanólico de frutos do noni.⁵ Nesse sentido, o suco de noni pode apresentar um potencial efeito adaptógeno e/ou antiestresse.

De outra forma, alguns compostos fenólicos, como lignanas e fenilpropanóides apresentam estrutura similar a catecolaminas importantes na ativação do sistema nervoso simpático, como a noradrenalina.⁶ De acordo com Deshmukh⁷, entre os componentes com ação antioxidante presentes em diversas partes do noni, estão as antraquinonas, os compostos fenólicos e a vitamina C (vitC).

As plantas com propriedades adaptógenas são empregadas de forma crônica, sobretudo preventivamente. Assim, os modelos mais usados para estudar um adaptógeno são aqueles que induzem estresse em animais, assim, avalia-se a capacidade de proteção da planta contra os danos

provocados pelo mesmo, ou seja, seu efeito profilático.⁸ Diversos modelos animais de indução de estresse promovem depleção de ácido ascórbico da adrenal (AAA)⁹⁻¹³, o qual constitui um biomarcador que mensura indiretamente o nível de estresse do organismo.

Uma pesquisa recente realizada por nosso grupo (dados não publicados), sinaliza uma possível propriedade antiestresse exercida pela polpa de noni em ratos submetidos à imobilização. Os resultados sugerem que tal efeito pode ser devido à elevada concentração de vitC presente na polpa, a qual não só atenua, como reverte significativamente a depleção de ácido ascórbico das adrenais (AAA) induzida pelo estresse por imobilização, sendo este efeito semelhante ao obtido pela suplementação de vitC, resultados que corroboram ao descrito por Ohta *et al.*¹³

A partir dessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo uma abordagem alternativa de investigação, utilizando o suco do extrato industrializado da planta *M. citrifolia* no que tange aos mecanismos de estresse no eixo HHA, através do modelo experimental de imobilização e dosagem de AAA em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o extrato de frutos da *M. citrifolia* industrializado, o qual é fabricado na cidade de Castanhal – PA e comercializado nas feiras da cidade de Gurupi - TO. Em garrafas plásticas de 330 ml, o conteúdo é embalado e destinado à venda como suplemento alimentar. A partir do extrato, foi preparado um suco a 30 % e colocado no bebedouro dos animais. O trabalho em questão foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais sob o protocolo número 017.

Foram utilizados 34 ratos Wistar albinos, *Rattus norvegicus*, provenientes do Biotério do Centro Universitário UnirG, adultos, clinicamente normais, com peso médio inicial de 200 g e idade aproximada de 2 meses. Os animais foram mantidos por sete dias no laboratório de Fisiologia e Biofísica para aclimatização com o novo ambiente. Caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) forradas com maravalha foram acondicionadas em prateleiras e higienizadas a cada três dias com acomodação de, no máximo, quatro roedores por caixa. Os mesmos foram mantidos com livre acesso à água da torneira ou suco de noni a 30 % e ração Nuvilab[®], em temperatura constante de 27 ± 2 °C e em ciclo de luz de 12 horas (claro/escuro) para não haver intervenção no ciclo circadiano e um mínimo possível de manipulação, a não ser o estritamente necessário. Os animais foram divididos em grupos: sem estresse + água (C, 6 ratos); sem estresse + suco de noni a 30 % durante 7 dias (CN7, 8 ratos) e 14 dias (CN14, 7 ratos); com estresse + água (E, 8

ratos); com estresse + suco de noni a 30 % durante 14 dias (EN14, 5 ratos).

O modelo de imobilização ou restrição de movimento foi baseado na revisão de Mendes³ sobre modelos experimentais para indução de estresse. O método consistiu em um estímulo estressor inescapável, onde o animal foi colocado em uma garrafa pet que impossibilita a sua movimentação.

O procedimento de remoção cirúrgica das glândulas adrenais foi realizado imediatamente após anestesia induzida por tiopental na dose de 50 mg/kg. Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma placa cirúrgica e, após laparotomia mediana, a glândula adrenal esquerda foi excisada com tesoura de ponta fina, dissecada cuidadosamente com pinças e lâminas de bisturi, pesada em balança analítica (marca NEVA[□], modelo JNV-10EW), sendo os valores registrados em miligramas. Esta operação foi realizada com mínimo de manipulação e rapidamente para atenuar possíveis fatores estressores incidindo no eixo HHA. Uma esternotomia, ainda sob anestesia contínua, foi o critério para sacrificar os animais, com perfuração diafragmática e punção cardíaca de KCl concentrado.

