



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ- UFOPA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**MARLEN DO CARMO SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS EM CÃES ACOMETIDOS PELO  
VÍRUS DA CINMOSE TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DO NONI  
(*Morinda citrifolia* Linn)**

**SANTARÉM-PA**

**2021**

**MARLEN DO CARMO SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS EM CÃES ACOMETIDOS PELO  
VÍRUS DA CINMOSE TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DO NONI  
(*Morinda citrifolia* Linn)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Biociências

**Orientadora:** Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Alanna do Socorro Lima da Silva

**Área de concentração:** Biologia experimental.

**SANTARÉM-PA**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

- S586a Silva, Marlen do Carmo  
Avaliação dos sintomas neurológicos em cães acometidos pelo vírus da cinomose tratados com extrato metanólico do noni (*Morinda citrifolia* Linn). / Marlen do Carmo Silva. – Santarém, 2022.  
61 p. : il.  
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Kelly Christina Ferreira.  
Coorientadora: Alanna do Socorro Lima da Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. *Morinda citrifolia*. 2. Atividade antiviral. 3. Cinomose. I. Ferreira, Kelly Christina, *orient.* II. Silva, Alanna do Socorro Lima da, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 636.7

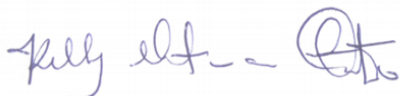
**MARLEN DO CARMO SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS EM CÃES ACOMETIDOS PELO  
VÍRUS DA CINMOSE TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DO NONI  
(*Morinda citrifolia* Linn)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências.

**Área de concentração:** Biologia experimental.

Data de Aprovação: 08/01/2022



---

Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro – Orientadora  
Universidade Federal do Oeste do Pará



---

Profa. Dra. Adriana Morini Caroprez – Examinadora Interna  
Universidade Federal do Oeste do Pará



---

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana - Examinadora Interno  
Universidade Federal do Oeste do Pará

## DEDICATÓRIA

Aos animais, pelo que, sem saber, são um dos grandes responsáveis pelos avanços na ciência.

## **AGRADECIMENTO**

O ciclo da vida não tem fases, nós é que rotulamos, somos sempre contínuos e não crescemos sozinhos, agradeço:

Ao meu bom e poderoso Deus, onde me fortaleço.

Aos familiares, e amigos, especialmente à minha esposa Adrielen Paula e minha mãe Sultana do Carmo, as quais sempre acreditaram e se empenharam em me auxiliar, cada uma de sua maneira para que pudesse chegar até aqui.

Aos meus filhos Asaf Jorge, pela compreensão e carinho e Marco Antônio, que ainda na sua pouca idade me ajudou na execução deste trabalho, absorvendo o funcionamento do trabalho científico. Deixo a ele esse legado.

Aos colegas médicos veterinários que sem dificuldades puderam colaborar com as informações solicitadas reconhecendo assim a importância dos trabalhos científicos.

A minha orientadora Profa. Dra. Kelly Christina, pela amizade e respeito, e por me fazer acreditar em meu projeto, e sempre olhando o lado bom das coisas tinha uma resposta animadora quando pensava que nada mais poderia ser feito.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Alanna Lima, que foi imprescindível na conclusão deste projeto.

A servidora técnica Bruna Cristine do Laboratório P&DBio, obrigado por sua incondicional paciência em me ajudar neste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Das enfermidades infecciosas com sinais neurológicos mais comuns em cães, a cinomose canina é sem dúvida a mais rotineiramente observada na clínica médica de pequenos animais, a cinomose canina é causada por um *Morbilivirus* da família Paramixoviridae, apresenta alta morbidade e mortalidade, em que, na maioria dos casos é estabelecido apenas um suporte sintomático para o animal, visto não haver tratamento específico para a doença. Várias pesquisas relatam as atividades antiviral, imunomodulador, antiinflamatória, antioxidante e neuroprotetora do noni (*Morinda citrifolia*). O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tratamento com extrato metanólico seco de frutos de noni em cães com sintomatologia neurológica acometidos pelo vírus da cinomose. 17 cães foram assim divididos: G1 (grupo controle, utilizando tratamento alopático - 9 animais), G2 (tratados com 1000mg do extrato - 8 animais). Os frutos foram colhidos de pomares de comunitários do município de Belterra, Estado do Pará. O perfil cromatográfico preliminar do extrato por realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) que revelou a presença de taninos condensados, terpenos, flavonóides e cumarina comparados com as colorações dos padrões de referência. Os resultados de toxicidade aguda do extrato, em camundongos não revelaram sinais de intoxicação, assim como não houve alteração significativa nos testes bioquímicos de uréia e creatinina dos cães tratados, tendo como base as referências dos marcadores de Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT), sugerindo que o extrato não possui efeitos nefro ou hepatotóxicos. Ao final do experimento, dois animais do G1 sobreviveram, enquanto que no G2 houveram 6 sobreviventes. A utilização dos cães do presente estudo foi aprovada pelo comitê de ética sob o número 1120180047/2019. A administração oral do extrato metanólico do noni na dose de 1000mg/animal se mostrou eficiente, comparado ao tratamento alopático na remissão dos sinais neurológicos causados pela cinomose se comparado ao grupo controle.

**Palavras-chave:** *Morinda citrifolia*. Atividade antiviral. Cinomose.

## ABSTRACT

From the infectious diseases with the most common neurological signs in dogs, canine distemper is undoubtedly the most routinely observed in the medical clinic of small animals, canine distemper is caused by a *Morbillivirus* of the Paramyxoviridae family, it has high morbidity and mortality, where in most cases, only a symptomatic support is established for the animal, since there is no specific treatment for the disease. Several studies report the antiviral, immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective activities of noni (*Morinda citrifolia*). The goal of this study was to evaluate the efficacy of treatment with dried methanolic extract of noni fruits in dogs with neurological symptoms affected by distemper virus. 17 dogs were divided as follows: G1 (control group, using allopathic treatment - 9 animals), G2 (treated with 1000mg of the extract - 8 animals). The fruits were harvested from community orchards in Belterra municipality, State of Pará. The preliminary chromatographic profile of the extract produced by thin layer chromatography (TLC) which discovered the presence of condensed tannins, terpenes, flavonoids and coumarin compared to the reference standards colorations. The extract results for acute toxicity in mice did not reveal intoxication signs, as well as there was no significant change in the treated dogs urea and creatinine biochemical tests, based on the references markers of Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT), suggesting that the extract has no nephro or hepatotoxic effects. At the end of the experiment, two animals from G1 survived, while in G2 there were 6 survivors. The dogs use for the present study was approved by the ethics committee under number 1120180047/2019. The oral administration of noni methanolic extract at a dose of 1000mg/animal proved to be moderately efficient, in the remission of neurological signs caused by distemper if compared to the control group.

Keywords: *Morinda citrifolia*. Antiviral activity. Distemper.



## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Patogenia da cinomose.....	13
Figura 2 - Maturação do fruto.....	19
Figura 3 - Procedimento para a realização e interpretação do teste.....	23
Figura 4 - Fluxograma do uso dos animais no experimento .....	24
Figura 5 - Fluxograma do protocolo da CCD.....	30
Figura 6 - Contenção e gavagem em camundongo.....	31
Figura 7 - Cromatogramas de CCD: A– Teste para detecção de cumarinas; B – teste para detecção de taninos condensados; C – Teste para detecção de terpenos e D teste para detecção de flavonoides.....	33
Figura 8 - Alere Cinomose Ac Test Kit®. Na figura superior, presença de três bandas rosa, uma sob a banda C2 (controle), a outra sob a banda C1 (controle) e outra sob letra T (teste) indicando um teste com resultado positivo. Na figura inferior, presença de duas bandas rosa sob a letra C2 e C1, indicando que o teste foi válido mas o resultado negativo.....	35
Figura 9 - Alterações hematimétricas observadas nos cães com cinomose .....	38
Figura 10 - Alterações bioquímicas e desidratação observadas nos cães com cinomose .....	39
Figura 11 - Nível de consciência dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni .....	43
Figura 12 - Reações posturais dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni .....	44
Figura 13 - Marcha dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni.....	45
Figura 14 - Movimentos involuntários dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni .....	46

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sinais observados na anamnese neurológica e a metodologia aplicada	25
Quadro 2 - Classes de substâncias do extrato metanólico de frutos <i>M. citrifolia</i> por CCD. ....	33
Quadro 3 - Média de peso dos camundongos (g) e resposta fisiológica observada .	34
Quadro 4 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento alopático.....	40
Quadro 5 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento com extrato metanólico seco de noni .....	40
Quadro 6 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento convencional. ....	41
Quadro 7 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento com extrato metanólico seco de noni .....	42

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALT - Alanina Amino Transferase  
AMHB - Associação Médica Homeopática Brasileira  
AST - Aspartato Amino Transferase  
CCD – Cromatografia em Camada Delgada  
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses  
CEUA - Comitê de Ética para o Uso de Animais  
CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
IgG – Imunoglobulina G  
LASANA – Laboratório de Sanidade Animal  
MPD – Membro Pélvico Direito  
MPE – Membro Pélvico Esquerdo  
MTD – Membro Torácico Direito  
MTE – Membro Torácico Esquerdo  
P&DBio - Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos  
P.A – Para Análise  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
Rf – Fator de Retenção  
SNC – Sistema Nervoso Central  
UV – Ultravioleta  
V/V - Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Cinomose canina</b> .....	<b>12</b>
2.1.1	Epidemiologia .....	12
2.1.2	Patogenia .....	13
2.1.3	Sinais clínicos.....	14
2.1.4	Diagnóstico.....	15
2.1.5	Tratamento .....	16
<b>2.2</b>	<b>Fitoterapia</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Noni - <i>morinda citrifolia</i></b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
4.1	Geral: .....	22
4.2	Objetivos específicos: .....	22
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
<b>5.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>22</b>
5.1.1	Avaliação Neurológica .....	25
5.1.2	Delineamento experimental e análise estatística .....	28
<b>5.2</b>	<b>Material botânico</b> .....	<b>29</b>
5.2.1	Preparo e obtenção do extrato metanólico dos frutos de <i>M. citrifolia</i> ....	29
5.2.2	Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato metanólico .....	29
5.2.3	Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato metanólico de <i>Morinda citrifolia</i> .....	31
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6.1</b>	<b>Avaliação fitoquímica de <i>Morinda citrifolia</i></b> .....	<b>32</b>
6.1.1	Teor de umidade .....	32
6.1.2	Perfil cromatográfico do extrato metanólico de <i>m. citrifolia</i> .....	32
<b>6.2</b>	<b>Resposta da toxicidade aguda do extrato metanólico de morinda citrifolia</b> .....	<b>34</b>
<b>6.3</b>	<b>Animais em experimentação</b> .....	<b>35</b>
6.3.1	Taxa de mortalidade .....	36
6.3.2	Hematologia e bioquímica dos animais .....	36

6.3.3	Hematologia e bioquímica comparativa .....	39
6.3.4	Avaliação dos sintomas neurológicos .....	42
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
	APÊNDICES .....	57
	APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	57
	APÊNDICE 2 – FICHA DE AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA .....	60
	APÊNDICE 3 - FICHA DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DO NONI EM CAMUNDONGOS SWIS .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades infecciosas com sinais neurológicos em cães são rotineiramente observadas na clínica médica de pequenos animais, apresentando por vezes sintomatologia inespecífica, o que exige do veterinário um certo grau de ceticismo, acumulando informações e solicitando exames que possam levar a um diagnóstico mais assertivo, pois os sintomas podem estar relacionados com a toxoplasmose, neosporose, erliquiose, raiva meningoencefalocelose congênita, encefalomielite canina por herpesvírus, dentre outras (NEVES, 2010).

Na maioria dos casos é estabelecido apenas um suporte sintomático para o animal, visto não haver tratamento específico para a doença (GREENE, 2006). O conhecimento popular sobre o uso de plantas na terapêutica associado ao embasamento científico sobre determinadas plantas têm trazido à tona a utilização de todas as partes do noni (*Morinda citrifolia*) uma árvore de pequeno porte da família *Rubiaceae*, e que tem sido utilizada na medicina popular asiática há milhares de anos (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006) em diversas patologias, dentre elas, as que acometem o sistema nervoso central.

A procura por produtos fitoterápicos vem aumentando, pelo anseio de produtos ecologicamente corretos e que possuem propriedades curativas. Várias pesquisas relatam a atividade antiviral, imunomodulador, antiinflamatória, antioxidante e neuroprotetora do noni (PACHAURI *et al.*, 2012; RATNOGLIK *et al.*, 2014; TOMBOLATO *et al.*, 2005). Em estudo comparativo realizado por Torres (2016) entre cães acometidos de cinomose que fizeram tratamento com extrato do noni, tiveram remissão dos sinais neurológicos mais rápidos do que o grupo controle, diminuindo consideravelmente a taxa de mortalidade em relação aos animais tratados com terapia convencional.

A experimentação científica do uso do extrato metanólico do noni na remissão dos sinais neurológicos, especialmente em cães acometidos com cinomose é o objeto de estudo deste trabalho, para tanto utilizamos por base estudos importantes que relatam principalmente os efeitos neuroprotetor, antiinflamatório, antioxidante e antiviral desta espécie vegetal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cinomose canina

Na rotina da clínica médica é comum o veterinário se deparar com alterações neurológicas, de diversas causas: congênitas, tóxicas, metabólicas, traumáticas, neoplásicas, inflamatório-infecciosas, entre outras (CHRISMAN, 1991). A cinomose canina é uma doença viral que compromete o sistema respiratório, gastrointestinal, dermatológico, oftalmológico e neurológico dos canídeos, assim, é considerada uma doença multissistêmica (FENNER, 2004), e, segundo McCandlish (2001) é uma das principais infecções e um dos importantes patógenos que acometem cães domésticos e outros carnívoros.

A doença é provocada por um *Morbilivius*, vírus da família *Paramyxoviridae*, antigênicamente relacionado com o sarampo; e que devido sua instabilidade sobrevive por curto espaço de tempo no ambiente, a desidratação e os desinfetantes destroem o vírus com facilidade (SHERDING, 2003). Os procedimentos de desinfecção de rotina geralmente são suficientes para a destruição do vírus em canis, clínicas ou hospitais veterinários e, em climas quentes, o vírus não é viável por muito tempo em canis após a remoção dos animais infectados (GREENE; APPEL, 2006).

#### 2.1.1 Epidemiologia

De acordo com estudos de Headley e Graça (2000) a cinomose no Brasil ainda é endêmica, as ocorrências clínicas da doença podem representar até 6% em cães, e ainda representar 11% das mortes. Apesar das altas taxas de incidência e mortalidade, não existe notificação dos casos, por não se tratar de uma zoonose, o que dificulta que novas medidas de controle sejam implementadas (MARTINS; LOPES; FRANÇA, 2009).

