



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ANÁLISE METABOLÔMICA E
EFEITO NO METABOLISMO ENERGÉTICO EM ANIMAIS
TRATADOS COM PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Moringa oleífera***

RECIFE

2023

ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ANÁLISE METABOLÔMICA E
EFEITO NO METABOLISMO ENERGÉTICO EM ANIMAIS
TRATADOS COM PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Moringa oleífera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. Área de Concentração: Sistemas Biológicos

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Pinheiro Fernandes

RECIFE

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Alves, Robson Raion de Vasconcelos.

Avaliação da toxicidade, análise metabólica e efeito no metabolismo energético em animais tratados com preparações de folhas de *Moringa oleífera* / Robson Raion de Vasconcelos Alves. – 2023.

186 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva.
Coorientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, 2023.
Inclui referências.

1. Toxicidade aguda. 2. Toxicidade subaguda. 3. Citotoxicidade. 4. Genotoxicidade. 5. Ressonância Magnética Nuclear. I. Paiva, Patrícia Maria Guedes. (Orient.). II. Fernandes, Mariana Pinheiro. (Coorient.). III. Título.

ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ANÁLISE METABOLÔMICA E
EFEITO NO METABOLISMO ENERGÉTICO EM ANIMAIS
TRATADOS COM PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Moringa oleífera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA:

DATA: 22 / 02 / 2022

Profa Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva – Presidente
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof Dr. Thiago Henrique Napoleão – Membro Interno
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof Dr. Roberto Araújo Sá – Membro Externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof Dr. Alisson Macário de Oliveira – Membro Externo
Universidade Federal Pernambuco - UFPE

Profa Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira – Membro Externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

À minha querida família. A vocês dedico não só este trabalho, mas todos os meus princípios.

AGRADECIMENTOS

Já ouvi falar que sentir gratidão e não demonstrar é como embrulhar um presente e não o oferecer. Contrariamente, transmito esse breve agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa etapa. Sou eternamente grato a todos!

Agradeço a Deus, Criador do Universo, porque sem Ele nada seria possível. Gratidão aos meus pais, Dona Lenilda e Seu Ronnie Raion (sim, o “Raion” é sobrenome rs) e meus irmãos Rose e Liedson: a presença e amor incondicional que recebo de vocês foram os motivos que me mantiveram forte durante todos esses anos longe de casa. Obrigado pelos esforços e pela minha educação. Agradeço minha vó, Dona Ritinha (*in memorian*) e minha Tia Réia (*in memorian*), por todo carinho e amor. Não tive a oportunidade de me despedir como deveria, mas levo vocês pra sempre comigo. Desculpa, mas eu ainda não tenho uma resposta para “quando você vai parar de estudar?”. Obrigado a Rodrigo por me acompanhar nessa caminhada, aguentar meus estresses diários, por não soltar a minha mão e por me lembrar de beber água (essencial).

Obrigado especial para minha orientadora, Profa Patrícia Paiva. Obrigado pela orientação, pelos ensinamentos e por me inspirar como professora e pesquisadora. Saiba que me espelho muito na senhora! Sua didática e simpatia sempre tornaram as aulas mais leves. Muito obrigado também pela confiança e amizade. Agradeço também ao Prof Thiago Napoleão e reitero os agradecimentos da dissertação: obrigado pelos ensinamentos, dicas, confiança e por sempre sanar todas as minhas dúvidas (não foram poucas). Sou muito seu fã! Agradeço imensamente também a minha coorientadora, Profa Mariana Fernandes pela paciência, suporte e auxílio nos experimentos. Os dados ficaram maravilhosos, obrigado! Obrigado a Alisson Macário por toda ajuda na realização da experimentação. Aprendi bastante com você, doutor.

Óbvio que não esqueci do Bioprot! Aqui fui bem acolhido e as amizades fizeram com que me sentisse em casa tornando os dias mais leves. Obrigado Bob (Carlos), Abdênego, Luis, Suéllen, Livia, Wênio, Gabi, Pollyanna, Elinaldo, Bella, Jainaldo, Caio, Matheus, Poliana, Juh, Guga, Simeone, Patrick, Amanda, Leyde, Thamara, Alícia, Aline, Lucas, Alex e demais companheiros de laboratório que me acompanharam durante essa longa jornada.

Agradeço a todos que fazem parte do Departamento de Bioquímica e Coordenação do PPGCB da UFPE: Seu João, Alex, Miron, Adenilda (lindona), a todos os professores do programa e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Obrigado!

Agradeço também a todos do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Alagoas, onde pude desenvolver uma parte de meu doutorado. Foi uma experiência única! Obrigado Alexandre, Edmilson e professores Thiago Aquino, Edson Bento e Luiz Carlos pela oportunidade.

Agradeço a todos que aceitaram fazer parte da minha banca: Prof Dr Thiago Napoleão, Profa Dra Luana Coelho, Profa Dra Rosemairiy Mendes, Prof Dr Alisson Macário, Prof Dr Emmanuel Pontual e Dra Ana Patrícia Oliveira. Muito obrigado por toda contribuição.

Agradeço aos órgãos de fomento: CNPq, Capes e Facepe pelo apoio financeiro.
Muito obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

As folhas da *Moringa oleifera* possuem alto valor nutricional, sendo ricas em proteínas. As folhas são bastante utilizadas como remédio e na alimentação. No entanto, há necessidade de mais estudos sobre a segurança de uso de preparações de folhas. Este trabalho analisou preparações ricas em proteína das folhas de *M. oleifera*. O extrato salino (LE) e a fração rica em proteínas (PRF) de folhas de *M. oleifera* foram investigados quanto a presença de metabólitos secundários e proteínas antinutricionais (inibidor de tripsina e lectina), citotoxicidade para linfócitos humanos, atividade hemolítica, toxicidade oral aguda em camundongos e genotoxicidade. Adicionalmente, PRF foi investigada quanto à toxicidade oral subaguda em ratos. Os flavonoides rutina e vixetina e inibidor de tripsina foram detectados em LE (0,12g%, 0,01g% e 55,38U/mg, respectivamente) e em PRF (0,04g%, 0,05g% e 87,89U/mg, respectivamente), enquanto lectina foi detectada apenas em PRF (2,5 título⁻¹/proteína mg/mL). LE e PRF não foram tóxicas para os linfócitos e não apresentaram atividade hemolítica. Os animais tratados com LE e PRF (2.000 mg/kg) apresentaram mudança comportamental apenas na primeira hora após os tratamentos e parâmetros hematológicos semelhantes aos animais do grupo não tratado. Aumento significativo nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e discreta infiltração leucocitária com vacuolização citoplasmática nos hepatócitos foram detectados apenas nos animais tratados com LE. As preparações não foram genotóxicas ou mutagênicas. O ensaio de toxicidade oral subaguda revelou que os animais tratados com PRF em 20, 40 e 80 mg/kg/dia não apresentaram alterações comportamentais. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como hemostasia e eletrólitos, foram semelhantes aos do grupo não tratado. Não foram observadas alteração histopatológicas no fígado, rins, baço, pulmão e coração. PRF elevou o biomarcador de estresse oxidativo TBARS em relação ao grupo não tratado, enquanto os níveis de Carbonil não foram alterados. Os tratamentos em 40 e 80 mg/kg/dia resultaram em aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) enquanto o tratamento em 20 mg/kg/dia levou a aumento nos níveis de sufidrilas. PRF também aumentou a concentração de moléculas antioxidantes não enzimáticas (glutatona e glutatona dissulfeto) em todas as concentrações testadas. Análise de metabolômica por RMN-¹H revelou a presença de 43 metabólitos polares em animais tratados e não tratados com PRF e que PRF promoveu diminuição de glicose e aumento de xantina e aminoácidos essenciais no fígado. Os estudos revelaram que as preparações proteicas testadas contêm inibidor de tripsina, lectina e flavonoides. LE e PRF não foram citotóxicas, hemolíticas ou genotóxicas e não apresentaram toxicidade oral aguda. Adicionalmente, PRF não apresentou toxicidade subaguda, elevou a atividade de enzimas antioxidantes hepáticas, promoveu dano oxidativo, diminuiu o balanço redox, apresentou efeito hipoglicemiante e elevou a quantidade de intermediários do ciclo do ácido cítrico.

Palavras-Chave: Toxicidade Aguda; Toxicidade Subaguda; Citotoxicidade; Genotoxicidade; Ressonância Magnética Nuclear.

ABSTRACT

Moringa oleifera leaves have high nutritional value, being rich in proteins. The leaves are widely used as drug and in food. However, there is a need for more studies on the safety of using leaf preparations. This work aimed to evaluate the toxicity of preparations rich in protein from *M. oleifera* leaves. Saline extract (LE) and protein-rich fraction (PRF) from *M. oleifera* leaves was investigated for the presence of secondary metabolites and anti-nutritional proteins (trypsin and lectin inhibitor), cytotoxicity for human lymphocytes, hemolytic activity, oral toxicity acute in mice and genotoxicity. Additionally, PRF was investigated for subacute oral toxicity in rats. The flavonoids rutin and vixetin and trypsin inhibitor were detected in LE (0.12g%, 0.01g% and 55.38U/mg, respectively) and in PRF (0.04g%, 0.05g% and 87.89U/mg, respectively) while the lectins were only present in PRF (2.5 titer⁻¹/protein mg/ml). LE and PRF were not toxic to lymphocytes and did not show hemolytic action. The animals treated with LE and PRF (2,000 mg/kg) showed behavioral change only in the first hour after the treatments, ceasing then, and similar hematological parameters to the animals in the untreated group. Significant increase in serum alanine aminotransferase (ALT) levels and mild leukocyte infiltration with cytoplasmic vacuolization in hepatocytes were detected only in animals treated with LE. Preparations were not genotoxic or mutagenic. The subacute oral toxicity test revealed that animals treated with PRF at concentrations of 20 mg/kg/day, 40 mg/kg/day and 80 mg/kg/day showed no behavioral changes. Hematological and biochemical parameters, as well as hemostasis and electrolytes, were similar to those in the untreated group. Histopathological alterations were not observed in the liver, kidneys, spleen, lungs and heart. PRF altered the oxidative stress biomarker TBARS compared to the untreated group, while Carbonyl levels were not altered. Treatments at concentrations of 40 and 80 mg/kg/day resulted in increased activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) while treatment at a concentration of 20 mg/kg /day led to increased levels of sufhydryls. PRF also modulated the concentration of non-enzymatic antioxidant molecules (reduced and oxidized glutathione) at all concentrations tested. Metabolomics analysis by NMR-¹H revealed the presence of 43 polar metabolites in animals treated and not treated with PRF and that PRF promoted a decrease in glucose and an increase in xanthine and essential amino acids in the liver. The studies revealed that the protein preparations tested contain trypsin inhibitors, lectin and flavonoid. LE and PRF were not cytotoxic, hemolytic or genotoxic and did not show acute oral toxicity. Additionally, PRF did not present subacute toxicity, increased the activity of hepatic antioxidant enzymes, promoted oxidative damage, decreased the redox balance, presented a hypoglycemic effect and increased the amount of citric acid cycle intermediates.

Keywords: Acute Toxicity; Subacute toxicity; Cytotoxicity; Genotoxicity; Nuclear Magnetic Resonance

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo Geral	12
1.1.2	Objetivos Específicos	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	ENSAIOS DE TOXICIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS	14
2.1.1	Ensaio <i>in vivo</i>	15
2.1.2	Análise Metabolômica	17
2.2	METABOLISMO ENERGÉTICO	23
2.3	FATORES ANTINUTRICIONAIS DE ORIGEM PROTEICA	23
2.3.1	Lectinas	25
2.3.2	Inibidor de Protease	27
2.3.3	Precipitação proteica para concentração de lectinas e inibidores de protease	28
2.4	A ESPÉCIE <i>Moringa oleífera</i>	29
2.4.1	Atividades biológicas de tecidos de <i>M. oleífera</i>	32
2.4.1.1	Raiz	32
2.4.1.2	Casca do caule	33
2.4.1.3	Sementes	34
2.4.1.4	Flores	35
2.4.1.5	Folhas	36
2.4.1.5.1	<i>Toxicidade de folhas de <i>M. oleífera</i></i>	37
2.4.1.5.2	<i>Atividade antioxidante e efeito hepatoprotetor de folhas de <i>M. oleífera</i></i>	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
3.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SALINO E DA FRAÇÃO RICA EM PROTEÍNAS DE FOLHAS DE <i>Moringa oleífera</i> LAM	41
3.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBAGUDA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISE METABOLÔMICA EM RATOS WISTAR TRATADOS COM FRAÇÃO RICA EM PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE <i>Moringa oleífera</i> LAM	94

4	CONCLUSÕES	148
	REFERÊNCIAS	149
	ANEXO A – Vias Metabólicas	167
	ANEXO B – Autorização Comitê de Ética e Pesquisa com Animais	174
	ANEXO C – Autorização Comitê de Ética e Pesquisa com Humanos	175
	ANEXO D – Súmula Curricular	176

1 INTRODUÇÃO

As folhas da *Moringa oleifera* fazem parte da dieta da população de vários países, inclusive o Brasil, devido ao alto conteúdo de proteínas e vitaminas (OHTAA *et al.*, 2017). Contudo, em estudos sobre a composição química da *M. oleifera*, foram identificados fatores antinutricionais proteicos, tais como lectinas (sementes) e inibidores de tripsina (ALVES *et al.*, 2020; NOVA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021).