A técnica para a determinação de AAA baseia-se no método de Mindlin e Butler¹⁴. A adrenal uma vez dissecada e após pesagem, foi macerada com bastão de vidro em 1 ml de ácido metafosfórico 2,5 % em cadinho de porcelana. A homogeneização foi completada com adição de mais 9 ml de ácido metafosfórico e filtrada em papel Whatman diretamente em Becker de 50 ml. Segundo a sugestão de Azevedo⁹, o procedimento foi realizado sobre blocos de gelo e a filtração em caixa de isopor com gelo para minimizar a oxidação do ácido ascórbico (AA) pelo calor e também deterioração pela iluminação. O princípio do método fundamenta-se na capacidade que o AA tem de reduzir certos corantes para uma forma não colorida. O corante 2,6 diclorofenol-indofenol apresenta cor azul em meio neutro e cor rosa em solução ácida. Sua utilização justifica-se pelo fato de que quando o AA é adicionado a uma solução tampão com o 2,6 diclorofenol-indofenol, a intensidade de descoloração da reação é proporcional ao conteúdo de AA presente na mistura. As leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro da marca Kasuaki[®], no comprimento de onda fixado em 520 nm, sendo o zero do aparelho ajustado em tubo contendo 4 ml de solução de ácido metafosfórico 2,5 %. Foram misturadas alíquotas de 2 ml do filtrado da adrenal com 2 ml da solução C. A Figura 1 mostra a regressão obtida através de pontos obtidos de três curvas padrão do AA. A reta resultante foi utilizada para a obtenção da concentração de AAA, em µg/ml. O resultado final foi expresso em micrograma

de AA por 100 miligramas de adrenal por 100 gramas de peso corporal (µg /100 mg / 100 g).

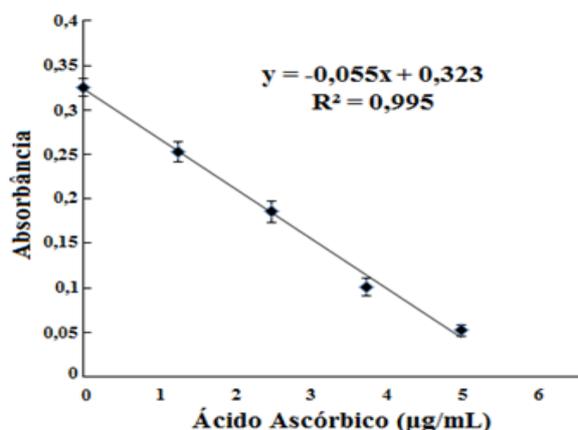


Figura 1 Reta de regressão através de pontos obtidos de três curvas padrão de ácido ascórbico (AA). O R^2 de 99,5 % é uma medida da intensidade da associação e de ajuste dos pontos experimentais à reta.

Os valores de AAA e peso das adrenais foram analisados com auxílio dos programas Excel e Assistat 7.7 beta e apresentados em tabelas como médias amostrais dos grupos analisados, sendo a variabilidade amostral representada pelo desvio padrão. O teste paramétrico de escolha foi ANOVA inteiramente casualizado com diferente número de repetições, seguido pelo de Tukey para comparações múltiplas e o nível de significância fixado em 5 %. Portanto, foram consideradas significativas as diferenças entre as médias amostrais que apresentaram probabilidades de ocorrência menores que 0,05. Todos os dados foram submetidos previamente ao teste de normalidade e homocedasticidade também fixado em 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação do eixo neuroendócrino HHA está intimamente ligada aos mecanismos fisiológicos do organismo em resposta a estímulos estressores. É inegável que diversos estudos experimentais confirmam o estado de estresse de um organismo por meio de métodos específicos precisos como dosagens séricas diretas de corticosterona, CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), principais hormônios do estresse liberados em decorrência da ativação do eixo HHA. Entretanto, a determinação do AAA constitui um método alternativo indireto para mensuração do nível de estresse do organismo, embora menos preciso do que a dosagem de hormônios por técnicas de radioimunoensaio. Tal precisão foi avaliada no trabalho de Contarteze *et al.*¹⁰, que verificaram a sensibilidade de diferentes

biomarcadores de estresse em ratos após exercício agudo de natação. Houve depleção de AAA e de colesterol comparados ao controle-sedentário, porém não foi constatada diferenças nos teores de AAA e de colesterol frente às diferentes intensidades do exercício, o mesmo não ocorrendo com os níveis de hormônios séricos, cujas sensibilidades foram evidentemente maiores.