Características raciais, de sexo ou idade são indiferentes para o acometimento da doença (GAMA, 2007), porém, observa-se que cães sem raça definida são os mais acometidos pela doença se comparados aos cães de raça, isso se deve ao fato de que este grupo é extremamente representativo no Brasil (MARTINS; LOPES; FRANÇA, 2009), observa-se que cães jovens e não vacinados, o acometimento do sistema nervoso central (SNC) vem acompanhado de outras de infecções

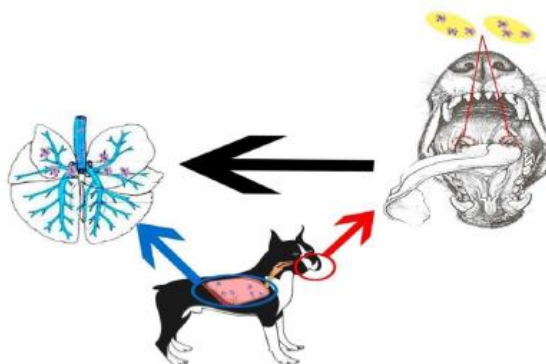
oportunistas, tais quais, as respiratórias e gastrointestinais (GAMA, 2007), e segundo Ettinger e Feldman (2008) a pneumonia bacteriana é comum em cães com cinomose.

### 2.1.2 Patogenia

A forma mais frequente de transmissão ocorre através de aerossóis com partículas virais, fezes, urina e secreção respiratória (MARTELLA et al., 2008), advindas de um cão infectado cerca de 7 dias antes, período que o animal começa a eliminar o vírus (GREENE; APPEL, 2006). Nelson e Couto (2001) relatam que a fagocitose pelos macrófagos ocorre imediatamente após a inalação do vírus, e segundo Kapil & Yeary (2011) dentro de 24 horas os vasos linfáticos levam para os tecidos linfóides, tonsilas e linfonodos bronqueais (figura 1). Os tecidos epiteliais e o sistema nervoso central são infectados de 8 a 14 dias após a infecção pelo vírus, sendo que o óbito dos animais se deve principalmente a infecção do sistema nervoso central (BIRCHARD, 1998).

Acredita-se que por via hematogena em associação a linfócitos e monócitos infectados que atravessam a barreira hematoencefálica ocorra a invasão neural do vírus (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; BEINEKE et al., 2009). Assim como na etiopatogenia de doenças degenerativas bem conhecidas em humanos, o estresse oxidativo, na cinomose, contribui para a lesão tecidual, e para o processo de degeneração da bainha de mielina (CURTIS, 2013).

Figura 1 - Patogenia da cinomose



Fonte: Kapil e Yeary (2011 apud Torres, 2016)



### 2.1.3 Sinais clínicos

A doença branda pode apresentar sinais de apatia, diminuição de apetite, febre e infecção do trato respiratório superior (GREENE; APPEL, 2006). Porém, os sinais são exacerbados quando há infecção secundária bacteriana, entre eles: descarga nasal purulenta, tosse, dispnéia, pneumonia, diarreia, vômito e pústulas (APPEL; SUMMERS, 1999). Entre os sinais dermatológicos, a hiperqueratose de coxins e focinho (GREENE; APPEL, 2006). Estudos de Tipold, Vadeveld e Jaggy (1992) indicaram que os sinais clínicos extraneurais (gastrointestinais, respiratórios, febre e conjutivites podem anteceder ou ocorrer simultaneamente com os sinais neurológicos).

A cinomose em fase neurológica pode manifestar-se como poliencefalite ou leucoencefalite, com uma incidência maior da última, geralmente acompanhada de desmielinização, ou seja, a destruição da bainha de mielina que envolve todas as terminações nervosas (SPTIZBARTH et al. 2012; CORRÊA, 1991), que segundo Braz (2009) esse processo é causado por uma reação auto imune. Aproximadamente, metade dos cães que sobrevivem aos sinais sistêmicos, evidenciam tardiamente, sinais neurológicos da cinomose (FENNER, 1997).

De acordo com Summers et al., (1995) na maioria dos casos de cinomose o SNC é acometido, mesmo naqueles sem transtornos neurológicos, considera-se que, os animais que evidenciam sinais neurológicos são os que apresentaram falha no sistema imune em eliminar o vírus invasor. Após o período de incubação de aproximadamente uma semana evidenciam-se esses sinais (Quinn et al., 2005). Assim, os animais imunizados aumentam a chance de vencer o vírus ainda no tecido linfóide, impedindo a invasão para outros órgãos (GAMA et al., 2005).

As lesões neurológicas dependem basicamente da idade, estado imunológico e cepa viral (GREENE; APPEL, 2006). De acordo com Gebara (2004), os sinais mais frequentemente encontrados em cães acometidos com cinomose na fase neurológica são: paralisias dos membros pélvicos, ataxia e nistagmo, tremores e hipermetria, e os sinais de desmielinização, segundo Ettinger e Feldman (2008), tiques de mastigação, cegueira, rigidez muscular e vocalização.

As convulsões e mioclonias presentes em 40 a 75% dos casos de cinomose são alterações tipicamente relacionadas a matéria cinzenta, (MARTELLA et al., 2008; MONTI, 2004), enquanto déficits visuais e diferentes formas de comprometimento

motor são sinais principalmente de disfunções da matéria branca (MARTELLA et al., 2008). No entanto, Summers et al., (1984), observou que as lesões na substância cinzenta eram mais graves e extensas em animais acometidos, enquanto a inflamação na substância branca eram leves. Neste ínterin, percebe-se que o curso da doença é variável, e que a morte ocorre na grande maioria dos casos (JONES, 2000).

#### 2.1.4 Diagnóstico

Os sinais clínicos são geralmente o que baseiam o diagnóstico da cinomose, unidos ao histórico de vacinações inadequadas, e à possível exposição ao vírus. Assim uma boa anamnese é o ponto de partida para a investigação mais profunda e confirmação da doença o quanto antes, pois o prognóstico em geral é altamente desfavorável e tem um elevado potencial infeccioso, sendo imprescindível a ratificação do diagnóstico *ante-mortem* (ARNS et al., 2012). Porém devido a variabilidade sinais clínicos inespecíficos o diagnóstico torna-se difícil, pois depende da virulência da estirpe viral, o estado imunológico e idade dos animais acometidos (REZENDE et.al., 2009).

A maioria das afirmações diagnósticas são comumente baseados apenas em: anamnese, sintomatologia e achados hematológicos, e o conhecimento desses parâmetros ajudam a orientar o tratamento e prognóstico do animal (NELSON; COUTO, 2010). A anemia, leucopenia e linfopenia são os principais achados hematológicos em cães com cinomose (SILVA et al., 2005; AMUDE et al., 2007). Silva et al., (2004) relata que a trombocitopenia, quando observada é uma resposta imunomediada removendo as plaquetas pelo sistema reticulo endotelial a partir de anticorpos antiplaquetários induzidos pelo o gênero *Morbillivirus*.

A confirmação da doença, de acordo com Braz (2009) pode ser feita através da identificação de Corpúsculos de Lentz, em histologia intracitoplasmática ou intranucleares de diversos tecidos, segundo Gebara et al. (2004) os corpúsculos ainda podem ser encontrados em células de exsudato, epiteliais e em neutrófilos, sendo que os corpúsculos são achados patognomônicos da doença. Porém, uma nova síndrome denominada polioencefalite do corpúsculo de inclusão pode estar associada a esse achado (NESSELER et. al., 1997) sendo, portanto, necessária precaução para confirmação do diagnóstico de cinomose baseado somente na presença dessas inclusões (CORRÊA,1992).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é empregada com sucesso devido à alta especificidade e sensibilidade, podendo utilizar diferentes tipos de amostras biológicas, como sangue, soro, urina e fragmentos de órgãos. (GEBARA et al., 2004). Segundo Greene e Vandeveld (2015) a utilização do sangue ou urina para *Polymerase Chain Reaction* – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram mais sensíveis que outras amostras indicadas, porém, o teste diagnóstico não diferencia o vírus vacinal do vírus natural, podendo levar a um resultado falso positivo.

As técnicas sorológicas apesar de limitadas, pois, mesmo os animais que morrem por cinomose podem não apresentar títulos de anticorpos detectados pelos testes (GEBARA, et.al., 2004), são utilizadas com o intuito de iniciar precocemente o tratamento da doença, Ettinger e Feldman (2008) relatam que na fase aguda da doença devido a uma falha na resposta imunológica os resultados podem apresentar falso negativos.

A comercialização de um kit de imunoensaio cromatográfico para detecção de antígeno (Ag) da cinomose em cães, tornou-se um teste de triagem mais acessível e rápido, visando o tratamento o mais breve possível, nos quais amostras de urina, saliva, soro, plasma ou líquido (CURTI; ARIAS; ZANUTTO, 2012). O teste tornou-se popular para o diagnóstico da doença e auxiliar na preparação de programa de vacinação.

#### 2.1.5 Tratamento

Até o momento não se tem disponível antivirais específicos contra a cinomose canina (APPEL; SUMMERS, 1999), por isso grande parte do tratamento das doenças que afetam o sistema nervoso, devido ao seu grau de comprometimento se baseia no uso de imunoglobulinas, para a reativação e fortalecimento do sistema imune (NEVES, 2010), antibióticos, devido a ocorrência de infecção bacteriana secundária do trato respiratório e digestivo e na terapia de suporte, de acordo com a sintomatologia desenvolvida (NEVES, 2010, LITFALLA et al., 2008), o uso de anticonvulsivantes podem ser necessários, porém não tem efeito curativo, e a fluidoterapia de suporte é indicada para animais desidratados (APPEL; SUMMERS, 1999).

O prognóstico para cães que apresentem sintomatologia nervosa é desfavorável (NELSON; COUTO, 2001), pois os animais tratados não respondem

satisfatoriamente, e quando ocorre o envolvimento do SNC, ocasionalmente os animais se recuperam (APPEL; SUMMERS, 1999). Estudos de Sherding (2003) revelam que os déficits neurológicos causados pelo vírus da cinomose canina são frequentemente irreversíveis, desta forma a eutanásia de animais com sintomatologia neurológica progressiva, severa e incapacitante é geralmente recomendada.

A acupuntura como terapia alternativa tem apresentado resultados satisfatórios para tratamento de distúrbios neurológicos produzidos por cinomose em cães (SCHOEN, 2006), assim como o uso de células-tronco, podem ser efetivas ou irrelevantes o tratamento da cinomose, dependendo do tipo específico de célula a ser utilizada (MONTEIRO, 2017; PINHEIRO, 2014), porém grande parte dos estudos com células tronco referem-se ao tratamento das sequelas da cinomose, não propriamente aos animais doentes.

## 2.2 Fitoterapia

A fitoterapia é o uso de plantas medicinais do conhecimento popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral (BRAGANÇA, 1996). As plantas utilizadas para esse fim são tradicionalmente denominadas medicinais. O termo Fitoterapia deriva do grego *phyton* que significa “vegetal” e de *therapeia*, “tratamento” (ALVES, 2003).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades tanto em humanos quanto em animais possui séculos de tradição em diversas culturas (MONTEIRO et al., 2011), mas somente por volta de 2800 a. C o uso terapêutico das plantas foi documentado em relato escrito, em obra chinesa Pen Ts'ao (“A Grande Fitoterapia”), de Shen Nung. (ELDIN; DUNFORD 2001). Os avanços efetivos ocorreram somente a partir do século XIX, pela contribuição da área química, em analisar e isolar os princípios ativos das plantas (TOMAZZONI et al. 2006).

Na história do Brasil, registros relatam os primeiros médicos portugueses que aqui chegaram, e que, devido a escassez dos medicamentos utilizados na Europa, foram obrigados a perceber a importância dos remédios de origem vegetal utilizados pelos povos indígenas (BRASIL, 2012a). Só no Brasil, há cerca de 350 mil espécies de plantas medicinais reconhecidas, utilizando-se das mais diversas estruturas e

órgãos vegetais, assim como de diversas formas de preparo destas plantas, dependendo do tipo de planta e a afecção a ser tratada (REZENDE; COCCO 2002).

Segundo Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira, fitoterápico é o produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas farmacologicamente ativas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL b, 2018), é importante salientar que plantas medicinais são definidas como plantas que proporcionam alívio ou cura de doenças tendo um uso tradicional em determinadas populações, e seu uso está condicionado ao conhecimento sobre coleta e preparo, porém a partir do momento que uma planta medicinal é industrializada, no sentido de produção de medicamentos, passa a ser considerada como um fitoterápico (BRASIL, 2010c).

A ausência de alternativas econômicas ou a tradição são fatores que levam a escolha do uso de plantas medicinais nos povos mais pobres, em contrapartida o consumo de medicamentos fitoterápicos em países mais desenvolvidos é influenciado pelo modismo do consumo de produtos de origem natural (VEIGA et al., 2005), os avanços científicos sobre o tema, o desenvolvimento de fitoterápicos mais seguros e eficazes, e ainda a crescente busca pela população, por terapias menos agressivas (YUNES, 2001).

A ciência tem demonstrado que as frutas e hortaliças são dotadas de propriedades medicinais, e que mudança nos hábitos alimentares podem ajudar a reduzir a incidência de doenças, e esses avanços científicos permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes (PANATO et al. 2007). Em países industrializados, como Canadá, França, Alemanha e Itália, o uso de medicamentos fitoterápicos é igualmente significativo aos medicamentos alopáticos, onde 70% a 90% de sua população tem usado esses recursos com a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (WHO, 2011).

Devido a ocorrência da utilização massiva de agrotóxicos e quimioterápicos o desenvolvimento de novos fitoterápicos mais seletivos e menos agressivos ao homem e o meio ambiente é primordial. As plantas são ricas em substâncias bioativas, e há tempos vêm sendo introduzidas nas propriedades agrícolas como forma alternativa no controle de pragas e parasitos, muitas delas são biodegradáveis apresentando baixa ou nenhuma toxicidade (CORRÊA; SALGADO, 2011).

É importante salientar que, para a manutenção das funções básicas de seus órgãos, tais quais, a raiz, o caule, os galhos, as folhas, flores e frutos, são produzidos

os metabólitos primários, de outra forma, os metabólitos secundários são produzidos por uma reação da planta, a partir de estímulos estressantes. Então, é importante conhecer a composição química e os metabólitos secundários responsáveis pelas modificações biológicas, quais sejam os alcalóides, saponinas, flavonóides, taninos, cumarinas, antraquinonas e outros (SANTOS, 1999).

Para a terapêutica animal, a procura desses fitoterápicos vem aumentando gradativamente, principalmente devido à pressão do consumidor, que cada vez mais anseia por mercadorias produzidas de forma ecologicamente correta, dentro dos princípios de agroecologia, que depende do mundo natural, (BRANDÃO, 2006). Estatísticas divulgadas por Ozaki e Duarte (2006) revelam que os fitoterápicos já representam hoje 6,7% dos medicamentos veterinários, a utilização destes nas doenças neurológicas é devido a sua ação calmante, relaxante e sedativa para cães.