As folhas da *M. oleifera* possuem elevado valor nutricional com altos níveis de proteínas (cerca de 28% da sua composição), vitaminas, potássio, cálcio, fósforo, ferro, aminoácidos essenciais, antioxidantes (incluindo β -caroteno) e flavonoides (TEIXEIRA *et al.*, 2014; OHTAA *et al.*, 2017; MACAMBIRA *et al.*, 2018). As folhas são utilizadas na medicina tradicional como anti-hipertensivo, antipirético, antídoto para venenos e no tratamento do *diabetes mellitus* (OHTAA *et al.*, 2017; CÂMARA *et al.*, 2019). Na alimentação, as folhas são consumidas inteiras como saladas e chás e o pó em condimento e suplemento multivitamínico natural (MANUWA; SEDARA; TOLA, 2020).

Extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* apresentou atividade antiproliferativa em células de câncer hepático (BERKOVICH *et al.*, 2013) e induziu apoptose em células tumorais humanas de carcinoma epidermóide de boca (SREELATHA; PADMA, 2009). A propriedade antioxidante das folhas tem sido creditada ao alto teor de compostos fenólicos. Ácidos fenólicos e flavonoides, que inibem a toxicidade produzida pelo tetracloreto de carbono, são encontrados em várias partes da *M. oleifera*, incluindo as folhas; esses componentes diminuem os níveis da peroxidação lipídica e elevaram os níveis glutatona reduzida e superóxido dismutase (VERMA *et al.*, 2009).

O extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* preveniu a formação de placas ateroscleróticas e demonstrou atividade antioxidante em coelhos alimentados com dieta hipercalórica (CHUMARK *et al.*, 2008). Estudo realizado por Jaiswal *et al.* (2009) revelou que o extrato aquoso foi capaz de aumentar a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, que são responsáveis pela eliminação de radicais livres capazes de causar danos irreversíveis aos tecidos.

No entanto, preparações de plantas, mesmo sendo de origem vegetal, não são isentas de toxicidade para humanos e outros animais, e o uso dos mesmos pode desencadear, por exemplo, hepatotoxicidade e indução de mutações no DNA (FURBEE *et al.*, 2006; KUETE *et al.*, 2014). Extrato aquoso do caule de *Aristolochiae manshuriensis* administrado por via oral foi genotóxico para eritrócitos da medula óssea de camundongos (HWANG *et al.*, 2012).

Estudo sobre a toxicidade oral de extrato etanólico das folhas de *Morus alba*, em camundongos, revelou leucopenia e alteração no fígado, rim ou baço em uma concentração elevada (300 mg/kg) (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Extrato aquoso de radix e córtex de *Psammosilene tunicoides*, muito utilizado na medicina tradicional chinesa, desencadeou alterações em marcadores bioquímicos, congestão vascular no coração, espessamento da parede alveolar e efisema pulmonar, além de congestão vascular renal em ratos após administrações orais (WU *et al.*, 2018)

Para estudos toxicológicos, além de análises hematológicas, bioquímicas e histológicas, os metabólitos extracelulares são capazes de refletir a situação intracelular. Nesse contexto, a análise metabolômica representa uma ferramenta poderosa para coletar informações ricas, indicando não apenas a extensão de um dano tóxico, mas também seus mecanismos subjacentes e revelar as sequelas bioquímicas da administração de produtos tóxicos, identificação de biomarcadores e traçar rotas metabólicas. Em concordância, a análise metabolômica de tecidos são ideais para obter informações sobre toxicidade de órgãos-alvo (RAMIREZ *et al.*, 2013; STEUER *et al.*, 2019).

A ausência de estudos que comprovam a segurança do uso em alimentos e a comercialização irregular dos produtos à base de *M. oleifera*, levaram a Anvisa (Agência Brasileira de Vigilância Sanitária) a proibir, por meio da Resolução RE nº 1.478/2019, a fabricação, importação, comercialização, propaganda e distribuição de alimentos que contenham *M. oleifera*.

Atividades biológicas de extratos orgânicos e aquosos de folhas de *M. oleifera* são reportadas na literatura, mas pesquisa realizada em bancos de dados revelou a ausência de estudos com extrato salino e fração proteica. Adicionalmente, toxicidade (MOODLEY, 2017) e atividade antioxidante (POLLINI *et al.*, 2020), por exemplo, já foram relatadas em extratos de folhas de *M. oleifera*, no entanto, não se sabe se as proteínas estão envolvidas nestas propriedades biológicas.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar extrato salino e fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* quanto a toxicidade e ação antioxidante *in vivo*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar extrato salino (LE) e fração proteica (PRF) das folhas de *M. oleifera* quanto a presença de constituintes fitoquímicos e proteínas e suas propriedades biológicas;
- Determinar a toxicidade aguda do LE e PRF através da determinação de dados hematológicos, bioquímicos e histológicos de camundongos fêmeas adultas albinas Swiss (*Mus musculus*) tratadas com dose única em 14 dias;
- Determinar a toxicidade subaguda da PRF através da determinação de dados hematológicos, bioquímicos, hemostasia, íons séricos e análise histológica em ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) tratados diariamente com a preparação durante 28 dias;
- Investigar o efeito *in vivo* da PRF pela determinação de biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS, Carbonilas e Sulfidrilas), atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S transferase (GST) e estado redox celular (razão GSH/GSSG) em fígado de ratos da linhagem Wistar;
- Identificar e quantificar metabólitos presentes no fígado dos animais tratados com PRF, utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de prótons em relação aos núcleos de hidrogênio (RMN-¹H).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENSAIOS DE TOXICIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS

O conhecimento adquirido com o tempo sobre o uso de plantas na medicina popular é transmitido entre as gerações e muitas vezes é utilizado pela população como alternativas terapêuticas para tratamento de doenças. No entanto, testes toxicológicos têm demonstrado que a utilização de algumas espécies de plantas causa inúmeros efeitos adversos ao organismo (FERNANDES *et al.*, 2016). O extrato aquoso de folhas de *Syzygium jambolanum*, muito utilizado na medicina popular, desencadeou alterações nos parâmetros renais (ureia e creatinina) e hepáticos (ALT e AST), e ocasionou uma diminuição no número de plaquetas, leucócitos e eritrócitos e dosagem de hemoglobina, nos animais tratados com uma única dose (2.000 mg/kg) (LIMA *et al.*, 2019).

Pesquisas científicas que avaliam atividades biológicas atribuídas às plantas são essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente ensaios toxicológicos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; CECHINEL-FILHO, 2013).

O *National Research Council* publicou no ano de 2007 o livro *Testing Toxicity in the 21st Century: A Vision and Strategy* o qual descreve a necessidade do rastreamento e identificação de atividade biológica induzida quimicamente em células humanas e linhagem celulares, bem como a importância de verificar resposta biológica em modelos animais (KNUDSEN *et al.*, 2015; TONHOLO, 2018).

Inicialmente, novos compostos requerem rigor e uma combinação de informações de diversas fontes confiáveis para fornecer uma correta avaliação quanto ao risco desses à saúde. Neste caso, testes *in vitro* e *in silico* são utilizados para aprimorar e dirigir compostos para mecanismos específicos, eficácia terapêutica e doses não letais evitando toxicidade (CHAPMAN *et al.*, 2013; TONHOLO, 2018).

Os ensaios toxicológicos devem ser realizados de acordo com protocolos estabelecidos e reconhecidos pela comunidade científica. Internacionalmente, são utilizados os protocolos da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e o da *Food and Drug Administration* (FDA). No Brasil, a regulamentação desses testes é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para assegurar a eficácia dos compostos, a exemplo das plantas medicinais (FERNANDES *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2017; TONHOLO, 2018).

Para a condução dos estudos apresentados nesse trabalho, foram adotados os procedimentos da OECD. A OECD recomenda a utilização de métodos *in vitro* como estratégia para limitar a gravidade de toxicidade e seleção de doses para os ensaios *in vivo* (TONHOLO, 2018). Ensaios *in vitro* como citotoxicidade e *in vivo* como toxicidade aguda e subaguda, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva são exemplos de testes usuais em toxicologia preditiva para identificar potencialidade tóxica de compostos (ZHANG *et al.*, 2014).

Ensaios *in vitro* oferecem vantagens à pesquisa como elevada padronização, condições controladas de teste e um banco de linhagens celulares bem variadas. Além disso, pouca quantidade de material é necessária para realizar a experimentação e a produção de resíduo é limitada, sendo uma alternativa para a avaliação da toxicidade de compostos (ARAÚJO *et al.*, 2014). No entanto, apesar das modificações e evoluções, ainda existem algumas desvantagens inerentes relacionadas à predição como a via de exposição, efeitos para o modelo celular adotado (não é uma representação completa da resposta de um modelo *in vivo*) e diferenças encontradas entre espécie do modelo animal adotado e o ser humano (ZHANG *et al.*, 2014).

2.1.1 Ensaios *in vivo*

A regularização dos estudos com animais é realizada com a finalidade de proteger a saúde humana e o meio ambiente e devem sempre ser revistos à medida que haja avanços nos métodos e compreensão científica. Essa prática garante a adequação correta no uso dos animais nos ensaios toxicológicos, melhorando o valor preditivo, reduzindo o uso de animais melhorando seu bem-estar, além de ser um modelo inclusivo de todos os fatores envolvidos na exposição humana (DENNY, STEWART, 2017; TONHOLO, 2018).

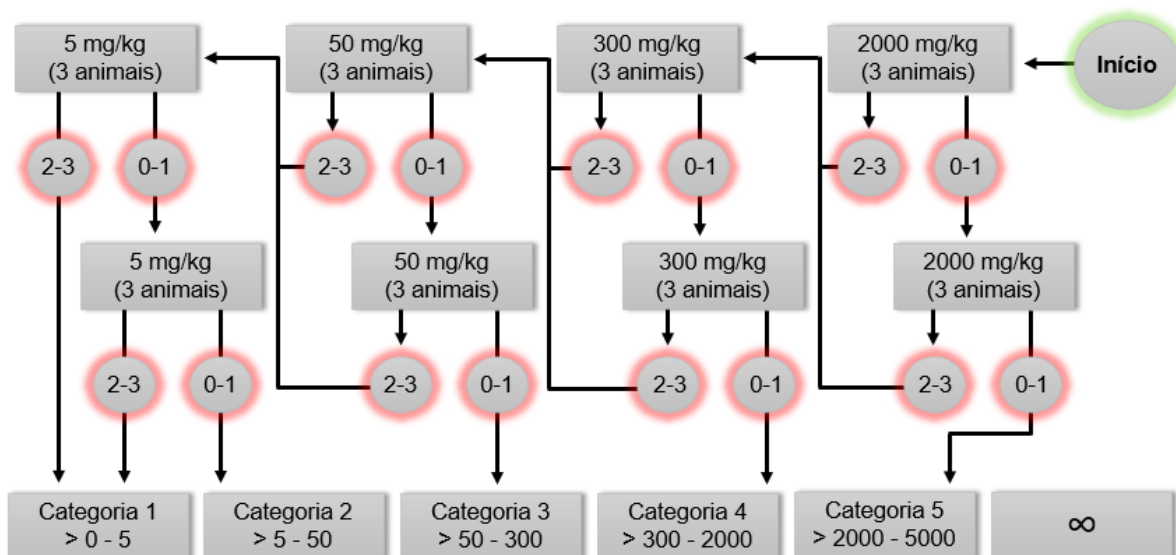
O uso de modelos animais para a determinação da toxicidade permite compreender o mecanismo de ação envolvido e proporciona uma melhor indicação de índice terapêutico e dose clínica. A seleção da espécie é baseada nos perfis metabólicos, farmacocinéticos, tolerância da espécie e atividade farmacológica considerando a avaliação de segurança (DENNY; STEWART, 2017).

Apesar de algumas patologias humanas serem essencialmente presentes em nossa espécie, respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes têm sido descritas em diversas espécies animais (MENDES; JESUS-SOUZA, 2017). Os roedores (camundongos e ratos) são mamíferos que apresentam diversas similaridades com os humanos como: plano de corpo, sistemas orgânicos, mecanismos de regulação psicológica e áreas cerebrais (CARVALHO,

2020). Análises genômicas comparativas indicam que humanos e ratos tiveram um ancestral comum o que sugere uma grande similaridade genética entre estas espécies (CORRÊA *et al.*, 2015).

No estudo de toxicidade oral aguda os animais são tratados com o composto natural em uma única dose ou, eventualmente, em doses múltiplas em um intervalo de 24h em pelo menos três animais, que podem ser ratos ou camundongos, do mesmo sexo em doses previamente definidas a dose limite de 2000 mg/Kg é suficiente para estimar a DL₅₀ (dose letal capaz de matar 50% da população do estudo), de acordo com a OECD (Guideline 423). A ausência ou presença de morte dos animais tratados durante a experimentação determinará a necessidade de etapas seguintes (Figura 1). O ensaio fornece dados importantes como se a morte pela administração em excesso do composto natural ou presença de lesões em órgãos alvos, alterações no comportamento, avaliação de risco em exposição aguda e seleção de valores para exposição prolongada, bem como verificar efeito tardio ou reversibilidade da toxicidade (OECD, 2001; DENNY, STEWART, 2017).

Figura 1 - Esquema de orientação para reprodução de toxicidade aguda de compostos naturais em animais, de acordo com a *Organization for Economic Cooperation and Development*, 423.



Por etapa, são utilizados 03 animais do mesmo sexo, normalmente fêmeas. 0, 1, 2 e 3 presentes nos círculos, correspondem ao número de animais mortos em cada etapa. Categoria 1: Extremamente tóxico; Categoria 2: Altamente tóxico; Categoria 3: Medianamente tóxico; Categoria 4: Pouco tóxico; Categoria 5: Não tóxico. Fonte: Adaptado de OECD (2001).