O aumento na síntese e secreção de hormônios do estresse, após estímulos estressores ou administração direta exógena de ACTH está associado à depleção de AA do córtex das adrenais. Sabe-se que a corticosterona é derivada da molécula de colesterol através da oxi-redução com o envolvimento de AA, sendo por esta razão a depleção, tanto do AA quanto do colesterol na glândula adrenal, um indicador de estresse.¹⁵

A presente pesquisa teve como enfoque avaliar a relação entre o suco de noni e o eixo estressor (HHA) de ratos submetidos ou não a imobilização, por meio de dosagens de AAA. Para melhor visualização dos resultados dos grupos em conjunto, os valores médios dos conteúdos de ácido ascórbico da adrenal (AAA) foram divididos por 51,4 $\mu\text{g}/100$ mg de adrenal/100 g de peso corporal, plotados em função das condições experimentais impostas aos animais, partindo do pressuposto de que a média Gaussiana de AAA na população de ratos sem estresse + água, no intervalo de confiança de 95 % ($IC_{95\%}$), seja de $51,4 \pm 6,3 \mu\text{g}/100$ mg/100 g peso corpóreo. Esta estimativa da média populacional foi obtida de dados coletados no laboratório de Fisiologia e Biofísica-UnirG, no período compreendido de 2006 – 2014, desde a implantação do método. Conforme mostrado na Figura 2, a faixa delimitada pelas linhas pontilhadas em torno do valor 1, indicam regiões de normalidade gaussiana, acima da qual considerada estado de antiestresse e abaixo, situações de estresse. O teste de ANOVA, aplicado aos dados de AAA, mostra uma depleção significativa ($p = 0,0001$) no grupo E ($31,8 \pm 7,8$) comparada ao C (66 ± 18), evidenciando estado de estresse induzido pela imobilização (Figura 2), abaixo da linha inferior pontilhada. O grupo EN14 foi estatisticamente semelhante ao grupo E, porém com tendência a retornar para os níveis do grupo controle, o que sugere uma possível ação antiestresse do suco de noni. Os grupos CN7 ($56,9 \pm 17,8$), CN14 ($47,3 \pm 7,6$) e C não demonstraram diferença significativa intergrupos.

Ohta *et al.*¹³ demonstraram que ratos expostos a estresse por restrição em imersão em água (ERIA) tiveram o conteúdo de AAA, mensurado por método mais preciso, reduzido rapidamente até 1,5 horas após o início do estímulo e, em seguida, foi observada uma diminuição gradativa até 6 horas em relação aos animais sem estresse.

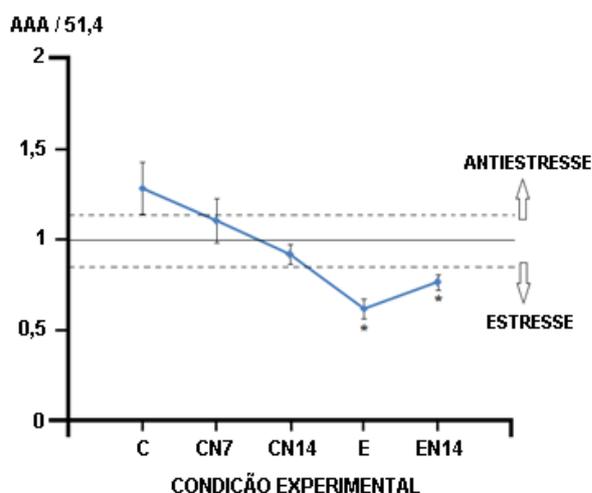


Figura 2 Conteúdo de ácido ascórbico da adrenal (AAA) / 51,4 μg por 100 mg de adrenal por 100 g de peso corporal: C = sem estresse + água; CN7 = sem estresse e tratados com suco de noni a 30 % durante 7 dias; CN14 = sem estresse e tratados com suco de noni a 30 % durante 14 dias; E = com estresse durante 1 hora/dia/7 dias consecutivos + água; EN14 = com estresse durante 1 hora/dia/14 dias consecutivos na vigência do tratamento com suco de noni a 30 %. * Significativo em relação ao grupo C com $p = 0,0001$.