### 2.3 Noni - *morinda citrifolia*

O noni (*M. citrifolia*) ganhou recente notoriedade, e pesquisas são direcionadas para comprovar o conhecimento popular que defende que o fruto e seus derivados têm propriedades de prevenção e cura de algumas enfermidades (HARADA et al., 2009). O noni é uma planta originária da Ásia tropical utilizada como corante e planta medicinal, descoberta pelos povos polinésios e a partir de então tem sido amplamente divulgada suas qualidades terapêuticas e nutricionais (WANG et al., 2002).

Figura 2 - Maturação do fruto



Fonte: Arquivo pessoal

Segundo Palioto et al. (2015) fatores ambientais-regionais (temperatura, solo, radiação, umidade, corrente de ar) podem dar a planta características próprias, o ponto de maturação, armazenamento, podem dar ao fruto e suas partes, diferenças de composição após a análise (DENG et al., 2007), porém diversos metabólitos comuns entre eles já foram isolados em outros estudos, como os compostos fenólico, ácidos orgânicos e alcalóides, sendo os compostos ativos: as cumarinas, os ácidos graxos, os flavonóides, as lignanas, os polissacarídeos, os iridóides, as antraquinonas, os terpenóides e os esteróis os quais dos fenólicos, os mais importantes são as antraquinonas (WANG; SU, 2001).

Pesquisas direcionam para a veracidade do conhecimento popular que a utilização do noni previne e cura algumas enfermidades, dentre elas: o combate a dores, tumores, inflamações, hipertensão, fadiga (VASCONCELOS et al., 2014). O fruto é considerado um antioxidante natural e o consumo na forma de suco, auxilia o sistema imunológico e aumenta a capacidade das células na absorção de nutrientes (TOMBOLATO et al., 2005) além da atividade antiviral (RATNOGLIK et al., 2014) e neuroprotetora (PACHAURI et al., 2012).

Os efeitos neuroprotetores utilizando o extrato acetato de etila de *M. citrifolia* em doses de 200 e 400 mg/kg foram observados por Muralidharan, RaviKumar e Balamurugan (2010), provocando um aumento dos níveis de serotonina, dopamina e enzimas antioxidantes em experimentação animal, através de testes comportamentais. Pesquisas em coelhos com hidrocefalia tratados com noni e memantina, observaram-se efeitos terapêuticos mais pronunciados no grupo tratado com noni (KÖKTÜRK et al., 2013).

O uso do extrato etanólico dos frutos de noni em conjunto com as frações clorofórmicas e acetato de etila demonstraram melhora no fluxo sanguíneo cerebral com diminuição do estresse oxidativo e aumento da memória, demonstrando sua atividade em perda de memória (PACHAURI et al., 2012). Pesquisas realizadas por Wang et al. (2002) a partir de solicitação da empresa International TAHITIAN NONI® juice sobre a toxicidade aguda do suco do noni em uma dosagem de 5.000 mg/kg, administrado por alimentação forçada, não revelou sinais de toxicidade e também nenhum sinal macroscópico de toxicidade em órgãos após necropsia.

Em relação ao uso de partes da planta de noni para tratamento com culturas de células infectadas pelo vírus da hepatite C, o extrato metanólico das folhas e suas frações hexânica e acetato de etila demonstraram ter atividade antiviral (RATNOGLIK

et al., 2014), já o extrato metanólico dos frutos exibiram moderados efeitos inibitórios contra o vírus Epstein-Barr (AKIHISA et al., 2007). Quanto ao estado de maturação Satiro et al. (2018) observou que os teores de flavonóides nos frutos pré-maduros são superiores à outros estágios de maturação.

Torres (2016), em estudo com cães acometidos de cinomose com sintomatologia nervosa tratados com 500 mg de extrato metanólico de noni via oral durante 30 dias, apresentaram melhora clínica a partir de 5 dias de tratamento, e quatro dos sete animais apresentaram remissão dos sinais clínicos, enquanto sete dos oito animais tratados com medicamentos convencionais vieram à óbito, este estudo mostrou a eficácia da droga vegetal frente aos medicamentos sintéticos na remissão dos sinais neurológicos causados pelo vírus da cinomose canina.

### **3 JUSTIFICATIVA**

A rotina clínica em medicina veterinária de pequenos animais aponta uma alta incidência de casos de cinomose canina em nossa região, possivelmente pela vacinação inadequada desses animais e o grande número de animais errantes. A cinomose é considerada uma doença multifatorial, acometendo os sistemas gastrointestinal, hepático, respiratório, ocular e, em fase adiantada da doença, o sistema neurológico, que é quando geralmente o tutor busca atendimento.

Os protocolos terapêuticos nesta fase, raramente tem sucesso devido a severidade da doença e aos altos custos do tratamento, o que leva ao veterinário recomendar a eutanásia do animal, gerando sofrimento aos tutores, pois em alguns casos o animal tornou-se um membro da família. Assim, é imprescindível pesquisas que propõem tratamentos alternativos, eficazes, seguros e de baixo custo.

Os poucos estudos na busca do tratamento de doenças neurológicas em cães, especialmente a cinomose canina, aliado aos conhecimentos científicos dos efeitos imunomodulador, antiviral, antibacteriano e neuroprotetor do noni justifica a realização da pesquisa, que visa avaliar a eficiência da utilização do extrato metanólico do noni na regressão da sintomatologia neurológica em cães infectados pelo vírus da cinomose, frente à terapia convencional.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral:

Avaliar a resposta ao tratamento com noni (*M. citrifolia*) em cães com sintomatologia neurológica acometidos pelo vírus da cinomose.

### 4.2 Objetivos específicos:

- a) avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães tratados com noni e o dos animais com tratamento convencional;
- b) comparar a resposta clínica frente aos diferentes tratamentos;
- c) avaliar a composição química dos constituintes presentes no extrato metanólico seco dos frutos de *M. citrifolia*;
- d) avaliar a sintomatologia neurológica dos cães em estudo;
- e) avaliar da toxicidade aguda do extrato em camundongos *swis*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em forma experimental e qualitativa, com tratamento *in vivo* de animais não vacinados, acometidos pela cinomose canina e com sintomatologia neurológica da doença, com extrato metanólico do fruto de *M. citrifolia* ou tratamento alopático padrão, dependendo do grupo que cada animal foi alocado.

### 5.1 Animais

Foram utilizados ao total, 17 cães não vacinados, não importando a raça, tamanho ou peso, com comprometimento neurológico, apresentando no mínimo um dos sintomas descritos na ficha avaliação neurológica individual, os dados avaliados referem-se ao nível de consciência, postura, marcha, movimentos involuntários e reflexos. As observações feitas diariamente estão demonstradas na tabela 1 e 2 no apêndice 2 (Ficha de avaliação neurológica). Todos os procedimentos realizados com

os cães neste trabalho possuem aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) sob o número 1120180047/2019 (Anexo 1).

A triagem dos animais ocorreu nas clínicas e consultórios veterinários de Santarém - Pa, e no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da mesma cidade, nos animais com suspeita clínica da doença foi realizado a anamnese detalhada, e então submetido ao teste cromatográfico para a triagem, um imunoenensaio cromatográfico para a detecção qualitativa do anticorpo IgG do vírus da cinomose em amostras de sangue, soro ou plasma, a partir da coleta de sangue do animal suspeito, seguindo-se com a recomendação do fabricante (figura 3).

O teste possui três linhas na sua superfície: C1 (linha controle 1); T (como linha de teste) e C2 (como linha de controle 2). Nenhuma das linhas é visível na janela de resultado antes da aplicação da amostra. As linhas de controle (C1 e C2) são usadas para controle de procedimento. Estas linhas devem sempre aparecer se o procedimento do teste estiver correto e se os reagentes da linha de controle estiverem funcionando. Uma linha roxa será visível na janela de resultado (T) se houver a presença de anticorpos Imunoglobulina G (IgG) da cinomose na amostra testada. O procedimento para a realização do teste e Interpretação dos resultados estão sintetizados na figura 3.

Figura 3 - Procedimento para a realização e interpretação do teste



### Interpretação

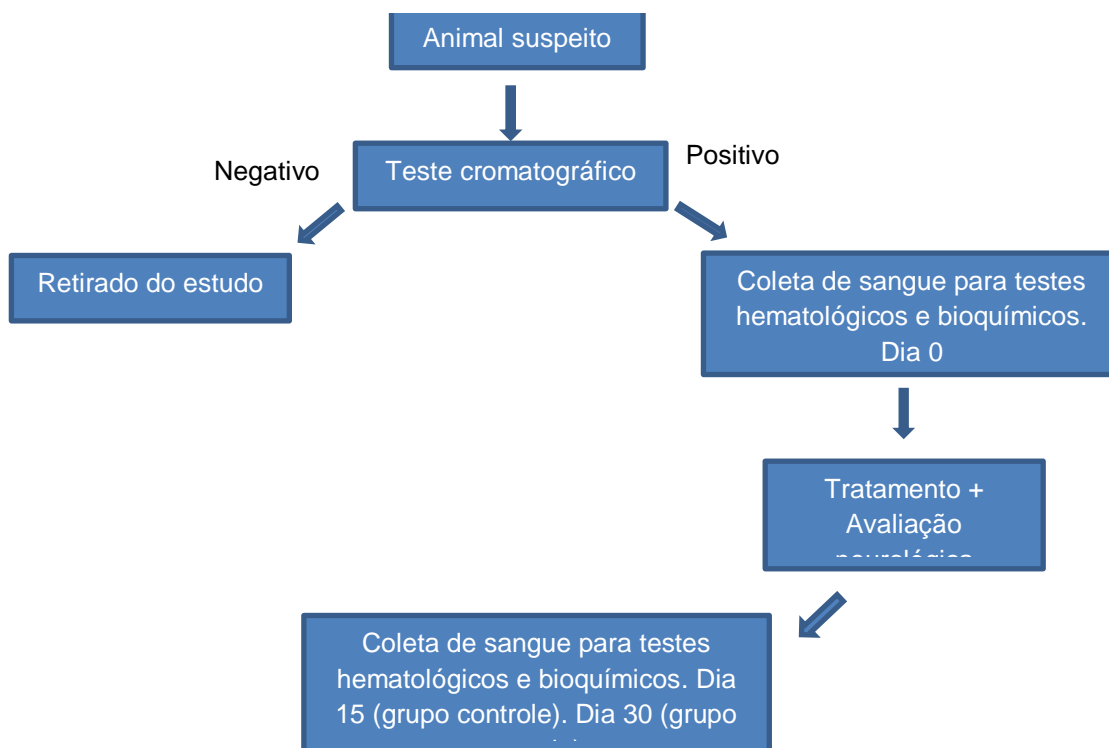


Fonte: <http://alerevet.com.br/Cinomose-Ac.html>. Adaptado

Após a confirmação da doença, aos tutores dos animais foi solicitado sua participação na pesquisa, o aceite foi formalizado através da leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde por sua vez, se comprometem em seguir as orientações do pesquisador quanto ao manejo do animal durante toda a pesquisa.

Os animais negativos no teste rápido foram retirados do estudo e os cães positivos foram submetidos a coleta de 4 mL de sangue preferencialmente da veia cefálica, as coletas difíceis de se realizar neste acesso, a veia jugular foi a segunda escolha), 2 mL de amostra foi colocada em tubo Eppendorf® com anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) para as provas hematológicas de identificação das séries vermelhas e brancas, o restante da amostra seguiu em tubo Eppendorf® sem anticoagulante para as análises bioquímicas de uréia, creatinina e Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT) para avaliação da função renal e hepática respectivamente. As provas hematológicas e bioquímicas foram realizadas em laboratório particular na cidade de Santarém. O fluxograma deste protocolo está representado na figura 4.

Figura 4 - Fluxograma do uso dos animais no experimento



A contenção dos animais durante todo o experimento foi feita conforme Feitosa (2008), e ainda seguindo as diretrizes previstas no artigo 6º § 3º da Resolução 879/2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV e das diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal a partir da Resolução normativa 12/2013, resguardando a integridade física dos pesquisadores e o bem-estar dos animais.

### 5.1.1 Avaliação Neurológica

A avaliação neurológica seguiu a metodologia proposta por Vianna (2000) e Rajão et al., (2013) onde foi realizada a anamnese em uma marcha tabulada para coleta dos dados (apêndice 2).

Quadro 1 - Sinais observados na anamnese neurológica e a metodologia aplicada

<b>Sinal</b>	<b>Característica</b>	<b>Metodologia</b>
Alerta	Estado de consciência adequado	Observação inicial e estímulo verbal
Letargia	Estado de respostas lentas	Observação inicial e estímulo verbal
Estupor	Estado em que não responde a nenhum estímulo, com exceção da dor.	Estímulo verbal e à dor
Coma	Não responde a nenhum estímulo, nem mesmo a dor, e o animal não pode ser acordado.	Estímulo à dor
Vocalização	Exemplificado como um uivo	Observação
Delírio	Alteração multifatorial em que se perde o contato com a realidade	Observação
Prostração	Estado de extrema debilidade física	Observação e estímulo verbal

<i>Head tilt</i>	Caracterizada pela inclinação da cabeça, a partir do plano mediano	Observação
<i>Head turn</i>	alteração caracterizada pela rotação da cabeça com manutenção da normalidade da postura corporal	Observação
Rigidez descebrada	consiste na rigidez dos quatro membros com epistótono (estiramento total da musculatura do pescoço), em estado comatoso ou estuporoso	Observação
Rigidez descerebelada,	Rigidez dos membros torácicos e flexão dos pélvicos, com presença de epistótono e consciência alerta	Observação
Posição de <i>Schiff-Sherrington</i>	caracterizada por extensão rígida de membros torácicos com propriocepção e função motora normal, e flacidez de membros pélvicos com diminuição ou ausência da função motora.	Observação
Propriocepção	Postura com membros em abdução ou em ângulo anormal	Posicionar a pata do animal com a parte dorsal em contato com o solo, espera-se que retorne a posição normal imediatamente
Saltitamento	Reação de defesa para evitar a queda à própria altura	Deslocar o animal apoiado em um ou dois membros
Ataxia	Perda do controle muscular durante movimentos voluntários	Observação e estímulo verbal
Paresia	Diminuição da movimentação voluntária dos membros	Observação, estímulo verbal e à dor
Paralisia	Ausência total da movimentação voluntária	Observação, estímulo verbal e à dor
Tremores	Vibração involuntária dos músculos que pode ocorrer	Observação

	durante o repouso ou movimento	
Mioclonia	Movimento breve, rápido, involuntário e brusco e semelhante a um choque, que consiste em descargas musculares únicas ou repetitivas	Observação
Miotomia	Diminuição da velocidade de relaxamento muscular após contração, estímulo mecânico ou elétrico.	Estiramento manual dos membros
Convulsões	Distúrbio no qual descargas elétricas anormais no cérebro fazem com que os músculos se contraíam e relaxem rapidamente de maneira desordenada	Observação
<i>Head bobbing</i>	Tremor de cabeça, vertical, horizontal ou ambos	Observação
Resposta à ameaça	Movimento de fechar os olhos frente à uma ameaça	Realizar um movimento de ameaça tapando um dos olhos
Reflexo pupilar	Contração pupilar frente a uma fonte de luz	Aplicação de luz na pupila e observação de possível midríase
Reflexo palpebral	Contração da musculatura das pálpebras	Estímulo tátil suave nos cantos medial e lateral das pálpebras
Sensibilidade	Contração da musculatura no local estimulado	Estímulo à dor
Estrabismo	Posicionamento anormal do globo ocular	Observação
Nistagmo	Movimentos involuntários e rítmicos dos olhos	Observação
Tônus mandibular	Tensão da musculatura que sustenta a mandíbula	Abertura da boca do animal

Fonte: Vianna (2000) e Rajão et al., (2013). Adaptado

Foram utilizados 17 animais com idade de 3 meses a 5 anos divididos em, um grupo controle (9 animais): tratados com enrofloxacino (5mg/kg/duas vezes ao dia/via oral, durante 15 dias, estimulador neurológico a base de vitaminas A (1 gotas/3 Kg/1x ao dia, via oral durante 15 dias) e complexo B (2 mL/5Kg/1 x ao dia via oral durante 15 dias) e corticóide dexametasona na dose de 1mg/5 Kg/1 vez ao dia/via oral durante 7 dias). Grupo 2 (8 animais): cães tratados com 1000 mg/animal de extrato metanólico seco de noni, via oral, diluído em água destilada no momento da administração.