Para o estudo de toxicidade oral de doses repetidas, ou subaguda, o composto natural é administrado diariamente por 28 dias. O objetivo do teste é estabelecer a partir de qual sinais de toxicidade são detectados, além de identificar órgãos afetados e grau de comprometimento.

Adicionalmente, o teste também propicia a análise do efeito cumulativo nos animais (TAHRAOUI *et al.*, 2010). A OECD orienta a utilização de ratos ou camundongos em grupos formados por dez animais (machos e fêmeas) e devem ser utilizadas diferentes limite de 1000 mg/kg/dia, para verificar o grau do efeito tóxico (OECD, 2008)

Os animais são avaliados diariamente quanto ao consumo de água e ração, massa corpórea, parâmetros respiratórios e cardiovasculares, mudanças comportamentais e anormalidades motoras. No final do experimento da toxicidade de dose repetida e aguda, os animais são anestesiados e amostras sanguíneas são coletadas para realização de exames hematológicos e bioquímicos. Adicionalmente, os principais órgãos são retirados para avaliação macroscópica e histopatológica para análise da intensidade da exposição ao elemento tóxico e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (OECD, 2001; OECD, 2008; ALBINATI *et al.*, 2009).

Extrato hidroalcoólico das folhas de *Combretum micranthum*, bastante utilizada na medicina tradicional na África Ocidental para o tratamento de diabetes, hipertensão, inflamação, malária e doenças do fígado, foi avaliado quanto a toxicidade aguda por 14 dias (5000 mg/Kg) e subaguda por 28 dias (500 e 1000 mg/Kg/dia) em ratos, por via oral. O extrato não promoveu mortalidade e nenhum efeito adverso foi detectado. Também, não houve alteração de peso corporal, comportamento ou parâmetros hematológicos e bioquímicos. A análise histopatológica mostrou arquitetura normal dos órgãos, sugerindo uma DL₅₀ acima de 5000 mg/Kg (KPEMISSI *et al.*, 2020).

Um estudo de toxicidade oral aguda (5000 mg/Kg) em camundongos e de dose-repetida por 28 dias em ratos (312, 625, 1250 e 2500 mg/Kg/dia) de extrato da casca de *Nephelium lappaceum* apresentou efeito tóxico. Dados hematológicos e bioquímicos indicaram toxicidade no fígado, rim e baço nos animais tratados com as doses mais elevadas. A maior concentração do extrato testada inibiu significativamente o ganho de peso corporal e foi tóxico para os tecidos de acordo com a análise histopatológica (YUJING *et al.*, 2020). Estudos toxicológicos podem ser complementados com análises metabolômicas, refletindo a situação intracelular de órgãos alvos (STEUER *et al.*, 2019).

2.1.2 Análise metabolômica

O metaboloma é tido como a composição de todas as pequenas moléculas presentes em um organismo. Já a tecnologia voltada para o fornecimento de uma visão geral

compreensiva, qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é denominada metabolômica (GOLDANSAZ *et al.*, 2017).

A metabolômica pode ser dividida em metabolômica direcionada e não direcionada. A direcionada quantifica os metabólitos mais abundantes e usa uma abordagem estatística mais simples. Já a não direcionada usa análise estatística multivariada, como análise de componentes principais (PCA), análise parcial discriminante dos mínimos quadrados (PLS-DA) e análise ortogonal parcial discriminante dos mínimos quadrados (OPLS-DA) (CHEN *et al.*, 2016)

A metabolômica é uma valiosa ferramenta utilizada para a descoberta de drogas (MERCIER *et al.*, 2018), pesquisa de biomarcadores (NARAYANAN *et al.*, 2017), estudo de doenças (WANG *et al.*, 2016), confirmação de vias metabólicas (REN *et al.*, 2016) (ANEXO A: *Kegg Pathway* – Vias Metabólicas), entre outras aplicações, que envolvem a identificação de substâncias endógenas. Estudos de metabolômica já foram relatados em ensaios clínicos, toxicologia, farmacologia e nutrição (STEUER *et al.*, 2019).

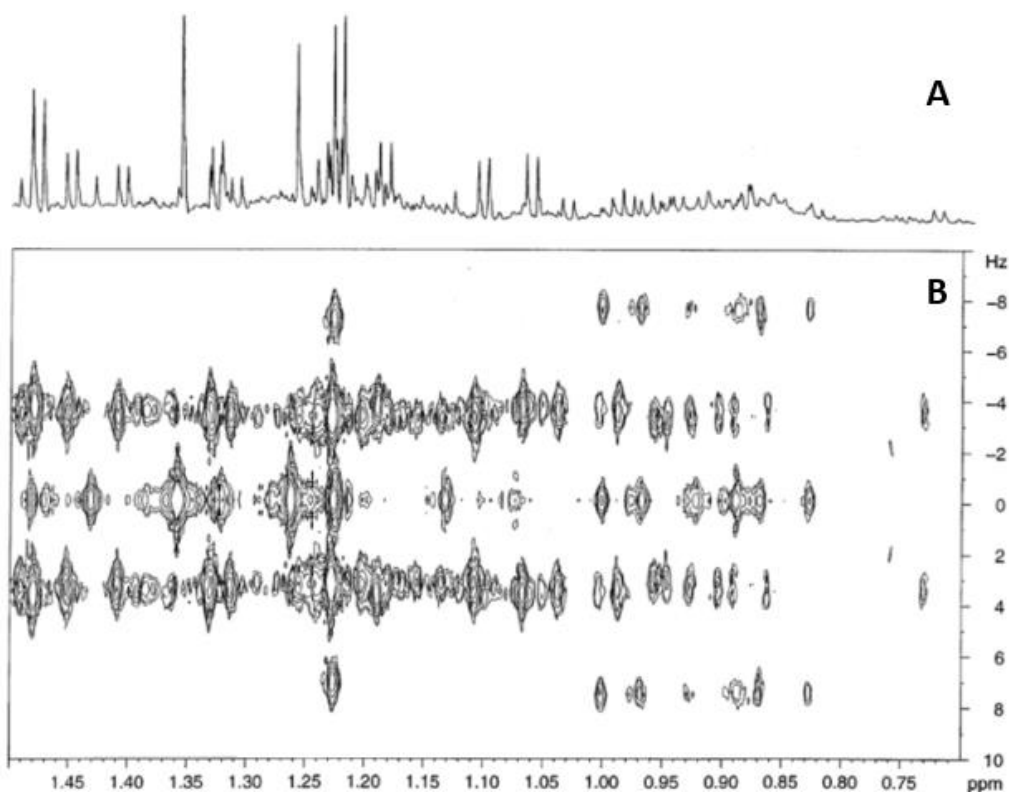
Os experimentos de metabolômica fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma, onde o tamanho depende do organismo estudado, e mais comumente à genômica funcional (ROCHA *et al.*, 2020). A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica amplamente utilizada para traçar o perfil metabólico e devido o desenvolvimento e modernização de equipamentos de RMN, com magnetos supercondutores refrigerados com hélio líquido, também chamados criomagnéticos, foi possível a obtenção de espectros com uma melhor resolução (CARVALHO, 2017).

O RMN permite uma rápida análise de forma automatizada de extratos brutos e detecta quantitativamente metabólitos em grupos distintos, além de fornecer informações estruturais e detalhes estereoquímicos. No entanto, RMN não obtém dados válidos para metabólitos que se encontram em baixas concentrações (CHEN *et al.*, 2016)

Amostras inseridas no espectrômetro de RMN, têm seus núcleos sob o efeito de um campo magnético capaz de alinhá-los paralelamente a este campo magnético. A presença de elétrons, que geram um campo magnético adicional, acarreta aos núcleos, quando em ressonância, uma influência que resulta em diferentes posições dos sinais ao longo do espectro de RMN (KIEMLE; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2016). De acordo com Habeck (2012), cada pico revelado pela técnica de RMN-¹H é proporcional a quantidade de núcleos de hidrogênio responsáveis pelo aparecimento do pico. Ao analisar espectros de RMN (Figura 2A), os sinais originados podem se apresentar como singletos (picos únicos), dupletos (dois

picos), tripletos (três picos) e assim por diante em resposta a interações denominadas acoplamento spin-spin. O acoplamento spin-spin é tido como o resultado da influência que o campo magnético gerado por um núcleo exerce sobre um outro núcleo, fazendo com que o pico se desdobre proporcionalmente ao número de núcleos vizinhos (NASCIMENTO, 2012).

Figura 2 - Espectro de RMN- ^1H (A) e RMN 2D J-resolvido ^1H (B)



Fonte: Neild *et al.*, (1997).

O desdobramento dos picos pode gerar uma sobreposição dos sinais, dificultando a observação da multiplicidade dos sinais. Nesses casos pode ser realizado o RMN 2D J-resolvido ^1H (Figura 2B). O J-resolvido é um experimento que tem em uma das dimensões o deslocamento químico, e na outra dimensão o desdobramento dos sinais o que permite a confirmação da multiplicidade do sinal e medir sua constante de acoplamento (HUANG *et al.*, 2012).

A identificação de metabólitos por RMN é considerada um grande desafio na metabolômica não direcionada e para análise das vias metabólicas de micromoléculas são necessários software de análise de espectro de NMR, como Chenox Eclipse e Bruker Amix e bancos de dados bioquímicos como HMDB, ChemSpider, KEGG e SMPBD (CHEN *et al.*, 2016). A análise dos metabólitos e suas vias é necessária para interpretar e elucidar possíveis

mecanismos de toxicidade. Nesse caso, o MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>), uma poderosa ferramenta baseada na web, fornece muitos métodos de análise, incluindo processamento de dados, normalização, análise estatística multivariada, biomarcador e análise de vias. A tabela 1 mostra estudos de toxicidade de produtos naturais em animais que utilizaram a técnica de RMN.

Tabela 1 – Toxicidade induzida por compostos naturais utilizando a técnica de RMN para elucidação

Material vegetal (referência)	Toxicidade	Biomarcadores identificados	Vias metabólicas relacionadas	Possível mecanismo tóxico
Ricina (Guo <i>et al.</i> , 2014)	Nefrotoxicidade e toxicidade pulmonar (soro)	Leucina, isoleucina, valina, 3-hidroxibutirato, lactato, alanina, arginina, N-acetil glicoproteínas, O-acetilglicoproteínas, glutamato, glutamina, acetoacetato, piruvato, citrato, cisteína, creatina, creatinina, colina, taurina, betaína, glicerofosforilcolina, glicina, glicose, tirosina e trigonelina	Metabolismo energético, estresse oxidativo, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de quinurenina	Mudança do metabolismo energético de um estado aeróbico para um estado anaeróbico causando danos à membrana e ruptura de células e organelas.
Raízes de <i>Aristolochia fangchi</i> (Liang <i>et al.</i> , 2009)	Nefrotoxicidade (soro)	Glicose, 3-D-hidroxibutirato, LDL/VLDL, ácido acetoacético, acetona, creatinina, N-acetil-L-cisteína, alanina	Metabolismo dos ácidos graxos insaturados, metabolismo dos ácidos energéticos, metabolismo dos aminoácidos, ciclo do ácido tricarbóxílico e glicólise	Inibição da síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico por bloqueio inespecífico da enzima ciclooxigenase causando a vasoconstrição e insuficiência renal leve em estados de

Sementes maduras secas de <i>Pharbitis nil</i> (Ma <i>et al.</i> , 2010)	Nefrotoxicidade (plasma e tecido renal)	Creatinina, LPC (16:0; 18:0; 18:1; 18:2; 20:4), fenilalanina, fitosfingosina e dihidroesfingosina	Metabolismo lipídico, metabolismo energético e metabolismo de aminoácidos	contração de volume. Inibição da atividade de esfinganina <i>N</i> -aciltransferases (ceramida sintase) que converte dihidroesfingosina em dihidroceramida
<i>Frutos de Xanthii Fructus</i> (Xue <i>et al.</i> , 2014)	Hepatotoxicidade (plasma)	LDL/VLDL, β -hidroxibutirato, valina, glutamato, colina, lactato, acetato, glicose e β -glicose	Produção de secreção biliar, metabolismo de ácidos graxos, metabolismo do butanoato, metabolismo do piruvato, metabolismo de aminoácidos (glutamato, glicina, fenilalanina e triptofano) metabolismo do éter lipídico, glicólise, gliconeogênese, metabolismo do piruvato, ciclo do citrato e metabolismo do metano.	Interrupção da fosforilação oxidativa que é um processo essencial para o metabolismo energético celular e o sistema de transferência de elétrons.

LPC: Lisofofatidilcolina; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muita baixa densidade.

Fonte: Chen *et al.* (2016).