Nakano e Suzuki¹⁶ estudaram os efeitos do estresse agudo (4 horas) induzido em ratos por imobilização sobre o metabolismo do AA através da determinação do conteúdo deste em diferentes tecidos e observaram uma redução gradual do conteúdo de AA nas adrenais. Por outro lado, houve aumento significativo de corticosterona nas adrenais e de AA no soro com valor máximo após 30 minutos de estresse. Os autores sugerem que o metabolismo do AA seja modulado em ratos submetidos a estresse e, que a vitC seria transportada dos tecidos para a circulação sanguínea. Quanto a concentração de AA no soro de ratos expostos a ERIA por um período de 6 h, houve aumento gradativo a partir de 0,5 hora após o início do estímulo¹³.

Em contrapartida, no estudo de Liu, Wang e Mori¹⁷, os níveis plasmáticos de AA mantiveram inalterados no estresse induzido por imobilização. Além disso, Padayatty *et al.*¹⁸ demonstraram que o estímulo agudo por administração exógena de ACTH, em humanos, provoca aumento na concentração de VitC no sangue coletado na veia adrenal, mas não na circulação periférica e uma única administração exógena de ACTH em ratos causa uma diminuição rápida de AAA.¹⁹ Nossos dados quanto à depleção de AAA, em condição de estresse por imobilização, corroboram os resultados obtidos por estes autores.

A função do AA liberado a partir das adrenais em resposta ao estresse ainda é obscura, porém

diversas hipóteses já foram levantadas como: síntese ou secreção de esteroides presentes no córtex adrenal; distribuição na circulação sanguínea^{13,16}; vasodilatação local ou modificação da sensibilidade dos receptores de ACTH; função local da vitamina C na glândula adrenal propriamente dita; atenuação de oxidantes liberados durante a esteroidogênese¹⁸ e proteção ou síntese do óxido nítrico para otimizar a liberação do cortisol²⁰.

Laney, Levy e Kipp²¹ investigaram a correlação entre a suplementação de AA (0,50 g/kg ou 10 g/kg) e os níveis de cortisol plasmático e AA teciduais após o tratamento com ACTH utilizando cobaias. Após 4 horas da administração de ACTH, observou-se aumento significativo nos níveis de cortisol plasmático em comparação ao grupo que recebeu veículo. O tratamento com ACTH induziu uma depleção de 26-30 % do AA presente nas adrenais, mas não afetou os níveis teciduais e plasmáticos. Os autores sugerem que o ACTH altera somente o conteúdo do AA armazenado na adrenal e que este conteúdo não é crítico para a esteroidogênese.

Ohta *et al.*¹³ estudaram os efeitos da suplementação de AA (250 mg/kg) em ratos submetidos a ERIA. Nos animais estressados, a suplementação de AA reduziu o aumento de AA no soro, ao passo que, nos animais sem estresse, os níveis no soro aumentaram. Foi sugerido que o tratamento com AA em ratos expostos por 6 horas a ERIA atenuou direta e/ou indiretamente o aumento da peroxidação lipídica nas adrenais através da sua atividade antioxidante, impedindo a liberação do AA na corrente sanguínea. Os autores concluíram que o estresse agudo foi capaz de interromper o sistema de defesa antioxidante não-enzimático através da depleção de AAA, sendo que a suplementação da vitamina C atenuou essa depleção na glândula, sustentando tais sistemas antioxidantes sem afetar a resposta ao agente estressor.