Para resguardar a identidade dos proprietários e animais participantes da pesquisa, os grupos e indivíduos de cada grupo serão identificados com um sistema simples de códigos, de acordo com o tratamento a ser instituído. Os dados para identificação precisa dos animais e proprietários ficam em poder do pesquisador para consulta e confronto das informações.

Durante todo o tratamento o animal esteve sob os cuidados de seu tutor, em sua própria casa, com vistas ao bem-estar do paciente, foi feita avaliação clínica e medicação diariamente durante 30 (trinta) dias, no caso dos grupos tratados com noni, e durante 15 dias no grupo controle, no mesmo horário, com a anotação das observações. Uma outra coleta de sangue foi realizada ao final do tratamento para avaliação e discussão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

### 5.1.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e por conveniência. A flutuação das variáveis séricas foi analisada como medidas repetidas no tempo. O modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento, período e a interação tratamento e período para análise das variáveis ureia, creatinina, ALT e AST.

Para execução das análises estatísticas foi utilizado o SIGMAPLOT®, versão 11. Para todas as análises considerou-se nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). Os dados neurológicos foram agrupados na escala de tempo: início, meio e final do tratamento, para os dois grupos, em análise descritiva simples, as observações foram tabuladas em excel para a comparação dos tratamentos.

## 5.2 Material botânico

Frutos pré-maduros de *M. citrifolia* foram coletadas no município de Belterra - Estado do Pará, situado a 146 metros de altitude, Latitude: 2° 41' 54" Sul, Longitude: 54° 53' 18" Oeste (BRASIL d, 2019) em pomares particulares da comunidade do Amapá, no período de novembro de 2018 e abril de 2019, correspondendo ao período de inverno Amazônico.

### 5.2.1 Preparo e obtenção do extrato metanólico dos frutos de *M. citrifolia*

O preparo e obtenção do extrato metanólico foi realizado no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos (P&DBio) do Instituto de Biodiversidade e Florestas da UFOPA.

Utilizou-se 10.420 kg de frutos íntegros, pré-maduros, lavados, secos à temperatura ambiente e pesados em balança semianalítica. Posteriormente os frutos foram cortados e colocados em estufa de circulação forçada de ar à 38 °C por 5 dias. Após essa etapa, o material foi triturado em moinho de facas obtendo-se um pó de fina granulometria.

À 650 gramas do material vegetal triturado foi adicionado 1 litro de metanol grau P.A submetendo-se esta solução à banho-maria por um período de 4 horas com agitação constante com repetição. Decorrido esse tempo a solução obtida foi filtrada à vácuo e, em seguida a retirada do solvente foi realizada em evaporador rotativo sob pressão reduzida para obtenção do extrato metanólico bruto, e então submetido ao processo de liofilização para eliminação da água residual proveniente da evaporação.

Após a obtenção do extrato metanólico foi calculado o rendimento utilizando uma balança analítica sendo armazenado em frascos âmbar de 30 mL e submetidos à refrigeração.

### 5.2.2 Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato metanólico

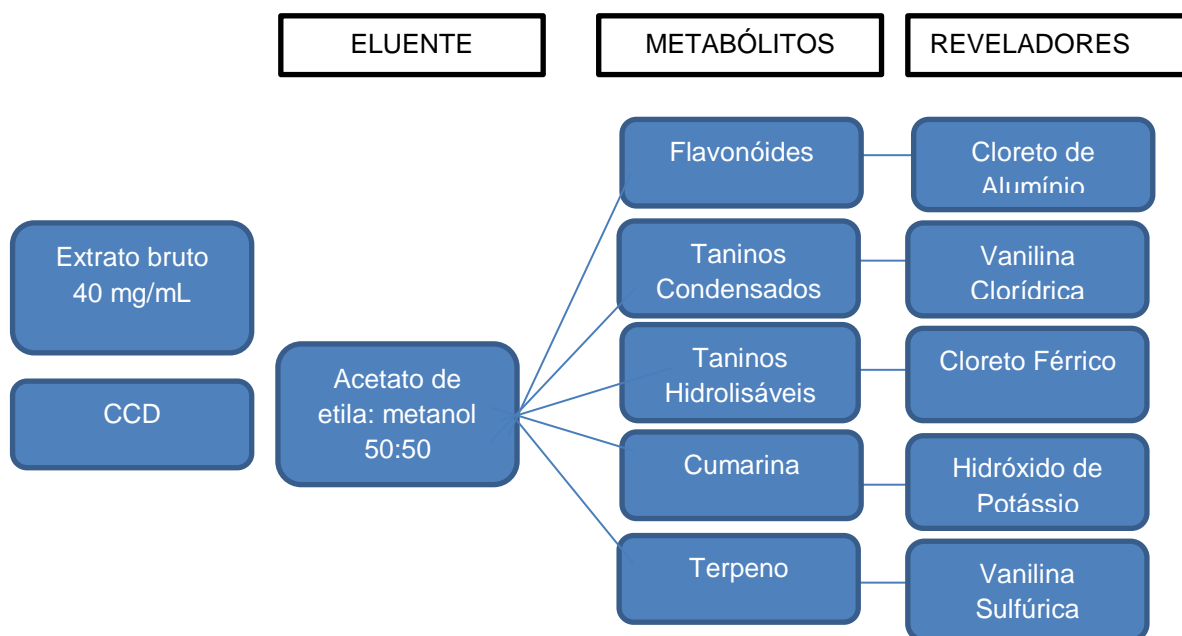
O perfil cromatográfico preliminar do extrato metanólico feito via cromatografia em camada delgada (CCD), para detecção de terpenos, cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis para avaliação desses metabólitos existentes no extrato, segundo a metodologia descrita por Wagner e Bladt (2009) com adaptações.



Foram utilizados os seguintes padrões de referência para as classes de metabólitos: quercetina e ácido gálico para flavonoides e taninos respectivamente; esculina para cumarinas e timol para terpenos. Foram utilizadas cromatoplasacas de alumínio e sílicagel 200 µm da marca Silicycle® com 9 cm de largura e 6 cm de altura, tendo altura de corrida de 5 cm.

As amostras dos extratos foram aplicadas na origem das cromatoplasacas na concentração de 40 mg/mL em metanol. Para detecção de flavonóides se utilizou o revelador cloreto de alumínio à 1 %; para detecção de taninos condensados o revelador foi vanilina clorídrica 1 % com aquecimento, e para hidrolisáveis cloreto férrico a 1 % com aquecimento; para detecção de cumarinas foi utilizado o revelador hidróxido de potássio à 5% e para a detecção de terpenos foi utilizado o revelador vanilina sulfúrica à 1% com aquecimento (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma do protocolo da CCD



Fonte: Autor

Todas as placas foram eluídas em fase móvel composta pela mistura dos solventes acetato de etila: metanol (50:50) (v/v). Após a eluição, as placas cromatográficas foram secas e observadas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, sendo registrados os resultados. Os aspectos considerados foram cor e fator de retenção (Rf) antes e após a observação com luz UV e mudanças

de coloração com o uso de reveladores sempre em comparação com padrões ou amostras de referência.

### 5.2.3 Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato metanólico de *Morinda citrifolia*.

A avaliação da toxicidade oral aguda foi realizada de acordo com a metodologia descrita na OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development (2001), "Toxicidade Aguda de Classe" que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg) e o número de animais para cada dose a ser utilizada. Seguindo este protocolo, os animais foram divididos em 2 grupos de 3 animais cada. O grupo 1 (controle) recebeu apenas o veículo (0,2 mL de água destilada), o grupo 2 (estudo) recebeu a dosagem de 2000 mg/kg do extrato metanólico seco do noni diluído em 0,2 mL de água destilada, a administração foi realizada por gavagem com os animais em jejum. O uso dos animais neste teste foi aprovada pelo Comitê de ética sob o número 1120190087.

Figura 6 - Contenção e gavagem em camundongo



Fonte: Autor

O teste foi repetido com o mesmo número de animais, totalizando 12 camundongos fêmeas. Os animais foram observados individualmente a cada 30 minutos nas quatro primeiras horas, após esse período, e diariamente durante 14 dias. Os parâmetros observados foram: irritabilidade, resposta ao toque, tônus corporal,

força para agarrar, tremores, convulsões, lacrimação, micção, diarreia, respiração, cianose, letargia, alterações de pelos, olhos e mucosas, salivação, sono, coma, dor e sofrimento. O ainda os animais foram pesados nos dia 0, 7 e 14 afim de analisar possível alteração fisiológica não observada em outros parâmetros.

Os animais sobreviventes foram anestesiados com solução de 1,25 mL xilazina e 0,2 mL cetamina/100 g, conforme descrito por Flecknell (1996) e Kohn (1997), e sacrificados por deslocamento cervical.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Avaliação fitoquímica de *Morinda citrifolia***

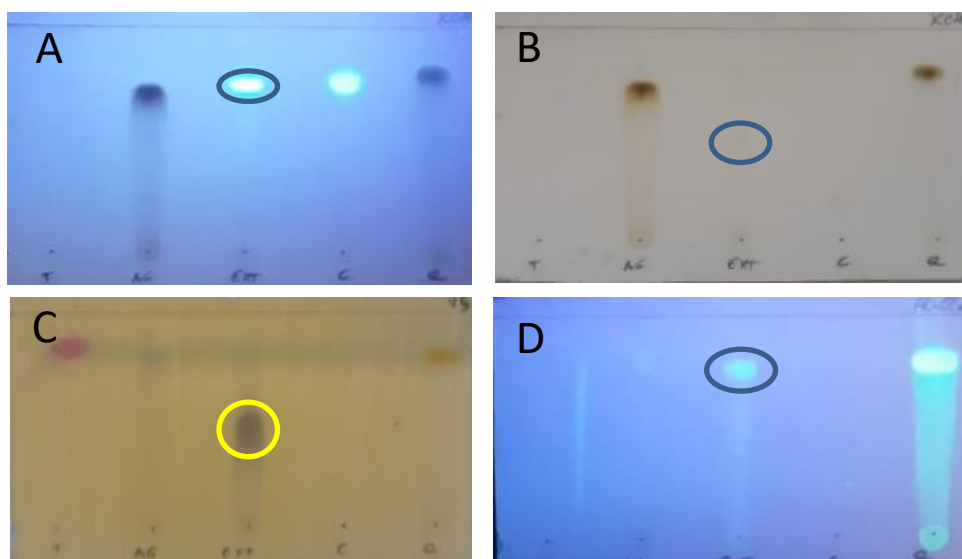
#### 6.1.1 Teor de umidade

O resultado do teor de umidade encontrado (88,2%) está de acordo com os dados da literatura, que apresentam valores de 89,44% (CORREIA, 2010), 92% (CHAN-BLANCO, 2006), 90,66% (FARIA ET. AL., 2014) considerando que a água é o componente mais abundante na fruta estudada.

#### 6.1.2 Perfil cromatográfico do extrato metanólico de *m. citrifolia*

As análises cromatográficas via CCD realizadas no extrato metanólico de *M. citrifolia* evidenciaram a presença de taninos hidrolisáveis, cumarinas, terpenóides e flavonóides em comparação com as colorações dos padrões de referência, detalhados na tabela 2 e figura 8.

Figura 7 - Cromatogramas de CCD: A– Teste para detecção de cumarinas; B – teste para detecção de taninos condensados; C – Teste para detecção de terpenos e D teste para detecção de flavonoides



Fonte: Autor

**Quadro 2** - Classes de substâncias do extrato metanólico de frutos *M. citrifolia* por CCD.

Classes de substâncias	Resultados
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	++
Cumarinas	+++
Terpenóides	+++
Flavonóides	+++

Legenda: (+) presença, (-) ausência

Intensidade da coloração: forte (+++), moderada (++) , fraco (+)

Fonte: Autor

Os resultados descritos no quadro 2 foram semelhantes aos de Deng et al. (2007), que descreve que dentre os compostos ativos encontrados no fruto, estão, entre outros as cumarinas e os flavonóides, e conforme Faria et. al., (2014), a polpa



GRUPO: 2 (2ª repetição)															
	DIA														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Peso	28,9							41,7							43
Parâmetros	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

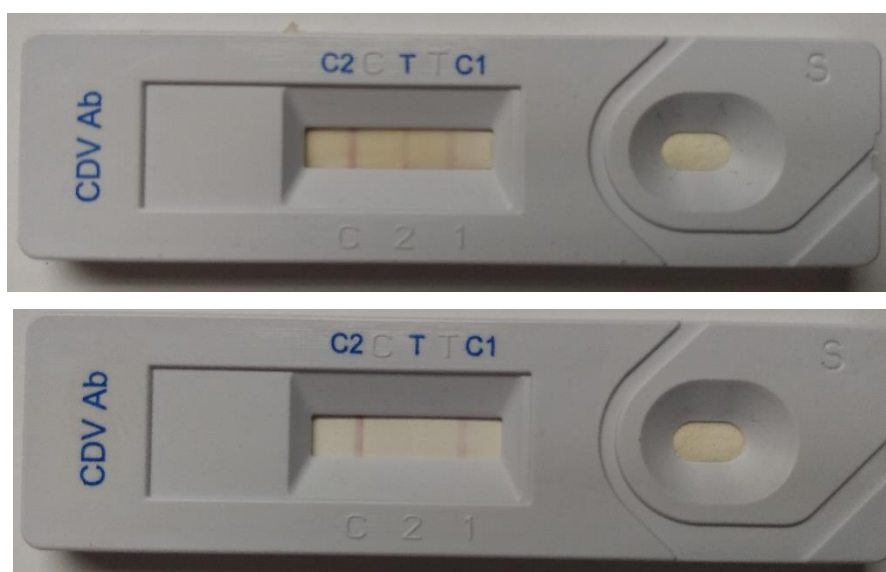
Legenda: N – Normal

Fonte: Autor

### 6.3 Animais em experimentação

Os animais positivos no teste rápido com alguma alteração neurológica prevista no quadro 1 apresentaram 3 listas no teste cromatográfico, no entanto animais, mesmo os que apresentaram sinais de comprometimento neurológico e foram negativos no teste não foram objeto de estudo, conforme previsto em metodologia. A comparação dos resultados positivos e negativos estão sintetizados na figura 8.