2.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

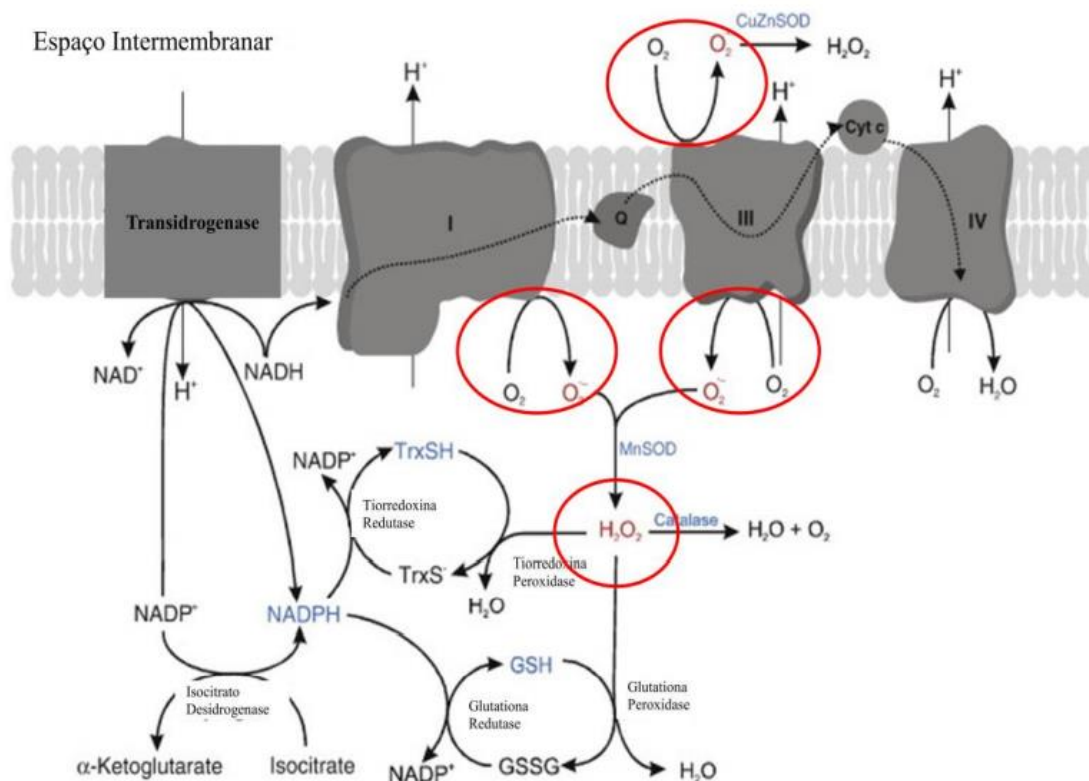
A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em concentrações normais, desempenha funções primordiais de segundo mensageiro, com regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox e alterações na homeostase celular, através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (CADENAS; DAVIES, 2000). Em concentrações elevadas, EROs podem ser importantes mediadores de danos nas estruturas celulares, de ácidos nucleicos (OZAWA, 1999), lipídios (SPITELLER, 2002) e proteínas (CADENAS; DAVIES, 2000). O metabolismo energético mitocondrial também é reconhecido como a principal fonte de EROs celular na maioria das células de eucariotos (QUIJANO *et al.*, 2016), como mostra a figura 3.

O ânion superóxido produzido na mitocôndria origina outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por reações distintas. A dismutação do O_2^- acontece principalmente pela ação da enzima antioxidante superóxido dismutase (Mn-SOD na matriz e Cu/Zn-SOD no espaço intermembranas) produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, pode reagir com íons cobre ou ferro e produzir radicais hidroxil (OH), uma espécie altamente reativa, através da reação de Fenton (FENTON, 1894; NOHL; GILLE; STANIEK, 2005). Do mesmo modo, na presença de metais de transição, parte desse superóxido pode reagir com o H_2O_2 e também produzir radical hidroxil (HABER; WEISS, 1934). Além disso, o O_2 pode reagir com o óxido nítrico (NO^\cdot) para formar peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) (FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Nas proteínas, os resíduos de cisteína estão na forma de tiolato (Cys-S) em pH fisiológico e são mais suscetíveis à oxidação em comparação com o tiol reduzido (Cys-SH). Na presença de H_2O_2 os ânions tiolato são oxidados para sua forma sulfênica (Cys-SOH), causando alterações alostéricas que alteram a atividade da proteína (SABADIN, 2019). A catalase por sua vez, auxilia a célula na detoxificação de espécies reativas de oxigênio atuando na conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (BELO; SOUZA, 2016).

Assim como as proteínas, os lipídios são susceptíveis à oxidação. Os ácidos graxos poliinsaturados apresentam elétrons mais expostos e vulneráveis ao ataque de radicais livres., podendo gerar peroxidação lipídica. O estresse oxidativo gera produtos de peroxidação lipídica, sendo o malondialdeído (MDA) (TRACHOOTHAM *et al.*, 2008). O DNA por sua vez é menos susceptível a modificações oxidativas devido à sua estrutura dupla hélice compartimentalizada, a proteínas histonas e outras proteínas ligadas ao DNA que protegem seus centros nucleofílico (BELO; SOUZA, 2016).

Figura 3 - Geração de EROs na membrana mitocondrial interna e produção de peróxido de hidrogênio como resultado da ação da enzima antioxidante superóxido dismutase



Fonte: Alves, 2017

A glutathione peroxidase (GPx) utiliza a glutathione reduzida (GSH) como cofator enzimático. Nesse processo, elétrons são transferidos da GSH para a espécie reativa através da catálise da peroxidase e voltam a ser restaurados por redutases que utilizam elétrons do NADPH. A GPx possui um resíduo de selenocisteína ativo em seu centro catalítico que pode reduzir H_2O_2 em H_2O e O_2 , utilizando duas moléculas de GSH como doadoras de elétrons. Nessa reação é formado a glutathione oxidada (GSSG) que pode ser regenerada à GSH através da atividade da glutathione redutase ou exportada para o meio extracelular (ALKAZEMI *et al.*, 2021).

Outra classe de enzimas que atua na eliminação de xenobióticos, drogas e componentes endógenos são algumas transferases, a exemplo da glutathione S-transferase (GST). A GST é responsável pela eliminação de substâncias tóxicas catalisando uma reação de conjugação nucleofílica de glutathione reduzida com o composto tóxico facilitando a excreção (SABADIN *et al.*, 2017).

Metabólitos presentes em plantas são utilizados como antioxidantes para prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Extrato da casca de jabuticaba (*Plinia peruviana*)

(25, 50 e 100 mg/mL), atuou como antioxidante em lesões de pele em camundongos. A ação foi devido ao aumento na atividade das enzimas catalase e glutathione oxidase (PITZ, 2018).

2.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS DE ORIGEM PROTEICA

Os fatores antinutricionais podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes. Lectinas e inibidores de protease são capazes de interferir na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes e, se ingeridos em altas concentrações, podem acarretar efeitos danosos à saúde (BENEVIDES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2019).

2.3.1 Lectinas

Lectinas são proteínas que se ligam de forma específica a carboidratos. Devido a sua especificidade em se ligar a sítios e receptores específicos na superfície das células intestinais, as lectinas podem interferir na absorção de nutrientes e causar danos à saúde (Tabela 1) (SILVA; SILVA, 2000). Essa classe de proteína é tóxica pois é capaz de causar distúrbios imunológicos devido ao desconforto gastrointestinal por meio da interação das lectinas com as células epiteliais intestinais, aglutinar glóbulos vermelhos e interferir no reparo celular (MIYAKE *et al.*, 2007; WO; SUN, 2011).

Para a detecção de lectinas em uma solução, realiza-se um ensaio de hemaglutinação que consiste em uma diluição seriada da amostra com posterior adição de eritrócitos. Quando há formação de uma rede entre os eritrócitos e a lectina, constata-se a hemaglutinação (Figura 4) (SILVA, 2016).

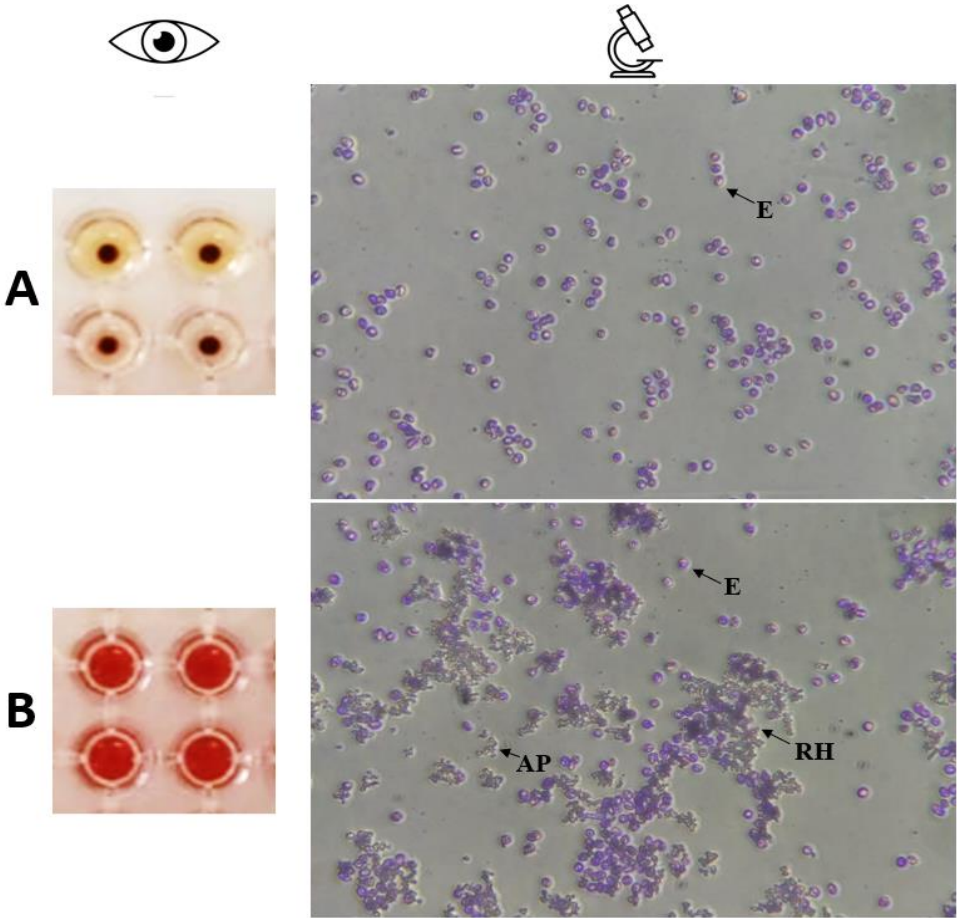
Tabela 2 - Toxicidade de algumas lectinas

Autor	Proteína/Lectina	Animais de teste	Dose letal (DL ₅₀)
Liener e Pallansch (1952)	Hemaglutinina de soja	Ratos	50 mg/kg – Via intraperitoneal
Liener e Rose (1953)	Hemaglutinina de soja	Ratos	> 500 mg/kg – Via oral
Jaffe (1960)	Agglutinina de feijão preto	Camundongos	50 mg/kg – Via intraperitoneal

Joshi (1972)	Aglutinina de Feijão-de-lima	Ratos e camundongos	Letal nas doses de 65 e 140 mg/kg, respectivamente – Via intraperitoneal
Csáky e Fekete (2004)	Lectina da soja	Ratos	50 mg/kg – Via oral.
Audi <i>et al.</i> (2005)	Ricina	Camundongos	30 mg/kg – Via oral
Ballerstadt <i>et al.</i> (2006)	ConA	Camundongos	0,022 mg/kg – Via intravenosa
Silva <i>et al.</i> (2020)	Fração rica em lectinas (MvRL)	Camundongos	> 5000 mg/kg – Via oral

Fonte: Adaptado de Wo e Sun (2011)

Figura 4 - Atividade hemaglutinante na ausência (A) e na presença (B) de lectinas



👁️ Atividade Hemaglutinante vista a “olho nú”. 🔬 Atividade Hemaglutinante vista em microscópio ótico (100x). E: Eitrócitos tratados com Glutaraldeido; AP: Agregado Proteico (lectina WSMoL); RH: Rede de Hemaglutinação.

Fonte: O Autor (2023)

Lectinas já foram isoladas de diversos tecidos de plantas onde atuam na proteção contra agentes fitopatogênicos, estando presente de forma mais concentrada em locais estratégicos para defesa do organismo (SILVA, 2020). Lectinas são capazes de interferir no crescimento e sobrevivência de microrganismos e promover efeitos antinutricionais em insetos, causando desconforto no trato intestinal (VANDENBORRE *et al.*, 2011).

2.3.2 Inibidor de Protease

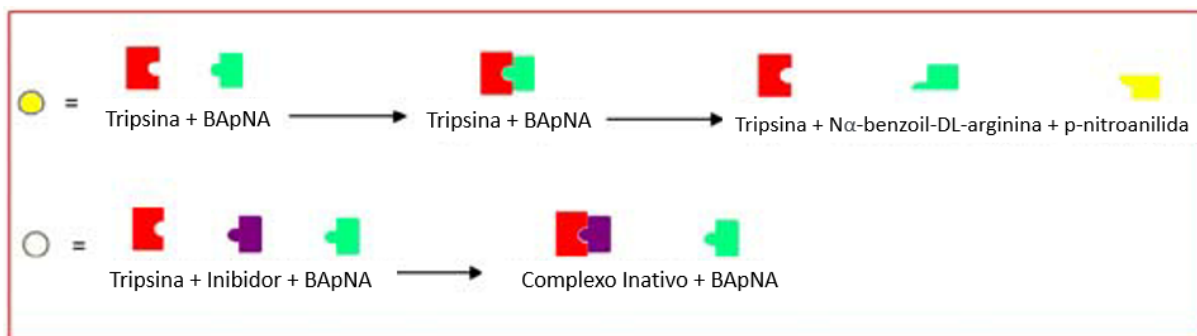
Inibidores de protease podem ser definidos como proteínas que atuam inativando ou reduzindo a atividade de diversos tipos de enzimas por atuarem competindo com os substratos pelo sítio ativo das proteases (competitivo), ou interagindo com outras regiões da molécula enzimática (não competitivo) (KIM *et al.*, 2009; ROCHA-FILHO, 2015). Esses inibidores podem ser classificados em famílias de acordo com a classe de enzimas que inibem, sendo denominados, por exemplo, inibidores de serinoproteinases, metaloproteinases e cisteinoproteinases, entre outros (PANDO, 2010).