Resultados preliminares (não divulgados) de um estudo recente conduzido pelo grupo de pesquisa do laboratório de Fisiologia e Biofísica-UnirG, utilizando ratos submetidos a estresse por imobilização, sinalizou uma possível propriedade antiestresse contida na polpa *in natura* de noni. O resultado sugere que tal efeito pode ser devido à elevada concentração de vitC presente na polpa, a qual não só atenua, como reverte significativamente a depleção de AAA induzida pelo estresse, pois este efeito foi semelhante ao obtido com a pré-administração de vitC em ratos estressados por imobilização. Assim, parece ser possível que o efeito antiestresse do noni seja predominantemente em virtude da vitC contida na polpa deste fruto (dosados por titulação), uma vez que os dois grupos foram suplementados com a mesma dose de vitC, não descartando possível ação associativa de mais de 100 outros compostos já identificados no noni. A

vitC na polpa foi determinada por titulometria (Tabela 1) e, sendo assim, titulações foram realizadas também para verificar o teor de vitC presente no extrato de noni industrializado. Os resultados demonstram que o extrato contém baixo teor de vitC ($14 \pm 0,7$ mg/100 g de amostra) quando comparado à polpa ($174,3 \pm 13,9$ mg/100 g de amostra), valor que contrasta com o obtido por Nascimento (2012) que foi de $117,33 \pm 0,01$ mg/100 g. Por motivos comparativos, segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-TACO²³, a laranja contém 57 mg/100 g de amostra.

Tabela 1 Conteúdo de Vitamina C, em mg/100 g de amostra, determinado por titulação (método de Tilmans) da polpa *in natura* e do extrato industrializado de noni.

Amostra	Polpa	Extrato de noni industrializado
1	163,5	14
2	155,6	13
3	180,8	14
4	185,3	14
5	186,3	15
Média	174,3	14
Desvio Padrão	13,9	0,7

Assim, os dados da titulação do extrato de noni industrializado mostram uma redução de 90 % de vitC presente no fruto. Tal fato pode ser devido ao processo de fermentação a que é submetido o extrato antes de sua comercialização e que pode degradar quase toda a vitC no fruto do noni, além de outros fatores como processos de manufatura, transporte, exposição à luz e térmicos.

Apesar da significativa depleção de AAA no grupo estressado e suplementado com suco de noni (EN14), houve tendência de o AAA retornar para os níveis de normalidade. Esse dado pode ser atribuído ao fato do extrato industrializado ter quantidade reduzida de vitC e a ação antiestresse parcial explicada possivelmente pela presença de constituintes antioxidativos como os compostos fenólicos. Nesse sentido, Davydov e Krikorian⁴ sugerem que diversas ações mantenedoras dos adaptógenos sejam em virtude da capacidade que compostos presentes nestes tem de mimetizar hormônios e substâncias endógenas estruturalmente análogos e, assim, promover o *feedback* negativo do eixo HHA.

Metabólitos secundários como compostos triterpênicos e outras saponinas com estrutura similar aos hormônios esteroidais contribuem para os mecanismos de ação regulatórios das plantas

adaptógenas em nível do eixo estressor HHA. Além disso, constituintes triterpênicos e outras saponinas já foram descritos em extrato etanólico de frutos maduros do noni.⁵ Seguindo essa linha de raciocínio, Mendes³ enfatiza que, em situações de estresse em longo prazo, os adaptógenos atuam por restabelecer a ação do eixo HHA, inibindo a saída de mais hormônios envolvidos no fenômeno de estresse via mecanismos de *feedback* negativo.

Portanto, a diminuição do AAA parcialmente atenuada no grupo EN14 pelo extrato de noni comercializado pode ser explicada em parte por uma normalização exercida pelo noni a fim de otimizar a capacidade de adaptação do organismo ao agente estressor.

Em relação ao peso das glândulas adrenais (Figura 3), o teste de ANOVA indicou uma diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,0001$). Quando a magnitude da ação do ACTH atinge certo nível e é mantida, observa-se hipertrofia das glândulas adrenais.^{13,24}