Figura 8 - Alere Cinomose Ac Test Kit®. Na figura superior, presença de três bandas rosa, uma sob a banda C2 (controle), a outra sob a banda C1 (controle) e outra sob letra T (teste) indicando um teste com resultado positivo. Na figura inferior, presença de duas bandas rosa sob a letra C2 e C1, indicando que o teste foi válido mas o resultado negativo.



Fonte: Autor

### 6.3.1 Taxa de mortalidade

Quando se diagnostica a afecção do SNC e apresenta um déficit neurológico, a alternativa conhecida é a eutanásia, essa decisão é baseada nos altos índices de mortalidade (TORRES, 2016), e ainda, segundo Oliveira et al. (2009), o prognóstico é desfavorável quando o vírus acomete o sistema nervoso central. Greene (2015) afirma que não há tratamento específico para a cinomose, e devido a isso na maioria dos casos utilizam-se protocolos terapêuticos sintomáticos.

Neste trabalho se observou a morte de dez animais, equivalendo a 58,8% do total dos animais. No grupo controle a taxa de mortalidade foi de 77,8%. Os valores apresentados neste grupo foram descritos por Catroxo (2003) afirmando que a taxa de mortalidade varia entre 30 a 80% dos animais, e Apeel e Summers (1999) considera que essa taxa gira em torno dos 50%, e reforça que é a doença que mais leva ao óbito entre os cães.

Na avaliação de Torres (2016), que tratou oito animais positivos para cinomose com sintomatologia neurológica, com medicamentos alopáticos, utilizando mesmo protocolo deste estudo, observou a morte de sete animais, equivalendo a 87,5% dos cães, resultado superior a taxa de mortalidade deste experimento. Catroxo (2003) considera que os animais sobreviventes podem apresentar sequelas, o que possivelmente ocorreu com os alguns dos animais sobreviventes.

No grupo 2 a taxa de mortalidade foi de 37,5%, sendo que os resultados observados por Torres (2016), utilizando 500 mg de pó de noni/animal/dia durante 30 dias foram de 14,2%, utilizando um número menor de animais comparado a este experimento. A taxa geral de morte observada no mesmo estudo foi de 53,3%. Poucos estudos relatam o uso de *Morinda citrifolia* no tratamento de cães com cinomose, porém podemos observar que taxa de mortalidade do grupo 2 deste estudo são bem inferiores à média descrita na literatura. Devido ao maior número de animais sobreviventes no grupo 2 foi possível um enquadramento melhor nos resultados.

### 6.3.2 Hematologia e bioquímica dos animais

Os resultados do dia 0 apresentados no hemograma, dos 17 animais, revelam 8 (47%) animais com anisocitose, enquanto Silva et al., (2005) não observou este parâmetro em estudo com cães com cinomose, o mesmo autor relata que a

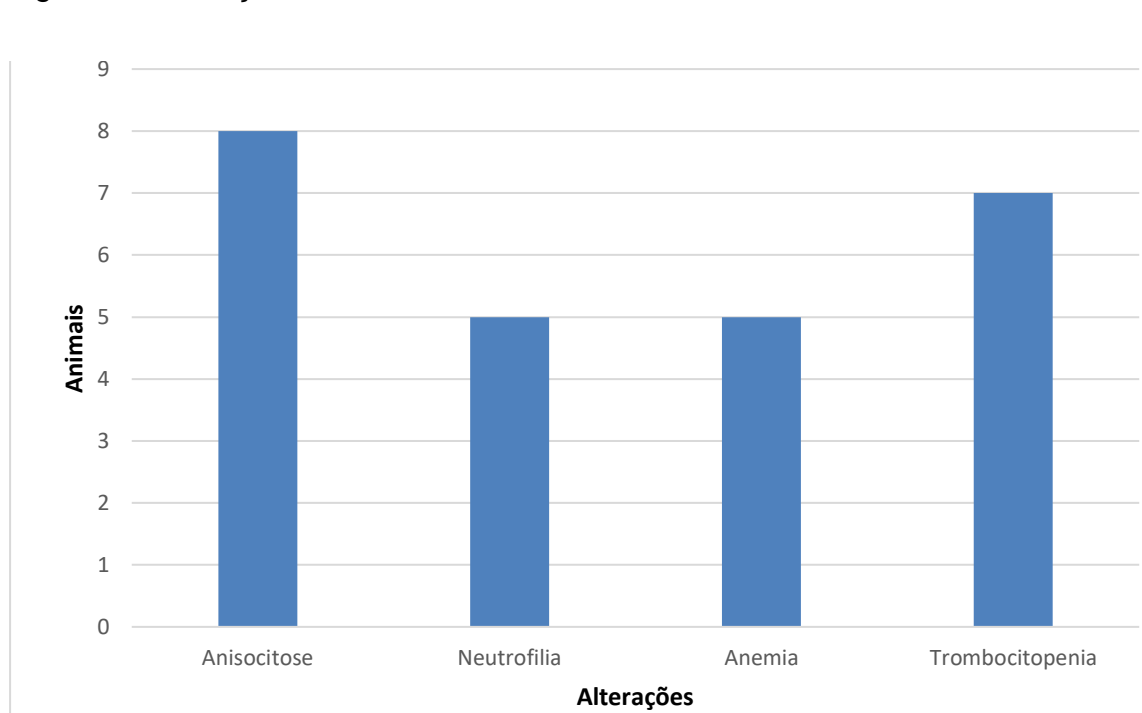
anisocitose revela a regeneração medular, e é caracterizada pela diferença de diâmetro celular e pode ser quantificada em cruzes: 1+,2+ e 3+ (RISTOW, 2016). Neste trabalho, a neutrofilia ocorreu em 5 animais (29,1%), porém Amude et al., (2007) descreveram a neutrofilia em 12% dos cães com cinomose, e Silva (2005) observou este parâmetro em 8% dos animais. A neutrofilia ocorre em animais com cinomose provavelmente devido a imunossupressão causada pelo vírus, sendo comum infecções bacterianas no trato digestivo e respiratório (GEBARA et al., 2004).

A anemia ocorreu em 5 animais (29,1%), resultado superior ao de Amude et al., (2007) que detectou 12,5% de animais anêmicos, e inferior ao de Silva (2005), que observou 61% de anemia em cães com a mesma doença. Nos casos de infecção por cinomose pode ocorrer destruição das hemácias por deposição de imunocomplexos na membrana eritrocitária (MENDONÇA et al., 2000), ou ainda pode ocorrer redução da eritropoiese por falência da medula óssea devido à ação direta do vírus nesse tecido (MEYER et al., 1995).

A trombocitopenia ocorreu em 7 animais (41,1%), resultado aproximado ao de Silva et al., (2017) em que foi detectado trombocitopenia em 35,8% dos animais, o autor ainda relata, concordando com Silva et al., (2005) que este parâmetro foi um dos achados de maior significância nos estudos. Pouco se sabe sobre o mecanismo responsável pela trombocitopenia associada a infecções virais, porém em relação ao gênero *Morbillivirus* já se observou um aumento de anticorpos anti-plaquetas (SILVA, 2004).



Figura 9 - Alterações hematimétricas observadas nos cães com cinomose

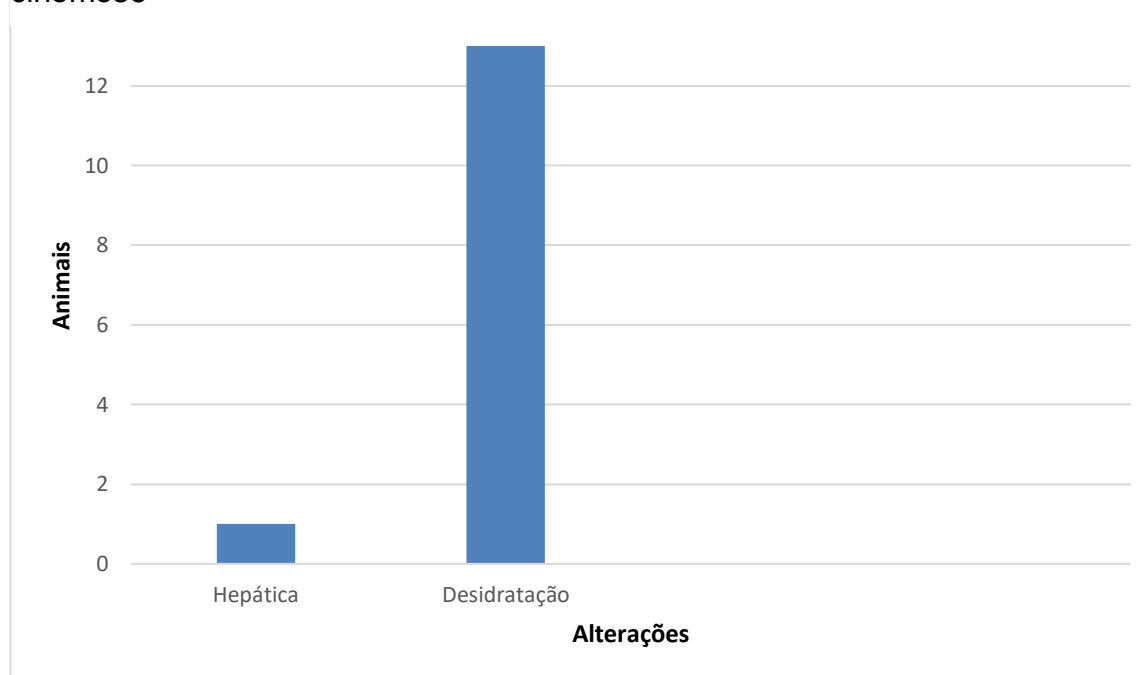


Fonte: autor

Em relação aos testes da função hepática, o animal G1-2 apresentou alteração nos valores de ALT (Alanina Aminotranferase), sugerindo uma possível lesão hepática, e o animal G1-6 não foi possível essa avaliação devido intensa hemólise. De acordo com Thrall (2015), a ALT é uma enzima de extravasamento, utilizada, por vezes como único teste para se detectar lesão nos hepatócitos, e um insulto na membrana hepatocelular resulta num aumento da ALT sérica (MEYER, 1995).

Os testes de avaliação renal também não apresentaram grandes alterações, os exames revelam que 13 (76,4%) dos cães estavam desidratados, considerando a relação Uréia/Creatinina, segundo Thrall (2015), em um animal desidratado, a razão Uréia/Creatinina é  $> 30$ , já em cães e gatos hidratados, essa razão é de 20. De acordo com o mesmo autor uma das funções do sistema urinário é a de excretar a uréia e a creatinina, e, quando essa função está comprometida esses valores aumentam, condição chamada de azotemia, porém isso só será observado quando 75% dos néfrons estejam afuncionais.

Figura 10 - Alterações bioquímicas e desidratação observadas nos cães com cinomose



Fonte: autor

### 6.3.3 Hematologia e bioquímica comparativa

Os dados hematimétricos não apresentaram diferenças significativas entre o início e o fim do tratamento nos dois grupos, e o desvio padrão apresentou valores aproximados na série vermelha, porém a série branca foi bastante heterogênea, isso deve ter ocorrido devido o fato dos animais terem sido escolhidos aleatoriamente, quando apresentavam qualquer alteração neurológica descrita na metodologia, sem agrupá-los a partir outras condições de saúde. Torres (2016), aplicando o mesmo teste também não observou diferenças significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Quadro 4 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento alopatóico

Grupo 1 Tratamento controle						
Parâmetros	Início do Tratamento		Termo do Tratamento		Valor p	Valores de referência
	Média	±DP	Média	±DP		
Hemácias	5,46 <sup>a</sup>	1,47	4,49 <sup>a</sup>	0,80	P = 0,698	5,5 – 8,5
Hematócrito	32,41 <sup>a</sup>	9,92	28,60 <sup>a</sup>	0,99	P = 0,470	37- 55
Hemoglobina	10,40 <sup>a</sup>	3,01	9,50 <sup>a</sup>	0,14	P = 0,694	12-18
Leucócitos totais	14061,1 <sup>a</sup>	3904,31	12050,00 <sup>a</sup>	3889,09	P = 0,526	6.000 – 17.000
Linfócitos	2342,56 <sup>a</sup>	1513,97	1602,50 <sup>a</sup>	1082,58	P = 0,536	1.00 – 4.800
Monócitos	352,44 <sup>a</sup>	238,10	194,50 <sup>a</sup>	143,54	P = 0,402	150 -1.350
Neutrófilos	11012,56 <sup>a</sup>	3994,14	10058,50 <sup>a</sup>	2519,42	P = 0,759	3.000 – 11.500
Plaquetas	199111,11 <sup>a</sup>	120384,22	248000,00 <sup>a</sup>	96166,52	P = 0,609	20.000- 500.000
Taxa de mortalidade	77,80%	-	-	-	-	-

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias ( $p > 0,05$ ). 1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de referência segundo Meyer et al., (1995).

Fonte: Autor

Quadro 5 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento com extrato metanólico seco de noni

Grupo 2 Tratamento com extrato metanólico seco de noni.						
Parâmetros	Início do Tratamento		Termo do Tratamento		Valor p	Valores de referência
	Média	±DP	Média	±DP		
Hemácias	5,57 <sup>a</sup>	1,18	6,61 <sup>a</sup>	1,40	P = 0,412	5,5 – 8,5
Hematócrito	36,63 <sup>a</sup>	8,23	32,06 <sup>a</sup>	20,91	P = 0,585	37 - 55
Hemoglobina	11,33 <sup>a</sup>	3,85	13,30 <sup>a</sup>	4,14	P = 0,400	12 - 18
Leucócitos totais	17025,00 <sup>a</sup>	6716,45	14240,00 <sup>a</sup>	3911,27	P = 0,422	6.000 – 17.000
Linfócitos dia 0	3393,88 <sup>a</sup>	2058,34	3760,80 <sup>a</sup>	645,25	P = 0,710	1.000 – 4.800
Monócitos	563,25 <sup>a</sup>	581,97	292,20 <sup>a</sup>	286,01	P = 0,683	150 – 1.350
Neutrófilos	12683,75 <sup>a</sup>	4754,37	9730,80 <sup>a</sup>	3561,92	P = 0,260	3.000 – 11.500
Plaquetas	743750,00 <sup>a</sup>	1321353,50	245800,0 <sup>a</sup>	45400,44	P = 0,222	200.000-500.00
Taxa de mortalidade	37,50%	-	-	-	-	-

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias ( $p > 0,05$ ). 1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de referência segundo Meyer et al., (1995).