Os inibidores de origem vegetal, particularmente os inibidores de serinoproteinases, têm sido amplamente estudados devido ao seu papel na defesa das plantas (PAIVA *et al.*, 2013). Inibidores de proteases apresentam inúmeras atividades, como as atividades anticoagulante, antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária (LI *et al.*, 2007). No entanto, foram observadas alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento, à presença de inibidores de tripsina na alimentação à base de leguminosas (SILVA; SILVA, 2000).

A tripsina é uma serinoprotease que possui em seu sítio ativo uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de serina, aspartato e histidina e as principais famílias de inibidores de serinoproteinases são Kunitz e Bowman-Birk (ROCHA-FILHO, 2015).

A atividade inidora de tripsina pode ser determinada utilizando o substrato sintético N α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida (BApNA). De acordo com Pontual *et al.* (2012), incuba-se a amostra com a tripsina e o BApNA. Caso haja a presença do inibidor, esse irá se ligar a tripsina, impedindo a quebra do substrato (não haverá mudança na coloração da reação). No entanto, na ausência da inibição, o BApNA será quebrado, liberando p-nitroanilida, alterando a cor da reação (figura 5).

Figura 5 - Formação do complexo tripsina/substrato ou nenhuma formação do complexo na presença de um inibidor competitivo de tripsina.



Fonte: Paiva *et al.* (2013)

2.3.3 Precipitação proteica para concentração de lectinas e inibidores de protease

A precipitação utilizando aditivos é fundamental em processos e purificação e concentração de proteínas. Proteínas quando submetidas a precipitação se tornam insolúveis em relação ao meio devido a redução das forças atrativas entre soluto e o solvente ou devido a alteração no meio acarretar o aumento da atração entre as proteínas que se agregam de forma mais intensa e com isso geram a formação de um precipitado (CARVALHO, 2015).

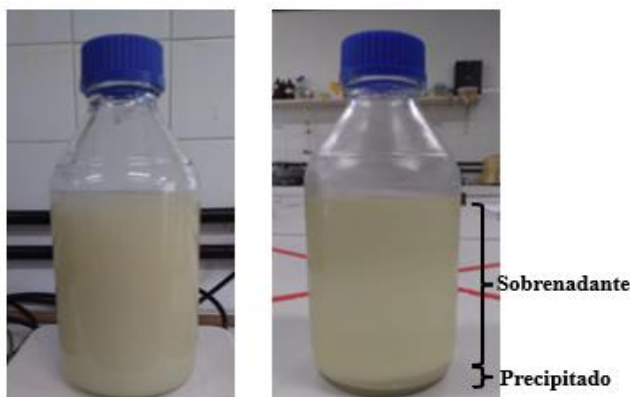
A distribuição de cargas na estrutura da proteína determina a ocorrência ou não de forças de van der Waals (mais fracas e principalmente presentes em compostos apolares) e interações eletrostáticas (mais intensas e típicas de compostos polares), sendo possível manipulá-las por meio de alterações no potencial hidrogeniônico (pH). Quando há equilíbrio entre as cargas positivas e negativas dos aminoácidos presentes nas proteínas definimos como ponto isoelétrico (pI) e corresponde ao pH de solubilidade mínima da proteína em questão (REMIÃO *et al.*, 2003).

O uso de solventes orgânicos, como acetona e álcool, na precipitação ocorre devido a sua característica apolar que tende a interagir com os resíduos hidrofóbicos da proteína, propiciando uma desestabilização das cargas e reduzindo a constante dielétrica da solução que neutraliza as cargas da proteína. No entanto, o uso isolado de solventes causa alterações na estrutura da proteína levando a perda da atividade (CROWELL *et al.*, 2013; TSCHELIESSNIG *et al.*, 2014).

A precipitação de proteínas por sais, uma técnica clássica relatada inicialmente por Hofmeister em 1888, ocorre pela neutralização de cargas superficiais da proteína e redução da camada de hidratação (CARVALHO, 2015). Precipitação ocorrida por altas concentrações de sais são denominadas de *salting-out*, com desidratação da proteína por ação salina, separando em sobrenadante e precipitado (Figura 6). Nesse caso, há uma redução da quantidade de água

disponível sendo mais perceptível em moléculas de proteínas devido a grande área superficial destas moléculas (CHANG, 2009).

Figura 6 - Precipitação de proteínas por alta concentração (0-60% p/v) de sulfato de amônio



Fonte: O Autor (2023)

Sulfatos e fosfatos são os agentes precipitantes de escolha quando o objetivo é isolar proteínas bioativas, uma vez que não ocorre desnaturação proteica (VOET; VOET, 2013). O sulfato de amônio é um dos agentes precipitantes mais utilizados, devido a sua elevada solubilidade que permite o aparecimento de forças iônicas intensas. Sulfato de amônio, em concentração de saturação, aplicado em processo de purificação de imunoglobulinas, mostrou resultados relevantes na recuperação e rendimento proteico (MARIAM *et al.*, 2015). Para eliminação do sal presente no precipitado pode ser utilizado o processo de diálise (ALVES *et al.*, 2020).

2.4 A ESPÉCIE *Moringa oleifera*

A *Moringa oleifera* (família Moringaceae) é uma espécie nativa da África e Ásia, sendo conhecida popularmente como lírio branco, quiabo-de-quina ou simplesmente moringa. Árvore perene e de crescimento rápido, pode ser encontrada em regiões tropicais e semi-áridas, tolerando condições climáticas inóspitas (ANWAR *et al.*, 2007; MARACAJÁ *et al.*, 2010). No Brasil, a espécie foi introduzida como planta ornamental no estado do Maranhão desde 1950 e atualmente pode ser encontrada em toda região Nordeste e em alguns estados do Sul, Sudeste e Centro-oeste (GALLÃO *et al.*, 2006; CYSNE, 2006).

A espécie apresenta copa em formato de guarda-chuva e caule delgado, acinzentado e, na maioria das vezes, único. A raiz, coberta por uma casca espessa, porosa e reticulada de

coloração parda externamente e branca, internamente, se assemelha à espécie raíz-forte, como a *Armoracia rusticana*, na aparência e no sabor picante (CÁCERES *et al.*, 1992). As folhas são verde-pálidas, decíduas alternadas, bipinadas ou tripinadas e com perciolos, medindo de 40 a 50 centímetros de comprimento. As flores são monoclinas, perfumadas e de cor esbranquiçada, onde encontramos cálice e corola, e agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa. Os frutos possuem cor esverdeada e formato de pêndulo linear e triangular com 20 a 50 cm de comprimento. Quando secos, adquirem tonalidade marrom e quebram com facilidade, liberando de 15 a 20 sementes. As sementes, por sua vez, são globoides, com cerca de 1 cm de diâmetro, são externamente escuras na parte interna encontramos uma massa branca e oleosa (Figura 7) (CYSNE, 2006).

Figura 7 - Caule (A), folhas (B), flores (C), fruto maduro (D) e sementes (E) da *M. oleifera*



Fonte: Barros *et al.* (2021)

M. oleifera é utilizada como forragem animal (folhas e sementes), produção de biogás (folhas), componente de fertilizantes (semente) e de adubo verde (folhas), complemento

nutricional (suco das folhas), tratamento da água (sementes) e para fins ornamentais. Estudos atribuem diversas propriedades biológicas à *M. oleifera*, como atividade coagulante (sementes), inseticida (flor, folhas e sementes), antitumoral (sementes), antinoceptiva (sementes), anti-inflamatória (folhas), antimicrobiana (sementes), antidiabética (folhas), antioxidante (folhas), antiespasmódica (folhas) (COELHO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; PANDA *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014).

A *M. oleifera* é bastante utilizada no campo alimentar devido ao seu alto valor nutricional (Tabela 2) principalmente em países com programas de nutrição voltados à população carente. Vagens imaturas são ricas em fibras e baixo teor de gordura e as flores possuem elevado percentual de cálcio, potássio, flavonoides e aminoácidos essenciais. As folhas apresentam quantidade significativa de cálcio, ferro, proteínas e vitaminas (FERREIRA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2010).

A *M. oleifera* tem sido testada em laboratório para tratamento de inúmeras patologias, como infecção de pele, anemia, cólera, asma e até ansiedade e se mostrou eficaz contra processos inflamatórios, epilepsia, hipertensão, febre, úlceras e diversos carcinomas (LAI *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2012; SINGH; SHARMA, 2012; BERKOVICH *et al.*, 2013).

Tabela 03 - Composição nutricional de folhas, vagens e flores de *M. oleifera* em diferentes regiões

Constituinte (g.100g ⁻¹)	África do Sul ¹	Nigéria ²	Brasil ³		México ⁴	
	Folhas	Folhas	Folhas	Folhas	Vagens	Flores
Carboidratos	-	63,11 ± 0,17	44,36 ± 1,02	58,02 ± 1,0	71,76 ± 2,2	68,49 ± 0,5
Proteína	30,29 ± 1,48	17,01 ± 0,10	28,65 ± 0,04	22,42 ± 1,4	19,34 ± 0,2	18,92 ± 1,3
Lipídios	6,50 ± 1,042	2,11 ± 0,11	7,09 ± 0,43	4,96 ± 0,1	1,28 ± 0,1	2,91 ± 0,3
Cinzas	7,64 ± 0,433	7,93 ± 0,12	10,9 ± 0,8	14,60 ± 0,9	7,62 ± 0,3	9,68 ± 0,7
Umidade	9,53 ± 0,194	3,21 ± 0,10	9,0 ± 0,17	-	-	-
Ca (mg.100g ⁻¹)	3,65 ± 0,036	1,91 ± 0,08	2,97	-	-	-
Mg (mg.100g ⁻¹)	0,50 ± 0,005	0,38 ± 0,01	1,90	-	-	-
K (mg.100g ⁻¹)	1,50 ± 0,019	0,97 ± 0,01	4,16	-	-	-
Zi (mg.100g ⁻¹)	3,103 ± 0,341	0,60 ± 0,003	1,58	-	-	-
Fe (mg.100g ⁻¹)	49,07 ± 0,022	107,48 ± 0,002	103,12	-	-	-

1: Moyo *et al.* (2011); 2: Ogbe e Affiku, (2012); 3: Teixeira *et al.* (2014); 4: Sánchez-Machado *et al.* (2010). Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; K: Potássio; Zi: Zinco; Fe: Ferro. (-) Não determinado.

Fonte: O Autor (2023)

2.4.1 Atividades biológicas de tecidos de *M. oleifera*

2.4.1.1 Raiz

As raízes de *M. oleifera* são bastante utilizadas como agente fitoterápico para o tratamento de doenças como a asma, gota, lombalgia, reumatismo, esplenomegalia, inflamações e cálculos renais (KARADI *et al.*, 2006). A raiz possui atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-negativas (*Salmonella enteritica* e *Vibrio parahaemolyticus*) (DALUKDENIYA *et al.*, 2016) e é relatado ser potente agente antiulcerogênico (CHOUDHARY *et al.*, 2013). Na casca da raiz são encontrados alcaloides (moringina e moringinina), flavonoides, saponinas, terpenoides, esteroides, taninos e, um princípio ativo antibiótico, a ptergospermina (SHASTRI, 1995; RAJ *et al.*, 2011).

O pó da raiz surge como uma alternativa promissora ao tratamento de água contaminada por *E. coli*. Morgan, Opio e Migabo (2019) mostraram que o pó da raiz possui atividade antimicrobiana após seu uso frente a água contaminada de córregos. Na maior concentração testada (600 mg/L), o pó da raiz reduziu em 87% as colônias de *E. coli*.

Extrato da raiz, obtido com acetona, apresentou boa atividade antibacteriana e antifúngica com CMI < 1 mg/mL, contra isolados de *B. subtilis*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Os autores também observaram que a atividade antioxidante dos extratos acetona, etanólico, aquoso e metanólico das raízes foi melhor, em comparação com os extratos de folhas (TSHABALALA *et al.*, 2019).

Extratos de raiz também já foram estudados como agentes diuréticos. Karadi *et al.* (2006) testaram os efeitos do extrato aquoso (AqE) e alcoólico (AlcE) em ratos Wistar com urolitíase por aumento da excreção renal de cálcio e fosfato, em decorrência de alimentação rica em etileno glicol. Os extratos não apresentaram toxicidade aguda nos animais a uma dose de 2.000mg/kg. Os extratos foram administrados por 28 dias, por gavagem a uma concentração terapêutica de 200 mg/kg. Ambos os extratos, reduziram significativamente os níveis elevados de oxalato de cálcio, atuando na sua síntese endógena.

O extrato etanólico da raiz, rico em alcaloides, não foi tóxico para camundongos tratados semanalmente (35, 46 e 70 mg/Kg) e diariamente (3,5, 4,6 e 7,0 mg/Kg). No entanto, nas concentrações mais elevadas das aplicações semanais (70mg/kg) e diárias (7,0 mg/kg) foram detectadas alterações nos fatores de coagulação, na quantidade de proteínas totais, níveis de colesterol e bilirrubina sérica (MAZUMDER *et al.*, 1999).

2.4.1.2. Casca do caule

Al-Asmari *et al.* (2015) demonstraram a citotoxicidade do extrato metanólico da casca do caule em linhagens de células de câncer de mama (MDA-MB-231) e câncer de reto (HCT-8) na dose de 500 µg/mL reduziu em 50% a viabilidade celular em ambas as linhagens, com índice de apoptose de 27% para MDA-MB-231 e 29% para HCT-8. A citotoxicidade do extrato pode estar relacionado à presença de isotiocinatos, ácido palmítico e eugenol (AJA *et al.*, 2014; AL-ASMARI *et al.*, 2015).