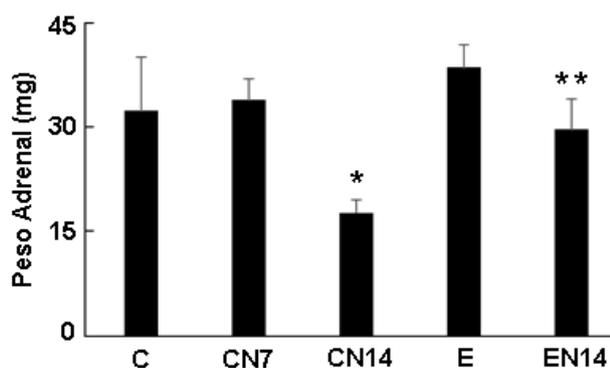


Figura 3 Peso, em mg, das glândulas adrenais de ratos: C = sem estresse + água; CN7 = sem estresse e tratados com suco de noni a 30 % durante 7 dias; CN14 = sem estresse e tratados com suco de noni a 30 % durante 14 dias; E = com estresse durante 1 hora/dia/7 dias consecutivos + água; EN14 = com estresse durante 1 hora/dia/14 dias consecutivos na vigência do tratamento com suco de noni a 30 %. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão. *Significativo em relação aos demais grupos com $p < 0,01$; **Significativo em relação ao grupo anterior E com $p < 0,01$.

Evidenciou-se uma hipertrofia, embora não significativa, das glândulas adrenais no grupo E ($38,5 \pm 3,9$ mg) em relação ao controle ($32,3 \pm 7,6$ mg), sugerindo uma atividade do eixo HHA e consequente ação trófica do ACTH nas adrenais induzido pelo estresse de imobilização. Por outro lado, o grupo EN14 (estressado + noni por 14 dias), apresentou peso médio da adrenal igual a $29,6 \pm 4,5$ mg, significativamente menor comparado ao do grupo E e estatisticamente semelhante ao dos grupos C e CN7 ($33,9 \pm 3,1$ mg), sugerindo uma

possível ação do noni no bloqueio do eixo estressor HHA.

Cruz *et al.*¹¹ constataram aumento significativo no peso das adrenais de ratos expostos a ruído de intensidade 100 dBA por 2 horas (fêmeas) e 6 dias – 1h/dia - (machos) comparado ao controle e sugeriram ativação do eixo HHA causada pelo estresse sonoro. Azevedo⁹ e Barcellos Filho *et al.*¹² também observaram aumento no peso das adrenais de ratos submetidos a estresse por exercício de natação agudo e crônico comparado aos animais sedentários. Os autores sugeriram que a natação induz estresse por hiperatividade do eixo HHA estimulando a glândula adrenal para suprir as necessidades hormonais causando hipertrofia e as modificações fisiológicas e mobilização de substratos energéticos contribuem para o mecanismo de compensação adaptativa frente a desafios que exigem uma melhor condição homeostática possível.

Ohta *et al.*¹³ observaram em seu estudo que o peso das glândulas adrenais não diferiram significativamente entre ratos submetidos a ERIA (0,5, 1,5 ou 3 horas), porém, com 6 horas de estresse, verificaram aumento significativo comparado ao grupo controle. Por outro lado, o estudo de Overbeek¹⁹ mostrou que a administração crônica de ACTH em ratos hipofisectomizados após 15 dias manteve o peso das glândulas adrenais.

Monsefi *et al.*²⁵ observaram aumento significativo no volume do córtex e da medula das glândulas adrenais de ratos expostos durante 8 e 12 horas a estresse sonoro. Os autores correlacionaram estes achados à hiperatividade do eixo neuroendócrino HHA por aumento da atividade e secreção por parte da glândula. Tal hiperatividade pode ser dependente de hipertrofia celular, função intensificada das organelas ou mesmo hiperplasia. Ginda, Warchol e Malendowicz²⁶ demonstraram em seu estudo que a administração de ACTH em *hamsters* provocou aumento da glândula adrenal e uma ampliação da zona fasciculada devido ao aumento no volume de organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático liso e complexo de Golgi.

Por outro lado, no grupo CN14 observou-se uma atrofia significativa das adrenais ($17,7 \pm 1,8$ mg) em comparação aos demais grupos, possivelmente em virtude da ação crônica e adaptógena do suco de noni a 30 %. Seguindo este raciocínio, o peso médio das adrenais do grupo EN14 (com estresse + noni) foi significativamente menor comparado ao E (com estresse + água) e semelhante ao C (sem estresse + água). Esse resultado pode ser atribuído ao tratamento crônico com o suco de noni também na concentração de 30 %, o que sugere uma ação inibitória do noni no eixo estressor HHA, atenuando a hipertrofia das glândulas adrenais induzidas pelo estresse de imobilização. Sendo assim, os animais tratados com noni tiveram o eixo HHA levemente modificado sob