Fonte: Autor

Na comparação entre dos valores bioquímicos do início e fim do tratamento, as diferenças significativas ocorreram apenas nos valores de AST e ALT, podendo ter ocorrido devido a um animal deste grupo estar com os valores extremamente altos saindo da curva de homegeneidade para este parâmetro, enquanto que no grupo tratamento os valores não apresentaram diferenças significativas, as informações descritas sugerem que o extrato metanólico do noni não tiveram efeitos hepato ou nefrotóxicos na concentração de 1000 mg/animal, corroborando com a avaliação de toxicidade aguda com extrato metanólico de noni do presente estudo e ainda com Torres (2016), que também não observou alterações nestes parâmetros utilizando 500 mg de pó de noni/animal/dia durante 30 dias em cães com cinomose. As observações acima corroboram com o que foi verificado nos testes de toxicidade em camundongos descritos no item 6.2 deste trabalho.

Quadro 6 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento convencional.

Grupo 1 Tratamento enrofloxacina						
Parâmetros	Início do Tratamento		Termino do Tratamento		Valor p	Valores de referência
	Média	±DP	Média	±DP		
ALT (U/L)	50,15 <sup>a</sup>	11,02	41,98	0,46 <sup>b</sup>	P = 0,041*	10-80
AST (U/L)	59,04 <sup>a</sup>	27,32	38,13	2,65 <sup>b</sup>	P = 0,047*	10-80
Creatinina (mg/dl)	0,87 <sup>a</sup>	0,44	0,85 <sup>a</sup>	0,06	P = 0,777	0,5-1,5
Uréia (mg/dl)	29,99 <sup>a</sup>	12,49	36,15 <sup>a</sup>	22,84	P = 0,156	10-60
Taxa de mortalidade	77,80%	-	-	-	-	-

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias ( $p > 0,05$ ). 1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de referência segundo Meyer et al., (1995).

Fonte: Autor

Quadro 7 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, antes e após o tratamento com extrato metanólico seco de noni

<b>Grupo 2 Tratamento com extrato metanólico seco de noni.</b>						
<b>Parâmetros</b>	<b>Início do Tratamento</b>		<b>Termino do Tratamento</b>		<b>Valor p</b>	<b>Valores de referência</b>
	<b>Média</b>	<b>±DP</b>	<b>Média</b>	<b>±DP</b>		
<b>ALT (U/L)</b>	43,2 <sup>a</sup>	17,93	45,26 <sup>a</sup>	39,04	P = 0,817	10-80
<b>AST (U/L)</b>	74,8 <sup>a</sup>	37,95	58,44 <sup>a</sup>	24,94	P = 0,775	10-80
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,69 <sup>a</sup>	0,27	0,95 <sup>a</sup>	0,26	P = 0,423	0,5-1,5
<b>Uréia (mg/dl)</b>	31,05 <sup>a</sup>	16,66	19,08 <sup>a</sup>	10,74	P = 0,063	10-60
<b>Taxa de mortalidade</b>	37,50%	-	-	-	-	-

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias ( $p > 0,05$ ). 1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de referência segundo Meyer et al., (1995).

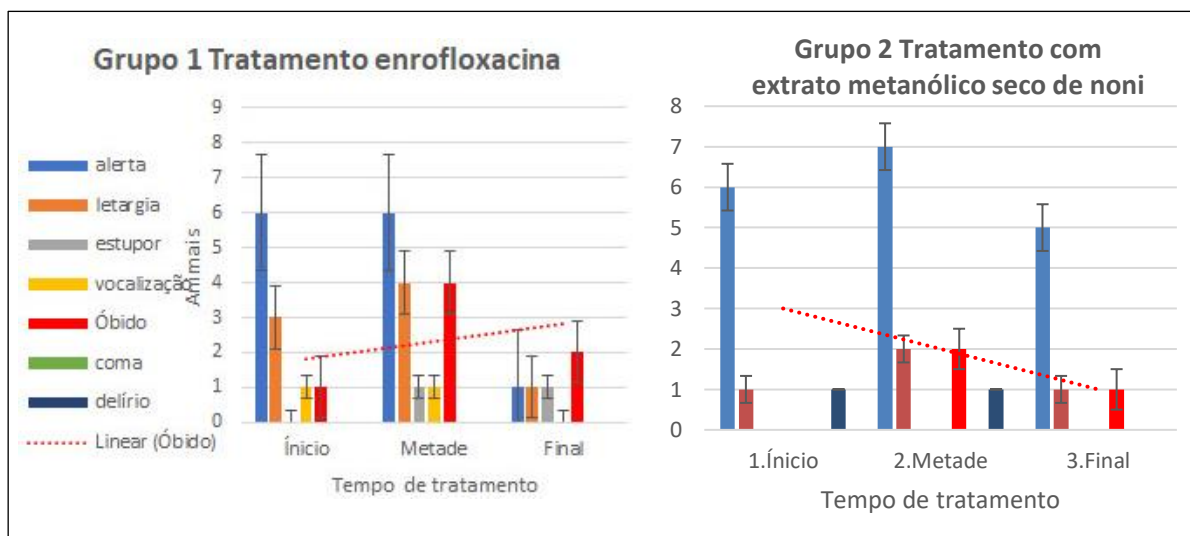
Fonte: Autor

#### 6.3.4 Avaliação dos sintomas neurológicos

Devido à variedade de cepas do vírus da cinomose a localização e intensidade das lesões no SNC também são variáveis, observada pelo tropismo viral pelas células no SNC, algumas cepas produzem lesão grave nos neurônios, principalmente na substância cinzenta, com pouca desmielinização, enquanto outras cepas apresentam maior afinidade por células da glia, particularmente astrócitos, e infectam menos os neurônios, ou causando principalmente desmielinização (SUMMERS et al., 1984).

Apesar da utilização de nomenclaturas diferentes observa-se que na avaliação do estado geral do animal, os autores relatam que a maioria deles se apresentaram com o nível de consciência diminuído, o estado de alerta pode ser atribuído quanto ao comportamento do animal e sua interação com o ambiente e o observador (RAJÃO et al., 2013). Assim, neste trabalho, os animais que se estavam responsivos aos estímulos visuais e sonoros foram alocados no grupo de animais em alerta, independente de outras condições.

Figura 11 - Nível de consciência dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni

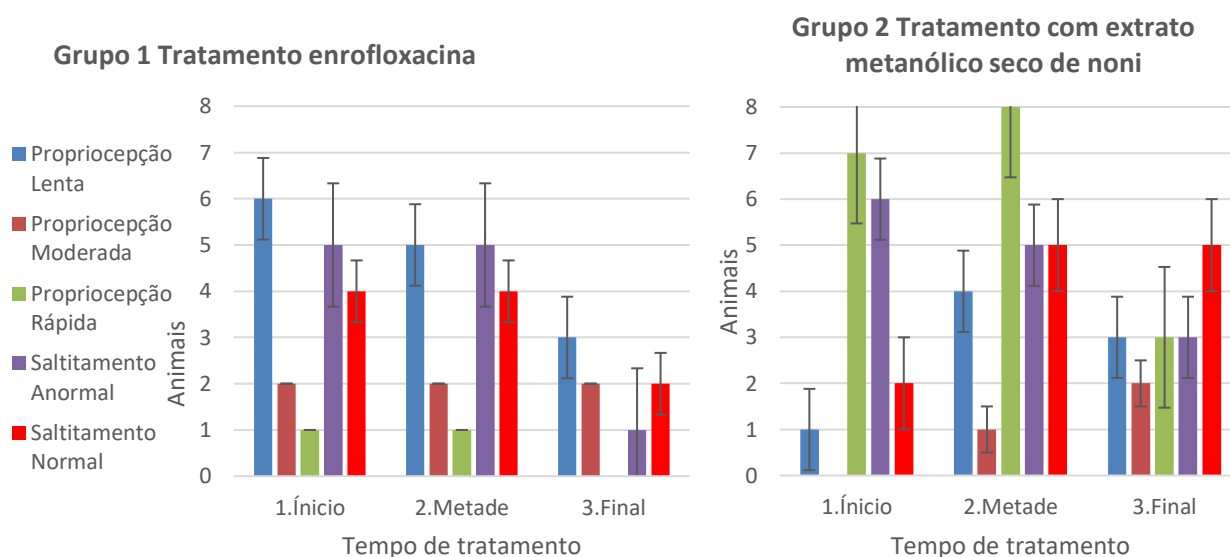


Fonte: Autor

A figura apresenta o número de animais em que se observaram os sinais descritos. No grupo 1 o nível de consciência teve uma tendência de queda principalmente devido aos óbitos ocorridos durante o tratamento, enquanto que a vocalização e o estado de estupor evoluíram com o decorrer do tempo. No grupo 2 observa-se um declínio no número de óbito com o decorrer do tratamento, enquanto que o estado de alerta teve uma pequena diminuição provavelmente aos óbitos que ocorreram no grupo.

Alterações sensitivas refletem a perda da propriocepção que podem manifestar por ataxia (VIANNA, 2000), a ataxia propioceptiva associada aos déficits propioceptivos são os primeiros sinais clínicos em uma lesão medular (RAJÃO et al., 2013), também podendo ser resultantes de comprometimento do sistema reticular ativador (SRA), que controla os ciclos sono-vigília (VIANNA, 2000), provenientes de lesões do tronco encefálico (DEWEY, 2006). A paresia e a ataxia são sinais clínicos constantemente observado em cães com cinomose (KOUTINAS, 2002, APEEL E SUMERS, 1999), porém, a frequência dos animais acometidos com esses sinais são divergentes entre os autores.

Figura 12 - Reações posturais dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni



Fonte: Autor

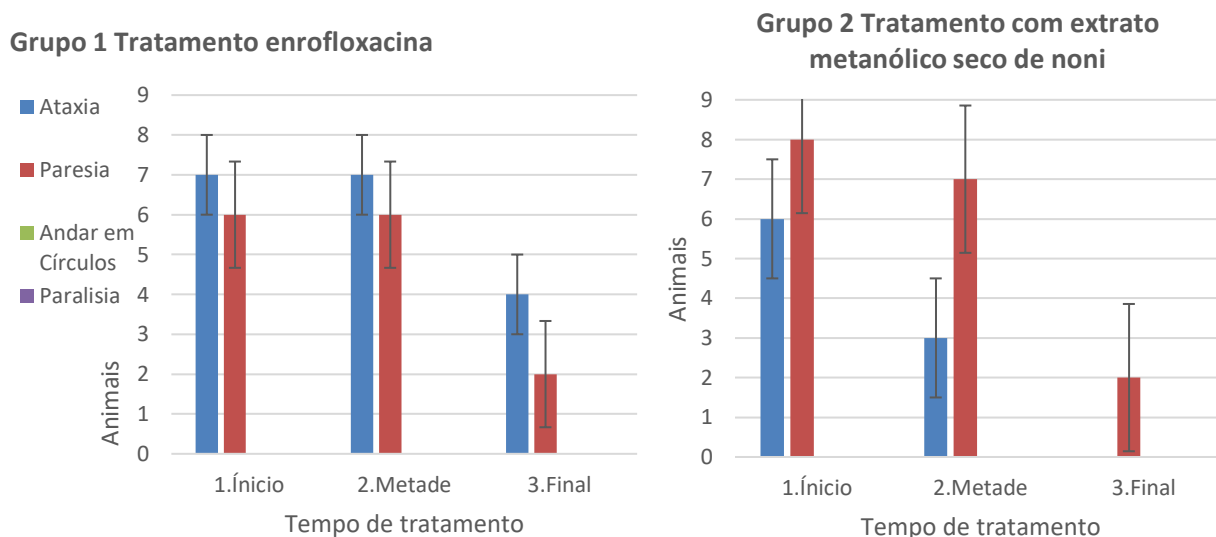
As reações posturais observadas no grupo 1 revelam uma queda nos parâmetros indesejáveis, devido a morte dos animais que apresentavam essas condições, os animais sobreviventes ficaram sequelados nas condições avaliadas. Um dos tutores solicitou a eutanásia do animal ao final do tratamento por não observar melhora significativa no quadro de saúde. No grupo 2, a figura apresenta uma migração da propriocepção rápida para moderada, porém o teste de saltitamento passou de anormal para normal no decorrer da pesquisa.

Os valores para ataxia e paresia neste trabalho (64,7%) foram menores que os resultados de Aguiar (2017), que observou este sinal em 75% dos cães, porém segundo o mesmo autor 35% deles estavam com paresia, resultados diferentes de Silva (2009), que descreveu a ataxia em 25% dos animais e paresia em 2,8%, enquanto que Tudury (1997) observou a paresia em 69,12% dos cães com cinomose, resultado para paresia mais aproximado aos desse trabalho.

De acordo com Apeel e Summers (1999), a depender da virulência, os sinais podem estar mais relacionados à substância cinzenta ou branca do cérebro. Convulsões e mioclonia predominam quando afetada a substância cinzenta; ataxia de

incoordenação, paresia, paralisia e tremores musculares na doença da substância branca.

Figura 13 - Marcha dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni

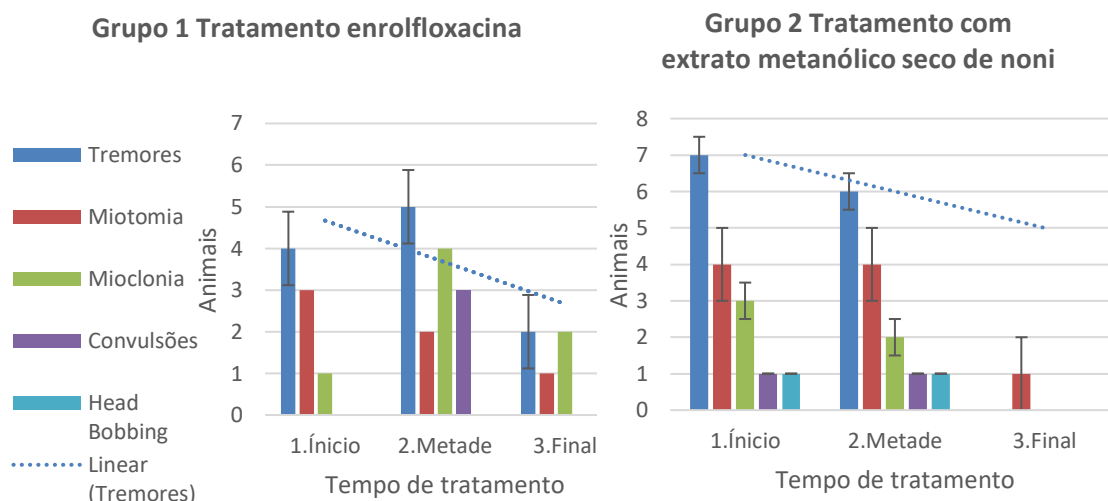


Fonte: Autor

Na avaliação da marcha dos animais, observou-se, de acordo com a figura 13, que nenhum animal apresentou paralisia ou andar em círculos, e que, no grupo 1 houve diminuição dos sinais de ataxia e paresia, porém, os animais sobreviventes ainda apresentavam estes sinais, e no grupo 2 a ataxia foi suprimida no terço final do tratamento, no entanto, a paresia, mesmo diminuída ainda foi observada em sobreviventes.