A casca do caule também é fonte de 4-(α -L-ramnopiranosiloxi)-benzilglicosinolato. Os glicosinolatos possuem um átomo de carbono central ligado a um grupo tioglicose através de um átomo de enxofre e a um grupo sulfato por um átomo de nitrogênio. Os grupos funcionais contendo enxofre e nitrogênio são ótimos sequestradores de metais pesados em solução aquoso. Baseado nisso, Reddy *et al.* (2012), utilizaram o pó seco da casca do caule como um “bio absorvente”, denominado de MOB (*M. oleifera* bark), para remoção de Ni (II) de amostras de água. Os autores concluíram que MOB pode ser utilizado com sucesso na separação do metal pesado da água com uma taxa de eficiência de recuperação de 98,02%.

2.4.1.3 Sementes

As sementes de *M. oleifera* são ricas em proteínas e lipídios e comumente utilizadas na purificação de água como um coagulante natural, precipitando micro-organismos e partículas em suspensão (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). Pesquisas demonstraram efeitos dos compostos coagulantes das sementes como a clarificação de águas e remoção de turbidez (NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998), remoção de corantes de águas descartadas por indústrias (BEDEKAR *et al.* 2016) e remoção de metais pesados (ACHEAMPONG *et al.* 2012). Estudos mostram que proteínas, incluindo lectinas, são envolvidas nesse processo (SANTOS *et al.*, 2005; KATRE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

Saponinas, taninos, alcaloides, isotiocinatos, flavonoides e proteínas, como as lectinas, são exemplos de compostos que já foram isolados das sementes de *M. oleifera* (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012). As sementes são fontes das lectinas que foram isoladas utilizando diferentes procedimentos experimentais e apresentaram características extruturais e físico-químicas, bem como propriedades biológicas diferentes (SANTOS *et al.*, 2005; KATRE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

A lectina cMoL (do inglês, *M. oleifera lectin*) tem atividade coagulante e é capaz de remover ácidos húmicos presentes na água (SANTOS *et al.*, 2009). Oliveira *et al.* (2011) demonstraram que cMoL promoveu mortalidade de pupas de *Anagasta kuehniellae* e atribuíram tal fato à sua propriedade de reconhecer e ligar quitina. Paiva *et al.* (2011) reportaram a atividade inseticida de cMoL (1,5 mg/mL) contra a casta de operários de cupins da espécie *Nasutitermes corniger*. A lectina cMoL ainda foi capaz de aumentar a produção de ROS mitocondriais desencadeando ativação de caspases em células de melanoma (LUZ *et al.*, 2017).

A lectina WSMoL (do inglês, *water-soluble M. oleifera lectin*) mostrou-se eficiente para coagulação e mortalidade de bactérias presentes em águas, não apresentando efeito mutagênico nem genotóxico (concentrações de 0,0125 a 0,8 µg/µL) (FERREIRA *et al.*, 2011; ROLIM *et al.*, 2011) e foi eficiente na remoção de metais pesados presentes na água (FREITAS *et al.*, 2016). A lectina foi ativa contra as bactérias isoladas: *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Micrococcus luteus* (MOURA *et al.*, 2015; CORIOLANO *et al.*, 2020). E também apresentou atividade anti-*Candida* frente a isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (SANTOS *et al.*, 2021).

WSMoL não foi citotóxica para células mononucleares de sangue periférico humano e não hemolítica para eritrócitos murinos. A lectina (6,25 µg/mL) exibiu atividade antiinflamatória em macrófagos de murinos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), regulando a produção de óxido nítrico, TNF-α e IL-1 (ARAÚJO *et al.*, 2013). A lectina também apresentou atividade inseticida contra larvas de *Anagasta kuehniella* (OLIVEIRA *et al.*, 2017), ovos e larvas de *Aedes aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012; AGRA-NETO *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2020). No entanto, na concentração larvicida (CL₅₀ = 0,197 mg/mL) para *A. aegypti* provocou efeitos letais e subletais em embriões e larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*), não sendo recomendado seu uso em ambientes onde existam organismos não alvos (SILVA *et al.*, 2017). Adicionalmente a lectina apresentou efeito estimulante sobre a oviposição em condições de laboratório e de campo simulado (SANTOS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014).

Extrato das sementes de *M. oleifera* apresenta atividade antimicrobiana contra isolados de interesse clínico, como as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, leveduras do gênero *Candida* sp. e dermatófitos como *Trichophyton* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, além dos fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Mucor* sp., e *Rhizopus* sp. (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012;

SHEBEK *et al.*, 2015; BRILHANTE *et al.*, 2015; KINI *et al.*, 2017; SILVA-NETO *et al.*, 2017).

Estudos de toxicidade utilizando as sementes de *M. oleifera* já foram realizados. Oluduro e Aderiye (2009), ofertaram diariamente por 21 dias água com as sementes de *M. oleifera* em diferentes concentrações (1,0 a 10,0 mg/mL) a ratos Wistar e verificaram que doses acima de 2,0 mg/mL ocasionavam danos hepáticos nos animais. Kim *et al.* (2018), em seu estudo de toxicidade oral aguda com extrato hidroalcolico enriquecido com isotiocianato-1, mostrou que apenas na maior concentração testada de 1,0 g/Kg foi capaz de desencadear toxicidade nos animais, com perda de peso corporal e diminuição do consumo alimentar. Essa concentração também ocasionou necrose em células germinativas testiculares e distensão gastrointestinal.

2.4.1.4 Flores

As flores de *M. oleifera* são bastante utilizadas no tratamento de ascites, reumatismo e picadas venenosas, estimulantes cardíacos e, por serem ricas em cálcio e potássio, são consumidas por algumas populações (ANWAR *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2010).

As flores apresentam propriedades antioxidantes devido à presença de α e γ -tocoferol e atividade antibacteriana atribuída ao alcaloide pterigospermina (ANWAR *et al.*, 2007; FALASCA; BERNABÉ, 2008). Moura *et al.* (2011), reportaram que o extrato aquoso e a fração proteica precipitada de flores de *M. oleifera* foram ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

A atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das flores mediada por citocinas em macrófagos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), foi investigada por Tan *et al.* (2015). O extrato inibiu a produção de óxido nítrico (NO), reduziu a expressão dos mediadores inflamatórios NF- κ B, iNOS e COX-2 e as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α e aumentou os níveis de I κ B e citocina IL-10 rapidamente, sugerindo que o extrato possui ação anti-inflamatória.

O extrato aquoso de flor de *M. oleifera* contém metabólitos secundários como triterpeno, esterol e flavonoides, além de um inibidor de tripsina proteico denominado de MoFTI (*M. oleifera* flower trypsin inhibitor) (PONTUAL *et al.*, 2012). Pontual *et al.* (2012) associaram o efeito deletério na mortalidade de larvas de *A. aegypti*, à presença do inibidor proteico no extrato. Rocha-Filho *et al.* (2015), relataram o efeito desse extrato em

Biomphalaria glabrata e *Schistosoma mansoni* e toxicidade em larvas de *Artemia Salina*. O extrato aquoso das flores foi tóxico para indivíduos adultos de *B. glabrata* de maneira dose-dependente, no entanto apresentou uma CL_{50} ($0,2 \pm 0,015$ mg mL) bem menor para *A. salina*, devendo seu uso ser controlado. O extrato aquoso das flores e MoFTI foram avaliados quanto a toxicidade para macrófagos peritoneais murinos e células Vero e valores de CL_{50} acima de 400 μ g/mL foram determinados para macrófagos peritoneais e ausência de toxicidade para células Vero na concentração de até 500 μ g/mL (PONTUAL *et al.*, 2018).

MoFTI foi citotóxico para células do sarcoma 180 e, em modelo animal, provocou efeito antiangiogênico e causou forte redução no peso do tumor (90,1% - 97,9%), sem demonstrar evidências de toxicidade (15 e 30 mg/kg) (PATRIOTA *et al.*, 2020). MoFTI também foi capaz de reduzir o edema de pata e, em um modelo de peritonite, MoFTI reduziu a migração leucocitária, extravasamento de plasma e os níveis de NO, TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-4 e IL-10 (PATRIOTA *et al.*, 2021).

2.4.1.5 Folhas

As folhas de *M. oleifera* têm alto valor nutricional com altos níveis de proteínas, vitaminas, potássio, cálcio, fósforo, ferro, aminoácidos essenciais, antioxidantes (incluindo β -caroteno) e flavonoides (OHTAA *et al.*, 2017; VERGARA-JIMENEZ *et al.*, 2017; SULASTRI *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2018). No entanto, a composição bioativa das plantas depende de vários fatores, como estado fisiológico da planta, condições climáticas e origem geográfica (BLASI *et al.*, 2016, LOMBARDI *et al.*, 2017).

Devido à alta concentração de vitaminas, minerais, aminoácidos e metabólitos secundários nas folhas, a população utiliza a moringa na prevenção de mais de 300 doenças, embora não existam estudos científicos suficientes que atestem a dose segura para uso (FAHEY, 2005; MANUWA; SEDARA; TOLA, 2020). Atividades biológicas de extratos foliares de *M. oleifera* e compostos isolados foram relatados na literatura. Atividades anti-inflamatórias, antidiabéticas, antioxidantes e anticâncer foram detectadas em preparações a partir de folhas de moringa (ANWAR *et al.*, 2007). É possível que as propriedades farmacológicas das folhas de *M. oleifera* estejam intimamente associadas à presença de flavonoides, taninos, glucosinolatos, carotenoides e proteínas (MA *et al.*, 2020).

Flavonoides também são encontrados nas folhas de *M. oleifera*. Os flavonoides possuem baixa toxicidade e há um crescente interesse público e industrial por essa classe de composto (GULATI, 2015; SEVTAP *et al.*, 2019). Estudos com folhas de *M. oleifera*,

utilizando diferentes solventes de extração (SREELATHA; PADMA, 2009) mostraram que o extrato aquoso e hidroetanólico continham flavonoides em sua constituição e Suresh *et al.* (2020) mostraram que o extrato metanólico de folhas também é rico em flavonoides.

As folhas de *M. oleifera* contêm uma quantidade considerável de proteína bruta, em comparação com outras partes da planta, e a composição nutricional pode variar de acordo com a localidade, como mostra a tabela 01 (SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2010; MOYO *et al.*, 2011; OGBE; AFFIKU, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Nas folhas também são encontradas proteínas de baixa digestibilidade (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Em trabalho recente, nosso grupo de pesquisa identificou a presença de fatores antinutricionais (lectina e inibidor de tripsina) em preparações proteicas obtidas das folhas de *M. oleifera*.

2.4.1.5.1 Toxicidade de folhas de *M. oleifera*

Devido à ausência de avaliação e comprovação de segurança do uso em alimentos e a comercialização irregular dos produtos à base de *M. oleifera*, a Anvisa (Agência Brasileira de Vigilância Sanitária) proibiu, por meio da Resolução RE n° 1.478/2019, a fabricação, importação, comercialização, propaganda e distribuição de alimentos que contenham *M. oleifera*. A maioria dos produtos comercializados e consumidos pela população é à base de folhas.

Asare *et al.* (2012), em estudo de toxicidade aguda em ratos, utilizou extrato aquoso (3.000 mg/Kg) de folhas de *M. oleifera*, por administração oral. A concentração elevada não foi capaz de causar toxicidade nos animais, no entanto, o extrato etanólico das folhas administrado por gavagem uma única vez em uma dose de 2000 mg/Kg, causou alterações em enzimas hepáticas séricas e na morfologia dos hepatócitos (OKUMU *et al.*, 2016).

Em um estudo de toxicidade, o extrato aquoso das folhas foi administrado por 60 dias nas concentrações de 250, 500 e 1500 mg/Kg, não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos e na qualidade espermática dos animais que receberam o tratamento, mas houve uma diminuição do consumo alimentar dependente da dose (AWODELE *et al.*, 2012).

Extrato metanólico administrado oralmente (100, 200, 400 e 1000 mg/Kg) por 28 dias consecutivos em ratos, foi capaz de causar alterações histopatológicas no fígado, rins, pulmão, baço e coração e elevar o número de leucócitos em todas as concentrações testadas. A dose de 1000 mg/Kg também desencadeou alterações comportamentais (AJAYI; MOODY; AKINTAYO, 2016).

Lesões hepática e renal foram observadas pelas alterações séricas dos níveis de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e creatinina em animais que receberam as doses de 200 e 400 mg/Kg de extrato metanólico de folhas por oito semanas (OYAGBEMI *et al.*, 2013).

Um isolado proteico obtido das folhas de *M. oleifera* com ação semelhante à insulina (Mo-LPI), não foi tóxico para camundongos em uma administração em dose única de 2.500 mg/kg. Os animais não apresentaram alteração em seu padrão comportamental bem como não houve diferença significativa no peso corporal ou consumo alimentar quando comparado com o grupo não tratado (PAULA *et al.*, 2017)

2.4.1.5.2 Atividade antioxidante e efeito hepatoprotetor de folhas de *M. oleifera*

Compostos ricos em polifenóis possuem propriedades antioxidantes e são capazes de reduzir os danos oxidativos em tecidos por meio da eliminação dos radicais livres (NIEDZWIECKI *et al.*, 2016; THAPA; CARROLL, 2017). Pina *et al.* (2018) reportaram a presença de compostos antioxidantes como ácido clorogênico, glucosídeos e flavonoides em extrato metanólico de folhas de *M. oleifera*.