enfoque fisiológico. Assim como plantas adaptógenas (*Schizandra chinensis* e *Rhodiola rosea*), descritas por Panossian e Wikman⁶, o noni pode ter exercido um papel de biorregulador natural, trabalhando para aumentar a capacidade de adaptação do organismo a fatores ambientais evitando danos desencadeados por estes. Ainda, o grupo CN14 (sem estresse + noni por 14 dias) demonstrou atrofia significativa das adrenais. Porém, já foi demonstrado que substâncias adaptógenas causam alterações no organismo de indivíduos saudáveis e tais modificações, consideradas como uma forma de adaptação fisiológica, podem otimizar a resposta do organismo frente a um estímulo estressor.³

De acordo com Grenspan e Strewler²⁷, a deficiência de ACTH promove insuficiência do córtex da glândula adrenal, caracterizada pela redução da secreção de cortisol. Tal fato indica que a atrofia da adrenal ocorreu possivelmente pela ação bloqueadora do noni no eixo HHA nos mecanismos de liberação de CRH hipotalâmico ou da secreção de ACTH a nível adenohipofisário. Nesse sentido, o suco de noni a 30 % pode ter assumido uma atividade adaptógena, ou seja, atuando preventivamente em prol do bom funcionamento do organismo.

Grande parte da população apresenta insuficiência ou desequilíbrio nutricional, o que pode culminar em doenças. Sendo assim, o suco de noni pode oferecer uma ampla gama de nutrientes os quais auxiliam no bom funcionamento do organismo e, por conseguinte, promover o bem-estar dos usuários. Estudos conduzidos em humanos mostram que a vitC pode atenuar a ação do cortisol induzida em situações de estresse físico ou psicológico intenso e prolongado. Foi demonstrado que a elevação do nível de cortisol, em resposta a atividades físicas no limite do extremo, é reduzida pela administração de vitC (1500 mg/dia). Na dosagem de 3000 mg por dia, a vitC neutralizou o aumento da pressão arterial, a elevação de cortisol no sangue e atenuou as respostas subjetivas de estresse psicológico agudo.²⁸⁻²⁹

A vitC constitui um cofator fundamental para a produção de hormônios esteróides da adrenal e aumenta a função global da glândula, além de estimular o sistema imunológico. Nas cápsulas comercializadas de suplementos adrenais, em casos diagnosticados de fadiga da adrenal por estresse crônico, a vitC para ser plenamente eficiente, é associada a bioflavonóides e vitamina E, ingredientes comumente encontrados no noni.

De acordo com os dados obtidos, nas condições experimentais estabelecidas, a imobilização induz estresse com ação predominantemente adaptógena do suco de noni. Assim, os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para futuras pesquisas com enfoque nos mecanismos estressores em nível de HHA, no

que tange ao isolamento e purificação de princípios ativos contidos nesta planta, e com estas evidências ampliam perspectivas para consolidar o noni como um produto fitoterápico.

CONCLUSÃO

O estresse induzido por restrição de movimento, em ratos, promove nestes uma redução no conteúdo de ácido ascórbico da adrenal, sendo a redução parcialmente atenuada pelo suco de noni industrializado.

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Alimentos. Gerência de Produtos Especiais. Informe Técnico nº 25, de maio de 2007. Esclarece sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda citrifolia*, também conhecida como noni. Maio 2007.
2. Mathivanan N, Surendiran G, Srinivasan K, Sagadevan E, Malavizhi K. Review on the current scenario of Noni research: Taxonomy, distribution, chemistry, medicinal and therapeutic values of *Morinda citrifolia*. Intl J Noni Res 2005;1(1):1-16.
3. Mendes FR. Modelos Animais para Avaliação de Plantas Adaptógenas. In: Carlini EA; Mendes FR. Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental. São Paulo: Fap-Unifesp, 2011. p. 323-353.
4. Davydov M, Krikorian AD. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. J Ethnopharmacol 2000;72(3):345-393.
5. Lima CR, Lima RA. Identificação de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico dos frutos verdes e maduros de *Morinda citrifolia* L. Revista Saúde e Pesquisa 2013; 6(3):439-446.
6. Panossian A, Wikman G. Effect of adaptogens on the central nervous system. Arq Bras Fitomed Cient 2005;3(1):29-51.
7. Deshmukh SR. Antioxidant activity of *Morinda citrifolia* cultures: prevention for major diseases. SGB Amravati University Journal 2009;1:06-09.
8. Wagner H, Norr H, Winterhoff H. Plant adaptogens. Phytomedicine 1994;1:63-76.
9. Azevedo, JRM. Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação. Campinas-SP. Tese [Doutorado em Ciências – Fisiologia] - Universidade Estadual de Campinas; 1994.
10. Contarteze RVL, Manchado FB; Gobatto CA, Mello MAR. Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. Rev Bras Med Esporte 2007;13(3):169-174.