Figura 14 - Movimentos involuntários dos cães com cinomose no início, metade e no final do tratamento alopático e extrato metanólico seco de noni



Fonte: Autor

Na avaliação dos movimentos involuntários o tremor foi o sinal neurológico mais frequente nos dois grupos com tendência de queda por motivos diferentes, o grupo 1, devido à alta taxa de mortalidade, e no grupo 2 houve diminuição destes sinais durante o tratamento. Todos os animais que apresentaram convulsões vieram à óbito, estes, além do tratamento preconizado, receberam fenobarbital oral na dose de 4 mg/kg de 2 a 3 vezes ao dia dependendo da frequência das crises, pois de acordo com Torres (2015) a droga vegetal utilizada no grupo 2 não tem ação anticonvulsivante. O fenobarbital é um benzodiazepínico para controle do estado epilético bem tolerado tanto em cães como em gatos, podendo ser administrado duas ou três vezes/dia (BERENDT, 2004).

Um animal sobrevivente do grupo 1 houve melhora no teste de propriocepção, saindo de moderada para normal, não se observou mais a paresia dos membros, o fato pode ter relação com a administração de complexo B, que age como estabilizador dos neurotransmissores (SPINOSA et al., 1999), porém o animal ainda se apresentava debilitado, provavelmente devido às alterações de ALT e AST observadas em provas bioquímicas ao fim do experimento.

No grupo 2, a avaliação clínica pós tratamento com a droga vegetal gerou expectativas promissoras do uso do extrato metanólico de noni em animais com sintomas neurológicos da cinomose, o estudo revelou que 5 animais (62,5%) tiveram completa remissão dos sinais neurológicos.

A melhora dos sinais neurológicos com utilização do extrato do noni foi relatado por Muralidharan, RaviKumar e Balamurugan (2010), onde se observou melhora nos impulsos nervosos, com seus efeitos favoráveis sobre a atividade locomotora funcionando ainda como neuroprotetor. A desmielinização causado pelos processos oxidativos, gerados a partir da replicação do vírus da cinomose canina (CURTIS, 2013), pode ter sido diminuído pela ação antioxidante dos flavonóides, encontrados de forma intensa no extrato do noni.

Apesar dos terpenos se caracterizarem principalmente por ações anti-inflamatória e antisséptica (FIRN, 2010), Bajpai et al. (2016), observou a atividade antiviral promovida por um tipo de diterpeno, frente ao H1N1. MOREIRA (2017) obteve resultados satisfatórios com extratos obtidos dos frutos e folha do noni em células infectadas com o vírus dengue. Ratnoglik et al.,(2014) revelou que o extrato de metanol de folhas de *M. citrifolia* possuem atividades contra o vírus da hepatite C. Com os resultados acima mencionados podemos sugerir que a diminuição dos sinais neurológicos foram, em parte, ocasionadas pela atividade antiviral do extrato, especialmente por ação dos terpenos.

Silva (2012) relatou atividade antiinflamatória das cumarinas pela inibição de mediadores pró inflamatórios, o óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a cumarina encontrada no extrato metanólico do noni e administrada aos cães pode ter sido um dos fatores que minimizaram os danos causados pela encefalite, comum em cães com cinomose. Os resultados refletem uma concordância com os resultados de Torres (2016), em que observou a eficácia do noni na remissão dos sinais neurológicos.

## **7 CONCLUSÃO**

Os bioativos encontrados com maior intensidade no extrato metanólico do noni, observados por cromatografia em camada delgada em comparação com os padrões, foram da classe dos flavonóides, terpenos e cumarinas. O extrato não foi considerado tóxico de acordo com a metodologia descrita pela OECD.

A administração oral do extrato metanólico do noni na dose de 1000mg/animal se mostrou moderadamente eficiente, na remissão dos sinais neurológicos causados

pela cinomose se comparado ao grupo controle. A taxa de mortalidade foi o que trouxe a mais perceptível diferença entre grupos, esse fator por si só deve ser considerado, pois os anticorpos produzidos é que, fisiologicamente destroem os vírus, e proporcionar uma sobrevivência maior ao animal, dá ao organismo tempo para a produção dessas imunoglobulinas

Os resultados nos sugerem que a ação dos vários bioativos presentes no fruto do noni e/ou a sua ação conjunta possuem propriedades que reduzem a sintomatologia neurológica da cinomose em cães, abrindo uma janela científica para o isolamento dos compostos e futuras formulações farmacológicas a serem utilizadas no tratamento da cinomose canina.

A partir da coleta dos dados hematológicos, bioquímicos e neurológicos não foi possível estabelecer um padrão que pudesse determinar o prognóstico do animal, necessitando para isso outros estudos para esclarecer melhor essa condição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHISA, T.; MATSUMOTO, K.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; SEINO, K.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-inflammatory and potential cancer chemopreventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 754-757, 2007.

ALVES, D. L., SILVA, C. R. **Fitohormônios: Abordagem natural de terapia hormonal**. São Paulo: Atheneu, 2003.

A.M. AMUDE, A.A. ALFIERI \*, A.F. ALFIERI. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science** 82 (2007) 416–422

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine distemper: Current Status, L.E. Carmichael (Ed.) **Publisher: International Veterinary Information Service**. 1999.

ARNS, C.W.; SPILKI, F.R.; ALMEIDA, R.S. Paramyxoviridae. In: **Virologia Veterinária Virologia Geral e Doenças Víricas**. Flores, E.F. Santa Maria. UFSM, 2012. P. 759-792.

BAJPAI, V. K. et al. Antiviral potential of a diterpenoid compound sugiol from *Metasequoia glyptostroboides*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 29, n. 3, p. 1077-80, 2016.

BEINEKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 1-18, Jan. 2009.

BERENDT, M. Epilepsy. In: VITE, C.H. (Ed.). *Braund's clinical neurology in small animals: localization, diagnosis and treatment*. **Ithaca: International Veterinary Information Service**, 2004.

BIRCHARD SJ, SHERDING RG. Cinomose canina. In: Birchard SJ, SherdingRG. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca;1998. p. 120.

BRAGANÇA ALR. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Niterói: EDUFF; 1996.

BRANDÃO, M. G. L et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopocia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, 2006.p. 408-420. (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2009.

BRASIL a. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica** – Brasília, 2012.

BRASIL b. Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira. 1ª Ed. **Primeiro Suplemento**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2018.

BRASIL c. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. 2010

BRASIL d. **Cidade Brasil**. Disponível em: <https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-belterra.html>. Acesso em 11 de agosto de 2019.

BRAZ, G. F. **Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina**, 2009. 43 f. Dissertação

RAJÃO, M. P. GUTIERREZ, S. MARTINS, C. B. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, n. 69. FEP MVZ Editora. 2013

CATROXO, M. H. B. **Biológico**. v.65, n.1/2, p.1-2, jan./dez., São Paulo, 2003.

CHAN-BLANCO, Y; VAILLAN, F.; PEREZ, A.M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.; BRAT, P. **The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties**. J. Food Comp. Anal., v. 19, n. 6-7, p. 645-654, sept-nov.2006.

CHRISMAN, C. L. **Problems in small animal neurology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (Brasil) Resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008. **Diário Oficial da União** de 25-04-2008, Seção 1, págs. 109 e 110.

CORRÊA, C.N.M. Cinomose. In: **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. Corrêa, W.M.; Corrêa, C.N.M. Rio de Janeiro, Medsi, 1992. P.655-670.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.4, p.500-506, 2011.

CORRÊA, W. M & CORRÊA, C.N.M. **Cinomose**. Enfermidades dos animais domésticos. Invarella. São Paulo, 1991.

CORREIA, A. A. S. **Maceração enzimática da polpa de noni (*Morinda citrifolia*)**. Dissertação de mestrado. Fortaleza 2010 – Universidade Federal do Ceará

CURTI, M. C; ARIAS, M. V. B; ZANUTTO, M. S. Avaliação de um kit de imunoenensaio cromatográfico para detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2383-2390, nov./dez. 2012.

CURTIS, A. O. **Parâmetros de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul. 2013.

DENG, s. et al. Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. **J. Nat Prod.**, v. 70, p. 859-862, 2007.

DEWEY, C. W. Neuroanatomia funcional e não funcional: a chave para a localização da lesão. In: DEWEY, C. W. (Org) **Neurologia de cães e gatos**. Guia prático. São Paulo: Roca, 2006. cap. 1, p. 1-18.

ELDIN S, DUNFORD A. 2001. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole.

ETTINGER, Stephen J.; FELDMAN, Edward C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5. Ed. V. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008.

FARIA, W. C. S; BETT, S. C; SANTOS. C, G, B; BRASIL. A, S; GAUTO. R, F; BESERRA. A. M. S. S; OLIVEIRA. A, P. **Caracterização físico-química e análise fitoquímica preliminar do fruto noni (*Morinda citrifolia* L.) Produzido na Cidade de Cuiabá – MT**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil. v. 08, n. 01: p. 1208-1215, 2014.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico: cães, gatos, equinos e silvestres**. – 2. Ed. – São Paulo: Roca, 2008.

FENNER, W. R. Moléstias do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 82, p. 819-889.

FENNER, W. R. Doenças do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. CC. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 104, p. 586-638.

FIRN, R. **Nature's Chemicals**. Ed. Oxford: Oxford University Press. 2010.

FLECKNELL P 1996. **Laboratory Animal Anesthesia**. New York: Academic Press.

GAMA, F.G.V. NISHIMORI, C.T.; SOBREIRA, M.R. **Evaluation of electrophoretic profile and albumin quota in the cerebrospinal fluid of dogs with distemper showing or not nervous signs**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n.1, p.77-80, 2007.

GAMA, F. G. V.; NISHIMORI, C. T.; SOBREIRA, M. R.; SANTANA, A. E. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. In: **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 596-601, mai./jun., 2005.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. In: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte - MG, v.56, n.2, p.168-174, 2004.

GREENE, C. E; APPEL, M, J. Canine distemper. In: GREENE, CC. E. (Org) **Infectious diseases of the dog and cats**. 3th ed. St. Louis. Saunders Elsevier, 2006. Cap 3, p. 25-41.

GREENE,C. E. & VANDEVELDE,M. (2015). Cinomose. In C. E. Greene (Ed.), **Doenças infecciosas em cães e gatos**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan 2015.

HARADA, S.; HAMABE, W.; KAMIAYA, K.; SATAKE, T.; YAMAMOTO, J.; TOKUYAMA, S. Preventive Effect of *Morinda citrifolia* Fruit Juice on Neuronal Damage Induced by Focal Ischemia. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 405-409, 2009.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, p.136-140, 2000.

JONES, C.T.; HUNT, D. H.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000

KAPIL, S & YEARY, T. J. Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 41 (6): 1069-86, 2011.

KÖKTÜRK, S.; CEYLAN, S.; ETUS, V.; YASA, N.; CEYLAN, S. *Morinda citrifolia* L. (noni) and memantine attenuate periventricular tissue injury of the fourth ventricle in hydrocephalic rabbits. **Neural regeneration**, v. 8, p. 773-782, 2013.

KOHN DF, WIXSON SK, WHITE WJ, BENSON GJ 1997. **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. New York: Academic Press.

KOUTINAS, A.F., POLIZOPOULOU, Z.S., BAUMGA" RTNER, W., LEKKAS, S., KONTOS, V., 2002. **Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis**. *J. Comp. Pathol.* 126, 47–56.

LIMA, C. R., LIMA, R. A; Identificação de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico dos frutos verdes e maduros de *Morinda citrifolia* l. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 3, p. 439-446, set./dez. 2013 - ISSN 1983-1870.

LITFALLA, F.; HAMZÉ, A. L.; PACHECO, A. M.; SOUZA, C. C.; RODRIGUES, C. A. L. S.; FILADELPHO, A. L.; BARIANI, M. H. Cinomose e o processo de desmielinização. In: **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garças-SP, n. 11, jul. 2008.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONA VOGLIA, C. Canine distemper vírus. **Vet Clin Small Anim.** 38: 787-797, 2008.

MARTINS, D. B.; LOPES, S. T. D. A.; FRANÇA, R. T. Cinomose canina: Revisão de literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.2, p.68-76, 2009.

MCCANDLISH, I.A.P. Infecções específicas caninas. In: DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca Ltda, 1 ed., 2001, p.915-952.

MENDONÇA, R. B.; PAGANI, F. F.; MOREIRA DE SOUZA, A. Respostas hematológicas em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose: estudo retrospectivo de casos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 7, p.114-116, 2000.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995, 308 p.

MONTEIRO, B.A. **Efeitos da terapia com células tronco mesenquimais em afecções do sistema nervoso de cães**. Botucatu, 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

MONTEIRO, M. V. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; VASCONCELOS, A. L. F. C. Metodologia aplicada a levantamentos Etnoveterinários. **Veterinária em Foco Canoas**. v.9 n.1 p.76-87 jul./dez. 2011.

MONTI, F. S. **Anticorpos contra o vírus da cinomose em cães vacinados em diferentes estabelecimentos da área urbana do município de Viçosa/MG**. 2004. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

MURALIDHARAN, P.; KUMAR, VR.; BALAMURUGAN, G. Protective effect of *Morinda citrifolia* fruits on beta-amyloid (25-35) induced cognitive dysfunction in mice: an experimental and biochemical study. **Phytother Res**, v. 24(2): 252–258, 2010.

NELSON, R.W., COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2 ed., 2001, p.1084.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1674p.

A. NESSELER, W. BAUMG/IRTNER, K. GAEDKE AND A. ZURBRIGGEN. **Abundant Expression of Viral Nucleoprotein mRNA and Restricted Translation of the Corresponding Viral Protein in Inclusion Body Polioencephalitis of Canine Distemper**. J. Comp. Path. 1997 Vol. 116, 291 301.

NEVES, I. V., TUDURY, E. A., COSTA, R. C. Fármacos utilizados no tratamento das afecções de cães e gatos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 745-766, jul/set. 2010.

OECD 2001. Guideline 423: **Acute Oral Toxicity** - Acute Toxic Class Method. Disponível em [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2001\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2001)4&doclanguage=en). Acesso em 27 de Março de 2020.

OLIVEIRA, Amanda Claudia; ANTONIO, Nayara da Silva; ZAPPA, Vanessa. Cinomose canina – Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VII – Número 12, 2009



OZAKI, A. T. & DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. **Revista Pharmacia Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 14-21, 2006.

PACHAURI, S. D.; TOTA, S.; KHANDELWAL, K.; VERMA, P. R.; NATH, .; HANIF, K.; SHUKLA, R.; SAXENA, J. K.; DWIVEDI, A. K. protective effect of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice. **Behavioural Pharmacology**. v. 139, p. 34-41, 2012.