Estudos realizados por Sinha *et al.* (2011; 2012) mostraram que camundongos albinos receberam previamente a uma exposição por radiação ionizante para aumento do estresse oxidativo, extrato hidroetanólico de folhas de *M. oleifera* por 15 dias consecutivos. O tratamento prévio foi eficaz na restauração nos níveis de glutathione (GSH) e preveniu a peroxidação oxidativa (SINHA *et al.*, 2011; 2012). Uma; Fakurazi; Hairuszah (2010) demonstraram que a pré-administração de 3.000 mg/Kg de extrato hidroetanólico de folhas de *M. oleifera* em camundongos com hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol diminuiu significativamente a peroxidação lipídica e restaurou os níveis de glutathione-S transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) no fígado dos animais, em comparação com o controle.

O extrato etanólico das folhas também reduziu lesão hepática decorrente de dieta rica em gordura em camundongos. Os resultados sugeriram que o tratamento protegeu o fígado dos danos causados pela dieta hiperlipídica, conforme parâmetros de histologia, enzimas hepáticas séricas e antioxidantes e uma menor peroxidação lipídica (DAS *et al.*, 2012).

Extrato etanólico de folhas de *M. oleifera* (150 e 300 mg/kg v.o.) aplicado em modelo de toxicidade hepática experimentalmente induzida por diclofenaco sódico (DcNa) em ratos machos, normalizou a atividade da glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase e

glutathiona, quando comparados com os animais não tratados com o extrato (EL-HADARY; RAMADAN, 2019).

Animais diabéticos tratados com o isolado proteico Mo-LPI de folhas de *M. oleifera* (PAULA *et al.*, 2017) tiveram uma redução do estresse oxidativo pela diminuição do nível de malondialdeído e aumento da atividade da enzima catalase; o estudo demonstrou o efeito antioxidante de Mo-LPI.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões obtidos para esse trabalho foram divididos em dois artigos:

- Avaliação da citotoxicidade e toxicidade oral aguda do extrato salino e da fração rica em proteínas de folhas de *Moringa oleifera* Lam, e;
- Avaliação da toxicidade subaguda, atividade antioxidante e análise metabolômica em ratos wistar tratados com fração rica em proteínas das folhas de *Moringa oleifera* Lam.

3.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SALINO E DA FRAÇÃO RICA EM PROTEÍNAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* LAM;



ISSN: 0378-8741

MANUSCRITO SUBMETIDO A FOOD BIOSCIENSE

Fator de Impacto: 4.240 (2021)

Qualis CAPES: B1 (2016)

Avaliação da citotoxicidade e toxicidade oral aguda do extrato salino e da fração rica em proteínas de folhas de *Moringa oleifera* Lam.

Robson Raion de Vasconcelos Alves^a, Alisson Macário de Oliveira^a, Gabryella Borges dos Prazeres^a, Abdênego Rodrigues da Silva^a, Franciele Florencio Costa^b, Bárbara Rafaela da Silva Barros^c, Talita Giselly dos Santos Souza^d, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^c, Magda Rhayanny Assução Ferreira^b, Luiz Alberto Lira Soares^b, Cristiano Aparecido Chagas^d, Thiago Henrique Napoleão^a, Mariana Pinheiro Fernandes^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^c*Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^d*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.*

*Autor Correspondente. E-mail: patricia.paiva@ufpe.br

Resumo

As folhas de *Moringa oleífera* Lam. (rabanete) são ricas em proteínas e amplamente utilizadas na medicina e na alimentação. Este estudo investigou a presença de metabólitos secundários, ferro e proteínas antinutricionais (inibidor de tripsina e lectina) em extrato foliar (LE) e fração rica em proteínas (PRF) obtidos das folhas de *M. oleífera* e determinou a citotoxicidade para linfócitos mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), atividade hemolítica e toxicidade aguda *in vivo* e genotoxicidade para camundongos. A presença de inibidor de tripsina e concentração de lectina e ferro foi determinada. Análise fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Citotoxicidade para PBMC e ensaio hemolítico foram realizados. A toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg administrada oralmente a camundongos por 14 dias foi avaliada. A genotoxicidade foi avaliada por ensaio cometa e teste de micronúcleo. Rutina, vixetina e inibidores de tripsina foram detectados em LE e PRF, enquanto lectinas estiveram presentes apenas em PRF. Nenhuma das amostras foi citotóxica. Os animais tratados com LE e PRF apresentaram alterações comportamentais como autolimpeza, pedalada e diminuição da deambulação apenas na primeira hora após o tratamento. Os parâmetros hematológicos dos animais do grupo tratado foram semelhantes aos do grupo não tratado. Um aumento significativo nos níveis séricos de alanina aminotransferase e discreta infiltração leucocitária com vacuolização citoplasmática nos hepatócitos foram detectados em animais tratados com LE. As preparações não foram genotóxicas ou mutagênicas. LE e PRF não são agentes antinutricionais e não apresentam toxicidade aguda. LE e PRF não são agentes genotóxicos ou mutagênicos. O presente estudo contribui para a determinação da segurança do uso de proteínas foliares de *M. oleífera*.

Palavras-chave: Lectina. Inibidor de Tripsina. Rutina. Vitexina.

47

48 **Lista de abreviaturas:** ALP: fosfatase alcalina; ALT: alanina aminotransferase; AnnV:
49 anexina V; ANOVA: análise de variância; AST: aspartato aminotransferase; BApNA: N- α -
50 benzoil-DL-arginil-4-nitroanilida; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular;
51 CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DF: frequência de dano; DI: índice de danos;
52 DP: desvio padrão; EDTA: ácido etilenodiamina tetraacético; FITC: isotiocianato de
53 fluoresceína; GGT: gama-glutamil transferase; HCM: hemoglobina corpuscular média; LE:
54 extrato de folha; MN: micronúcleo; PBMCs: células mononucleares do sangue periférico;
55 PBS: solução salina tamponada com fosfato; PC: controle positivo; PCEs: eritrócitos
56 policromáticos; PI: iodeto de propídio; PRF: fração rica em proteínas; TLC: cromatografia em
57 camada fina; VCM: volume corpuscular médio.

58

1. Introdução

O tratamento de doenças utilizando plantas medicinais é uma prática importante na sociedade. Devido à sua origem natural, as plantas são frequentemente utilizadas sem comprovação científica de eficácia e segurança, podendo causar efeitos nocivos dependendo da dose e forma de administração (Adewale *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018). Ensaios *in vivo* são necessários à avaliação da segurança de compostos naturais e a toxicidade é detectada quando se observa a morte do animal, alterações no comportamento, presença de lesões em órgãos e alterações nos biomarcadores séricos (Oliveira *et al.*, 2016). Testes de toxicidade aguda podem ajudar a definir o grau de toxicidade intrínseca de uma substância, auxiliar na identificação de órgãos que podem ser alvo de efeitos indesejados e na seleção de doses a serem utilizadas para estudos de longo prazo (Almeida, 2014).

Moringa oleífera Lam. (Moringaceae) é uma espécie nativa da Ásia e é popularmente conhecida como rabanete ou moringa. É uma árvore perene e de rápido crescimento que pode ser encontrada em regiões tropicais e semiáridas (Maracajá *et al.*, 2010; Kou *et al.*, 2018). As pessoas utilizam as folhas de *M. oleífera* para preparar saladas e chás e a farinha derivada do pó da folha de moringa é consumida como suplemento multivitamínico (Manuwa *et al.*, 2020). As folhas de *M. oleífera* apresentam alto valor nutricional devido à presença elevada de proteínas, vitaminas, potássio, cálcio, fósforo, ferro, aminoácidos essenciais, antioxidantes (incluindo β -caroteno) e flavonóides (Ohtaa *et al.*, 2017; Vergara-Jimenez *et al.*, 2017; Sulastri *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018). Na medicina tradicional, as folhas de moringa são usadas para tratar feridas, dores de cabeça, hemorróidas, febre, dor de garganta, bronquite, infecções nos olhos e ouvidos, escorbuto e catarro (Anwar *et al.*, 2007).

As propriedades biológicas das folhas de *M. oleífera* também foram demonstradas. O consumo de pó de folhas secas leva a uma redução significativa nos níveis de glicose no

sangue em pacientes (Owens III *et al.*, 2020). O uso de um extrato metanólico de folhas resultou em redução significativa da perda de peso, polidipsia, tolerância à glicose e níveis plasmáticos de enzimas hepáticas, em ratos com diabetes induzida por tratamento com estreptozotocina (Muzumbukilwa *et al.*, 2019). Berkovich *et al.* (2013) e Tiloke *et al.* (2018) mostraram que extratos aquosos de folhas causaram apoptose em vários tipos de células cancerígenas, com supressão de vias de sinalização pró-inflamatórias e promoção de um ambiente antiproliferativo. A bioatividade das folhas de *M. oleifera* tem sido associada à presença de flavonóides, taninos, glucosinolatos, carotenóides e proteínas (Ma *et al.*, 2020).

As folhas de *M. oleifera* contêm uma quantidade considerável (28,7%) de proteínas com baixa digestibilidade *in vitro*, sendo relatada a presença de inibidores de tripsina e lectinas (Khatun *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2012, 2014). Lectinas e inibidores de tripsina podem ser considerados fatores antinutricionais que interferem na absorção de nutrientes e levam ao desenvolvimento de hipertrofia pancreática (Kala; Mohan, 2012). Alatorre-Cruz *et al.* (2018) relataram que uma fração de lectina obtida de *Phaseolus acutifolius* exibiu toxicidade em ratos em uma dose oral diária de 50 mg/kg administrada por seis semanas. A fração levou a um aumento na contagem de granulócitos no sangue, causou hipertrofia com vacuolizações e alargamento trabecular no pâncreas, e desencadeou atrofia das vilosidades do intestino delgado e pontos de cripta do cólon, sem normalização em um período de recuperação de duas semanas após a conclusão de tratamento.

Asare *et al.* (2012) demonstraram que o extrato aquoso obtido das folhas de *M. oleifera* não apresentou toxicidade em ratos na dose de 3000 mg/kg; entretanto, em levantamento bibliográfico, revelamos a indisponibilidade de estudos referentes ao exame de toxicidade de preparações proteicas derivadas de folhas. Assim, o presente estudo foi conduzido para investigar o extrato salino (LE) e a fração rica em proteínas (PRF) obtidas das folhas de *M. oleifera* quanto a presença de metabólitos secundários, ferro, inibidor de tripsina

e lectina, e determinar a citotoxicidade para linfócitos humanos, atividade hemolítica e toxicidade aguda *in vivo* e genotoxicidade em camundongos.

2. Materiais e métodos

2.1. Extrato e fração rica em proteínas das folhas

Folhas de *Moringa oleifera* Lam. (verificado com www.theplantlist.org), conhecido como rabanete, foram coletados em março de 2018 no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Brasil (-8.0510095,-34.9483206), com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (38690) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. Um exemplar de comprovante (número 73.345) está depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima (Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brasil).

As folhas secas foram trituradas para obter o pó da amostra, após isso o pó (7,5 g) foi homogeneizado com NaCl 0,15 M (100 mL) usando um liquidificador (5 min a 25 °C). Em seguida, a mistura foi filtrada em papel de filtro e o filtrado foi centrifugado (9000 × g, 15 min, 4°C). O sobrenadante coletado correspondeu ao extrato foliar (LE) a 7,5%.

Para obter a fração rica em proteínas (PRF), o pó da folha (7,5 g) foi suspenso em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 3,0, contendo NaCl 0,15 M (100 mL) e homogeneizado por 4 h a 25°C usando um agitador magnético. Após a filtração e centrifugação (9000 × g, 15 min, 4°C), o sobrenadante obtido foi tratado com sulfato de amônio a 60% de saturação de acordo com os métodos descritos por Green e Hughes (1955). Em seguida, foi realizada centrifugação (9000 × g, 15 min, 4°C) e o precipitado foi coletado, em seguida dialisado contra água destilada, correspondente ao PRF.

2.2. Determinação da concentração de proteína e a presença de inibidor de tripsina e lectina

A concentração de proteína foi determinada de acordo com os protocolos relatados por Lowry *et al.* (1951), utilizando uma curva padrão (31,25–500 µg/mL) de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A presença de inibidor de tripsina foi investigada de acordo com os métodos descritos por Pontual *et al.* (2012) usando microplacas de 96 poços. Alíquotas (10 e 20 µL) de amostras foram incubadas com 5 µL de 0,1 mg/mL de tripsina bovina (Sigma-Aldrich), 5 µL de 8 mM N- α -benzoyl-DL-arginil-4-nitroanilida (BAPNA), e o volume foi ajustado para 200 µL usando 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 em 0,15 M NaCl. No tubo controle, a amostra foi substituída por tampão Tris. A absorbância a 405 nm foi determinada no tempo zero e após incubação a 37°C por 120 min; o ensaio foi realizado em triplicado. Uma unidade de atividade do inibidor de tripsina foi definida como a quantidade de inibidor que diminuiu a absorbância em 0,01 em comparação com o controle.

A presença de lectinas foi avaliada por meio do ensaio de atividade hemaglutinante realizado em microplacas de 96 poços com fundo em V, de acordo com os métodos descritos por Paiva e Coelho (1992). Alíquotas (50 µL) da amostra foram diluídas em série em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de uma suspensão (2,5%, v/v) de eritrócitos de coelho submetidos à fixação com glutaraldeído (Bing *et al.*, 1967). A atividade hemaglutinante foi registrada como o recíproco da maior diluição da amostra que promoveu a hemaglutinação. A atividade hemaglutinante específica foi definida como a razão entre a atividade hemaglutinante (título⁻¹) e a concentração de proteína (mg/mL).