11. Cruz ITF, Barcellos Filho PCG, Barcellos ML, Ogawa WN. Estresse sonoro e suas implicações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos. *Revista Cereus [periódicos na Internet]*. 2009 [acesso em 27 ago 2017];1(1). Disponível em: <http://ojs.unirg.edu.br/index.php/1/article/view/6/10>
12. Barcellos Filho PCG, Barcellos ML, Cruz ITF, Ogawa WN. Treinamento aeróbio e dexametasona: implicações no eixo estressor. *Revista Cereus [periódicos na Internet]* 2010 [acesso em 27 ago 2017];2(1). Disponível em: <http://ojs.unirg.edu.br/index.php/1/article/view/41/45>
13. Ohta Y, Yashiro K, Kaida S, Imai Y, Ohashi K, Kitagawa A. Water-immersion restraint stress disrupts non enzymatic antioxidant defense systems through rapid and continuous ascorbic acid depletion in the adrenal gland of rats. *Cell Biochem Funct* 2013;31(3):254-262.
14. Mindlin RL, Butler AM. The determination of ascorbic acid in plasma: a macromethod and micromethod. *J Biol Chem* 1938;122:673-686.
15. Rotta MA. Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2003.
16. Nakano K, Suzuki S. Stress-induced change in tissue levels of ascorbic acid and histamine in rats. *J Nutr* 1984;114(9):1602-1608.
17. Liu J, Wang X, Mori A. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem* 1994;26(4):511-517.
18. Padayatty SJ, Doppman JL, Chang R, Wang Y, Gill J, Papanicolaou DA, Levine M. Human adrenal glands secrete vitamin C in response to adrenocorticotropic hormone. *Am J Clin Nutr* 2007;86(1):145-149.
19. Overbeek GA. Hormonal regulation of ascorbic acid in the adrenal of the rat. *Acta Endocrinol* 1985;109(3):393-402.
20. Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, Funk R, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V. The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(17):6213-6218.
21. Laney PH, Levy JA, Kipp DE. Plasma Cortisol and Adrenal Ascorbic Acid Levels after ACTH Treatment with a High Intake of Ascorbic Acid in the Guinea Pig. *Ann Nutr Metab* 1990;34(2):85-92.
22. Nascimento LCS. Caracterização centesimal, composição química e atividade antioxidante do noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivado no município de Zé Doca-MA. Seropédica-RJ. Dissertação [Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos] – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2012.
23. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação-NEPA. Tabela brasileira de composição de alimentos/NEPA - UNICAMP. 4 ed rev e ampl. Campinas:NEPA- UNICAMP; 2011.
24. Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 1936;138:32.
25. Monsefi MA, Bahoddini A, Nazemi S, Dehghani GA. Effects of noise exposure on the volume of adrenal gland and serum levels of cortisol in rat. *Iran J Med Sci* 2006;31(1):5-8.
26. Ginda WJ, Warchol JB, Malendowicz LK. ACTH-induced ultrastructural changes in the zona fasciculata of the hamster adrenal cortex. Are intraadrenal thrombi regulators of corticosteroid secretion? *Histol Histopathol* 1992;7(1): 57-62.
27. Grenspan FS, Strewler GJ. *Endocrinologia: básica & clínica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
28. Peters EM, Anderson R, Nieman DC, Fickl H, Jogessar V. Vitamin C supplementation attenuates the increases in circulating cortisol, adrenaline and anti-inflammatory polypeptides following ultramarathon running. *Int J Sports Med* 2001;22(7):537-543.
29. Brody S, Preut R, Schommer K, Schürmeyer TH. A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol, and subjective responses to psychological stress. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;159(3):319-324.