PALIOTO, G. F.; SILVA, C. F. G.; MENDES, M. P.; ALMEIDA, V. V.; ROCHA, C. L. M. S. C.; TONIN, L. T. D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. Ver. **Bras. Plantas med.**, v. 17. N. 1. P. 59-66, 2015.

PANATO, E.; JUNIOR, A. W.; COTTA, R. M. M.; PELUZIO, M. C. G.; TINÔCO, A. L. A; BRUCKNER, H. Promoção da saúde: a importância das frutas e hortaliças e seu papel no câncer. **Mundo da saúde**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 384-393, 2007.

PINHEIRO, A. O. FMVZ **Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal**. Dissertação – Universidade de São Paulo-2014.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005

RATNOGLIK, S. L.; AOKI, C.; SUDARMONO, P.; KOMOTO, M.; DENG, L.; SHOJI, I.; FUCHINO. H.; KAWAHARA, N.; HOTTA, H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. **Microbiology and Immunology**. V. 58, p. 188-194, 2014.

Rezende HA, Cocco MIM. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem USP** 2002; 36(3): 282-8.

REZENDE, R. S.; COELHO, H.E.; KAMIMURA, R.; SEVERINO, R. S.; OLIVEIRA, P. C.L.; MEDEIROS, A.A.; MAGALHÃES, A.O.C. **Análise microscópica do miocárdio ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose**. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p.117-119, 2009.

RISTOW, L. E. **Interpretando o RDW em Medicina Veterinária**. Disponível em <[https:// biobrasil.com.br/interpretando-o-rdw-em-medicina-veterinaria/](https://biobrasil.com.br/interpretando-o-rdw-em-medicina-veterinaria/)>. Acesso em 27 de Março de 2020.

SANTOS, M. M.; ALMEIDA, M. A.O; BATATINHA, M. J. M. Avaliação dos efeitos de diferentes extratos do Alho (*Allium sativum*) sobre nematódeos gastrointestinais de caprinos. SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 11, Salvador. 1999. **Anais....1999**, Salvador:UFBA,1999.p. 160.

SATIRO, L. S; COSTA, F. B; SOUSA, F. F; SANTOS, K. P; NASCIMENTO, A. M. Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides em frutos de noni. In: III **Simpósio Nacional de estudos para produção vegetal no semiárido**. V. 1, 2018.

SCHOEN, A. M. **Acupuntura Veterinária** – Da Arte Antiga à Medicina Moderna. São Paulo: Roca, 2006. 51p. e 131-141p.

SHERDING, R.G. **Cinomose**. In: SHERDING, R. G. **Manual Sanders**: Clínica de Pequenos Animais. São Paulo: Roca Ltda, 2003. Cap. 11, p. 117-120.

SILVA, L.H. Queiroz da; MORINISHI, C.K.; NUNES, C.M. Diagnóstico diferencial entre a raiva e a cinomose canina em amostras de cérebro de cães examinadas no período de 1998 a 2001 na região de Araçatuba, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.3, p.317-321, 2004.

SILVA, I.N.G; GUEDES, M.I.F; ROCHA, M.F.G; MEDEIROS, C.M.O; OLIVEIRA, L.C; MOREIRA, O.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.136-139, 2005.

SILVA, M. C; **Neuropatologia da cinomose canina**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2009.

Spinosa,H. S.,Górniak,S. L. &Bernardi,M. M. (1999). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

SPITZBARTH, W. BAUMGÄRTNER, A. BEINEKE. The role of pro- and anti inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2012; doi: 10.1016/j. vetimm. 2012.04.005.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. .; De LAHUNTA, A **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995. p.527.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. G. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 94, n. 1, p. 65-75, Jan. 1984.

THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

TIPOLD, A., VANDEVELDE, M., & JAGGY, A. (1992). Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, 33(10), 466–470.

TOMAZZONI MI, NEGRELLE RRB, CENTA ML. 2006. Fitoterapia Popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**. diário

TOMBOLATO, A. F. C.; VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENAÇOLL, S. L. J.; COSTA, A. A. Frutífera medicinal em introdução e aclimação no Noni: Brasil. **O Agrônomo**, Campinas, 57(1), 2005.

TORRES, M. A.; **Eficácia da *Morinda citrifolia* (noni) no tratamento de cães com sintomatologia neurológica infectados pela *Ehrlichia canis* e pelo vírus da cinomose**. São Luis, p. 119. Tese doutorado – Universidade Federal do Maranhão, 2016.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 109, n. 1, p. 56-68, Jan. 2005

VASCONCELOS, R. S.; MIRANDA, F. R.; SOUZA, J. A. Desenvolvimento vegetativo do noni (*Morinda citrifolia* L.) sob diferentes sistemas e lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 16 (2), 2014.

VEIGA, J. VFP, ANGELO, C, M. MAM. Plantas medicinais: cura segura? **Quim Nova**, 28(3):519-528, 2005.

VIANNA L.F.C.G. Introdução a Neurologia Veterinária. 3º Ed. **Seropédica**, Imprensa Universitária, p 57. 2000.

WANG, M. Y. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.23, p. 1127-1141, 2002.

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.

WHO. **World Health Statistics 2011**. Disponível em <https://www.who.int/whosis/whostat/2011/en/>. Acesso em 15 de Março de 2020.

YUNES RA, PEDROSA RC, CECHINEL FV. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova** 2001; 24(1):147-152.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) a participar como voluntário (a) da pesquisa intitulada **“AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS EM CÃES ACOMETIDOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DO NONI (*Morinda citrifolia*)”**, de responsabilidade do pesquisador Marlen do Carmo Silva, aluno do curso de mestrado da Universidade Federal do Oeste do Pará, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Kelly Christina Ferreira Castro, a pesquisa deseja avaliar a eficácia no tratamento com noni (*Morinda citrifolia*) em cães com sintomatologia neurológica acometidos pelo vírus da cinomose. O presente projeto será desenvolvido conforme aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOPA Tapajós.

Para o alcance desses resultados, será utilizado um questionário em que os participantes ficarão à vontade para respondê-lo, lembramos que a desistência a qualquer tempo não implicará em qualquer prejuízo ao voluntário.

Estou plenamente esclarecido de que:

- 1.A pesquisa tem como objetivo avaliar a eficácia no tratamento com noni (*Morinda citrifolia*) em cães com sintomatologia neurológica acometidos pelo vírus da cinomose.
2. Os resultados obtidos nortearão futuras formulações farmacológicas para o tratamento da cinomose canina.
3. Autorizo a utilização de meu (eus) animal (ais) para coleta de material biológico, testes e exames necessários ao diagnóstico preciso da patologia estudada, seguindo os padrões científicos de bem estar animal.
4. Autorizo a utilização meu (eus) animal (ais) para receber o tratamento preconizado pelo pesquisador.
5. Disponibilizo e autorizo a entrada do pesquisador e colaboradores em minha residência para coleta de dados, aplicação de fármacos pertinentes ao objeto de estudo
6. Serei responsável pela guarda do (os) animal (ais) em minha residência até a conclusão do estudo

7. Não farei nenhum outro tipo de tratamento, seja pela administração de outras drogas, aumento ou diminuição da dosagem, fisioterapia, acupuntura ou qualquer outra intervenção que não seja a descrita na metodologia do presente trabalho.
8. Por ser uma pesquisa de caráter experimental os resultados obtidos podem não ser os esperados nas hipóteses desta pesquisa, e o (os) animal (ais) pode (em) ter melhora clínica, piora no prognóstico, sequelas ou óbito.
9. A participação na pesquisa não trará nenhum ônus financeiro em relação ao objeto da pesquisa.
10. Será garantida a privacidade e a confidência das informações sendo a responsabilidade assumida pelos pesquisadores que para qualquer informação, poderão ser contatados nos seguintes endereços: Marlen do Carmo Silva, e-mail: carmoxsilva@gmail.com, celular: (93) 991201465.
11. Caso venha a aceitar a participação nesta pesquisa, estará garantida a minha desistência a qualquer momento, bastando para isso, encaminhar esta decisão por escrito.
12. Por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, não terei direito a nenhuma remuneração ou recompensa.
13. Poderei solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.
14. Tenho ciência que o resultado da pesquisa será apresentado publicamente e poderá ser publicado.
15. Estou ciente do risco de ter revelada minha identidade, porém é garantido pelos pesquisadores que esse risco será minimizado através da utilização de códigos para identificação, preservando com isso a confidencialidade das informações prestadas.
16. Ao assinar este documento estou aceitando participar da pesquisa.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

---

\_\_\_\_\_, portador da cédula de identidade \_\_\_\_\_, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos entrevistadores em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa

proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento pode deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional mencionado no capítulo VII do código de ética veterinário.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas rubricadas em todas as páginas e ao final assinado pelo participante e pelos pesquisadores, ficando uma via com o participante e outra via com os pesquisadores.

Santarém (PA), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

---

Assinatura do participante ou responsável

---

Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro  
Orientador

---

Marlen do Carmo Silva  
Pesquisador aluno  
Curso de Biociências/UFOPA

## APÊNDICE 2 – FICHA DE AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA

PACIENTE:	RAÇA:
IDADE:	SEXO:
PROPRIETÁRIO:	DATA: / /

<b>NÍVEL DE CONSCIÊNCIA:</b> <input type="checkbox"/> alerta <input type="checkbox"/> letargia <input type="checkbox"/> estupor <input type="checkbox"/> coma <input type="checkbox"/> vocalização <input type="checkbox"/> delírio
--

<b>POSTURA:</b> <input type="checkbox"/> <i>Head tilt</i> <input type="checkbox"/> <i>Head turn</i> <input type="checkbox"/> <i>Head pressing</i> <input type="checkbox"/> Rigidez Descerebrada <input type="checkbox"/> Rigidez Descerebelada <input type="checkbox"/> Posição de <i>Schiff-Sherrington</i>
---

<b>REAÇÕES POSTURAIIS: Propriocepção</b> <input type="checkbox"/> rápida <input type="checkbox"/> lenta <input type="checkbox"/> moderada <b>Salteamento</b> <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> anormal MTD <input type="checkbox"/> anormal MPD <input type="checkbox"/> anormal MTE <input type="checkbox"/> anormal MPE
--

<b>MARCHA:</b> <input type="checkbox"/> Ataxia <input type="checkbox"/> Paresia <input type="checkbox"/> MTD <input type="checkbox"/> MTE <input type="checkbox"/> Paralisia <input type="checkbox"/> MTD <input type="checkbox"/> MPE <input type="checkbox"/> MPD <input type="checkbox"/> MPE <input type="checkbox"/> MPD <input type="checkbox"/> MPD Andar em círculos <input type="checkbox"/> direita <input type="checkbox"/> esquerda
---

<b>MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS:</b> <input type="checkbox"/> Tremores <input type="checkbox"/> Mioclonia <input type="checkbox"/> Miotomia <input type="checkbox"/> Convulsões <input type="checkbox"/> <i>Head bobbing</i>
---

<b>REFLEXOS</b>			
Resposta à ameaça	<input type="checkbox"/> positivo direito	<input type="checkbox"/> positivo esquerdo	
Reflexo pupilar	<input type="checkbox"/> positivo direito	<input type="checkbox"/> positivo esquerdo	
Reflexo pálpebra	<input type="checkbox"/> positivo direito	<input type="checkbox"/> positivo esquerdo	
Sensibilidade	<input type="checkbox"/> total	<input type="checkbox"/> insensível	
		Localização _____	
Estrabismo	<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo	
Nistagmo	<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo	
Tônus mandibular	<input type="checkbox"/> normal	<input type="checkbox"/> rígido	<input type="checkbox"/> flácido

AVALIADOR: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE 3 - FICHA DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DO NONI EM CAMUNDONGOS  
SWIS**

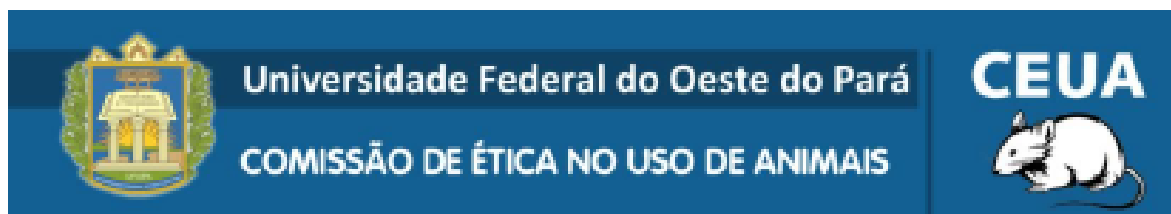
GRUPO:															
CAMUNDONGO:															
	DIA														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Peso															
Irritabilidade															
Resposta ao toque															
Tônus corporal															
Força para agarrar															
Tremores															
Convulsões															
Lacrimação															
Micção															
Defecação															
Respiração															
Cianose															
Letargia															
Dor e sofrimento															
Sono															
Diarréia															
Morte															

Legenda: N – Normal; 0 – Ausente; 1 – Raro; 2 – Pouco; 3 – Moderado; 4 - Intenso



## ANEXOS

### ANEXO 1- COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ SOB O NÚMERO 1120180047/2019



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 1120180047, intitulado **AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS EM CÃES ACOMETIDOS PELO VÍRUS DA CINMOSE TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DO NONI (Morinda citrifolia Linn)**, sob a responsabilidade de Kelly Christina Ferreira Castro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

## CERTIFICATE

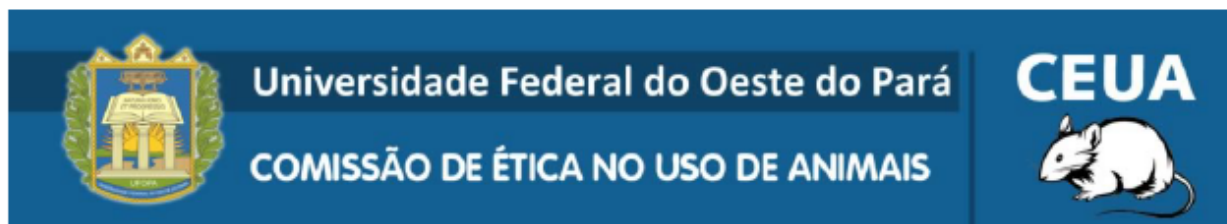
We certify that the protocol Nº 1120180047, entitled "**AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS EM CÃES ACOMETIDOS PELO VÍRUS DA CINMOSE TRATADOS COM EXTRATO METANÓLICO DO NONI (Morinda citrifolia Linn)**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 29/07/2019

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana  
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>

**ANEXO 2 - COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ SOB O NÚMERO 1120190087/2020**



## **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo Nº 1120190087, intitulado **Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato metanólico de Morinda citrifolia testados em camundongos Swis**, sob a responsabilidade de **Kelly Christina Ferreira Castro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

## **CERTIFICATE**

We certify that the protocol Nº 1120190087, entitled "**Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato metanólico de Morinda citrifolia testados em camundongos Swis**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 30/03/2020



Prof. Dra. Adriana Caroprezo Morini  
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>