2.3. Determinação da concentração de ferro

A concentração de ferro foi determinada usando um reagente comercial (Labtest Diagnostics SA, Brasil). Dez miligramas de peso seco de LE e PRF foram diluídos em 1,0 mL de água deionizada (10 mg/mL). Após centrifugação ($1400 \times g$ por 15 min a 28°C), o sobrenadante (0,25 mL) foi usado para medir o teor de ferro. Água deionizada foi usada como controle negativo e uma solução de ferro ($500 \mu\text{g/dL}$) foi usada como controle positivo. A absorbância foi medida em 560 nm em espectrofotômetro com ajuste para zero usando o branco, e a absorbância inicial (Ab_1) foi determinada. Adicionou-se ferrozina ($0,025\text{-}28 \text{ mmol/L}$) e a mistura foi incubada a 37°C em banho-maria por 10 min, após isso a absorbância final (Ab_2) foi determinada. A concentração de ferro foi expressa em $\mu\text{g/dL}$ usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração de ferro } (\mu\text{g/dL}) = (Ab_2 - Ab_1) * 500 / Ab_p$$

onde Ab_1 representa a absorbância inicial, Ab_2 representa a absorbância final e Ab_p denota a diferença entre a absorbância final e o controle positivo inicial.

2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

LE, PRF ou padrões (1 mg/mL) foram aplicados manualmente em placas cromatográficas de sílica gel 60-F254 (Macherey-Nagel, Alemanha). As placas foram analisadas em cubas após saturação com a fase móvel por 15 min a 28°C . Após a eluição, as placas foram secas a 28°C e observadas sob ultravioleta (254 e 365 nm) e luz visível. Em seguida, foram submetidos ao desenvolvimento utilizando reagentes específicos para cada metabólito. Foram utilizados os seguintes padrões: taninos hidrolisáveis, ácido gálico; taninos condensados, catequina; flavonóides, rutina e quercetina; derivados cinâmicos, ácido

clorogénico e ácido cafeico; terpenos e esteróides, β -sitosterol; cumarinas; saponinas, escina; quinonas, senosídeo A; alcalóides, atropina; e açúcares redutores, D-maltose.

2.5. *Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

Amostras de LE e PRF (5 mg) foram transferidas para um balão volumétrico de 10 mL e submetidas à solubilização em etanol 50% (v/v). Finalmente, eles foram filtrados através de membranas de PVDF (0,45 μ m). A análise por HPLC foi realizada utilizando o sistema Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e equipado com uma bomba binária (HPG-3 \times 00RS), um desgaseificador e um amostrador equipado com um *loop* de 20 μ L (ACC-3000). O comprimento de onda foi fixado em 350 nm. As separações cromatográficas foram realizadas usando a coluna Phenomenex C18 (250 mm \times 4,6 mm d.i., 5 μ m) equipada com a pré-coluna Phenomenex C18 (4 mm \times 3,9 μ m). As separações foram realizadas a 25°C. As fases móveis consistiam em água ultrapura (A) ou metanol (B) acidificada com ácido trifluoroacético a 0,05%, e a vazão foi ajustada para 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi considerado da seguinte forma: 0–5 min, 20%–25% B; 5–10 min, 25%–40% B; 10–20 min, 40%–80% B; 20–25 min, 80%–85% B; 25–30 min, 85%–40% B; 30–32 min, 40%–20% B; 32–34 min, 20% B. Os dados foram analisados após a injeção em triplicata e foram processados usando o software Chromeleon 6.8 (Thermo Fisher Scientific). Os padrões (vitexina e rutina; Sigma-Aldrich) preparados em metanol e diluídos em água purificada a 10 μ g/mL foram submetidos à análise nas mesmas condições descritas à amostra. Os conteúdos foram calculados de acordo com as equações lineares derivadas dos padrões utilizados.

2.6. Citotoxicidade para linfócitos mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs)

Amostras de sangue (volume amostral: 45 mL) foram coletadas de cinco doadores saudáveis não fumantes e introduzidas em tubos de heparina (Vacuette). Todos os doadores assinaram e forneceram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Humano da UFPE (protocolo nº 33719520.9.0000.5208). PBMCs foram coletados por centrifugação em gradiente de densidade das amostras usando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia), e a viabilidade celular foi avaliada usando azul de tripano (Sigma-Aldrich). As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi superior a 98%. Para uso em ensaios, PBMCs foram cultivados no meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) com 10% (p/v) de soro fetal bovino (FBS; Sigma-Aldrich) em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça) em uma densidade de 10^6 células/poço.

Os linfócitos foram cultivados na ausência (controle) ou presença de LE ou PRF (6,25–50,0 µg/mL) por 24 h. Após centrifugação (450 g, 4°C, 10 min), o sobrenadante foi descartado e 1,0 mL de solução tamponada de fosfato salino (PBS) foi adicionado ao precipitado. As células foram ressuspensas e submetidas a centrifugação nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspenso em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM) e transferido para um tubo citômetro marcado. Adicionou-se anexina V (AnnV) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500) e iodeto de propídio (PI, 20 µg/mL). A citometria de fluxo foi realizada na plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA), e os resultados foram analisados no software CellQuest Pro (BD Biosciences). As células AnnV–/PI+ foram consideradas necróticas e as células AnnV+/PI– foram consideradas em estágios iniciais de apoptose. As células duplamente negativas foram consideradas células viáveis.

2.7. Ensaio hemolítico

Amostras de sangue (volume amostral: 5–10 mL) foram obtidas de voluntários saudáveis e introduzidas em tubos heparinizados (protocolo do Comitê de Ética nº 3719520.9.0000.5208). Os eritrócitos humanos foram isolados por centrifugação ($500 \times g$, 10 min). Os eritrócitos foram submetidos a cinco lavagens com NaCl 0,15 M. A cada tubo, foram adicionados 1,1 mL de suspensão de eritrócitos (2%, v/v) e 0,4 mL de LE ou PRF (0,125–2,0 mg/mL de proteína). Além disso, NaCl 0,15 M e saponina (0,0025%) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após 60 min de incubação (37°C), a centrifugação ($1400 \times g$, 28°C ou 10 min) foi realizada e a absorbância do sobrenadante a 540 nm foi registrada. A atividade hemolítica foi expressa como uma porcentagem de hemólise usando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = (A_S - A_N) \times 100 / (A_P - A_N).$$

Onde, A_S representa a absorbância no teste de amostra, A_N denota absorbância no controle negativo e A_P indica absorbância no controle positivo.

2.8. Animais

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus* L.) pesando 30-35 g; os animais foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da UFPE. Antes da realização dos experimentos, os camundongos foram aclimatados por cinco dias no laboratório de experimentação animal do

Departamento de Bioquímica da UFPE. Os animais foram mantidos a uma temperatura de $21\pm1^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12:12 e acesso *ad libitum* a ração (Purina Brasil, São Paulo, Brasil) e água. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (processo nº 0070/2018).

2.9. Toxicidade oral aguda

2.9.1. Tratamentos

LE e PRF foram dissolvidos em NaCl 0,15 M e a toxicidade aguda foi avaliada por administração oral. Os camundongos foram separados em três grupos ($n = 3$): um grupo controle que recebeu veículo e dois grupos experimentais que receberam LE ou PRF na dose de 2000 mg/kg de peso corporal (OECD, 2001). Os camundongos foram observados inicialmente nas primeiras 4 horas e até o 14º dia para sinais comportamentais, conforme métodos descritos por Malone (2003). O peso corporal e o consumo de água e ração foram avaliados diariamente. Ao final do 14º dia de tratamento, os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (2:1, v/v, i.p.) para coleta de sangue. Posteriormente, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, após o qual foram coletadas amostras de fígado, rim, baço e coração para análise histológica. Além disso, o peso de cada órgão foi determinado e a massa e o peso relativo foram calculados (peso do órgão por 10 g de peso corporal).

2.9.2. Análise bioquímica e hematológica

As amostras de sangue dos animais foram coletadas em um tubo contendo um gel separador. Os níveis séricos de proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamyl transferase (GGT), uréia e creatinina foram medidos por meio de kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) com o auxílio do analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basileia, Suíça). A análise hematológica foi realizada por meio de amostras de sangue coletadas em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e avaliadas por meio de analisador automático (Animal Blood Counter-ABC Vet, Montpellier, França) e por microscopia óptica considerando os seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos, nível de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagens de leucócitos totais e diferenciados.

2.9.3. Avaliação histopatológica

As amostras de fígado, rim, baço e coração dos animais controle e tratados foram processadas para análise histológica. Resumidamente, fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, v/v), após isso foram desidratados com uma série gradual de etanol (70-100%); em seguida, foram diafanizados em xilazina e incluídos em parafina. Cortes histológicos (5 mm de espessura) foram submetidos à coloração com hematoxilina-eosina e montados em lâminulas. Os cortes foram observados em microscópio Olympus acoplado à câmera digital Moticam 1,3 MP (Motic Incorporation Ltd, Causeway Bay, Hong Kong).

2.10. Ensaios de genotoxicidade

2.10.1. Grupos experimentais e coleta de sangue

Para avaliar se LE e PRF podem induzir danos genéticos e mutagênese, o ensaio do cometa e o teste de micronúcleo (MN) foram realizados usando amostras do sangue periférico dos animais. Vinte camundongos machos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais com cinco animais cada. O grupo controle negativo (grupo NC) recebeu 0,3 mL de NaCl 0,15 M via gavagem, e os grupos teste receberam 2000 mg/kg LE (grupo LE) e 2000 mg/kg PRF (grupo PRF) via gavagem. O quarto grupo recebeu ciclofosfamida (Sigma-Aldrich, C0768) por via intraperitoneal na dose de 25 mg/kg de peso corporal e foi considerado um controle positivo (grupo PC) para ambos os ensaios. Amostras de sangue foram coletadas por incisão na porção final da cauda 6 h e 24 h após a administração das amostras para a realização dos ensaios cometa e micronúcleo, respectivamente. Os animais foram então sacrificados por meio da administração de altas doses de anestésicos (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg).

2.10.2. Ensaio do cometa

O dano genético às células sanguíneas nucleadas foi avaliado pelo ensaio do cometa seguindo o protocolo proposto por Tice *et al.* (2000). Inicialmente, uma amostra de sangue de 15 µL obtida dos grupos controle e teste foi homogeneizada usando 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5% LM), e essa mistura foi então depositada em lâminas revestidas com agarose 0,5% padrão. As lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas a 4°C por 10 minutos. Após o resfriamento, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em uma solução de lise (2,5 M cloreto de sódio [NaCl], 100 mM EDTA], 10 mM Tris, 1%

Triton X-100, DMSO 10%, pH 13) por 48 h. Após a lise, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese alcalina (NaOH 1 M e sal dissódico EDTA 200 mM, pH 13) por 20 min e depois submetidas à eletroforese em câmara horizontal por 20 min a \pm 300 mA e 32 V. As lâminas foram submetidos à neutralização por 15 min em tampão Tris-HCl 0,4 M a pH 7,5, após isso foram fixados por 5 min em etanol absoluto. Para visualização dos nucleóides, as lâminas foram submetidas à coloração com 30 μ L de solução de brometo de etídio (0,0002% p/v). As análises foram realizadas usando um microscópio de fluorescência (Zeiss-imager M2) com uma objetiva de ampliação de 40x e um filtro AlexaFluor 546. Todos os procedimentos, inclusive os de coleta de sangue, foram realizados sob luz vermelha.

Para quantificar o dano ao DNA, foram avaliados 100 nucleoides derivados de cada animal. Cada núcleo foi classificado em uma das cinco classes a seguir de acordo com a proporção de DNA na cauda e na cabeça do cometa: 0 (sem dano), 1 (leve dano aparente), 2 (dano médio), 3 (médio-alto dano) e 4 (alto dano) (Collins *et al.*, 2008). Para análise de 100 nucleoides, cada animal foi avaliado usando dois parâmetros, a saber, índice de dano (DI) e frequência de dano (DF). Os valores de DI variam de 0 (sem dano) a 400 (dano máximo), enquanto os valores de DF variam de 0 a 100 para cada animal testado (Collins *et al.*, 2008; Sousa-Coelho *et al.*, 2018).

2.10.3. Teste de micronúcleo

Amostras de sangue (volume de amostra: 5 μ L) obtidas de todos os animais tratados foram colocadas em lâminas previamente revestidas com laranja de acridina e cobertas com uma lamínula (Hayashi *et al.*, 1990). Três lâminas foram preparadas por animal e 2.000 eritrócitos policromáticos (PCEs) foram analisados coletivamente para verificar a presença de

micronúcleos. A análise foi realizada usando um microscópio de fluorescência (Zeiss-imager, M2) com uma objetiva de ampliação de 40x e um filtro AlexaFluor 488 (OECD, 2016).

2.11. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

3. Resultados

Este estudo auxiliou na caracterização de duas preparações foliares de *M. oleifera* quanto à presença de metabólitos secundários, ferro e duas classes de proteínas, bem como na determinação da toxicidade das preparações por meio de ensaios *in vitro* envolvendo células humanas e ensaios *in vivo* envolvendo camundongos. As folhas de *M. oleifera* contêm inibidor de tripsina e lectina (Khatun *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2012, 2014); no entanto, o uso de NaCl 0,15 M para extração de proteína aqui realizada resultou na obtenção de LE contendo proteína (4,4 mg/mL) e exibindo apenas atividade inibidora de tripsina (55,38 U/mg). Em seguida, com o objetivo de solubilizar a lectina, foi utilizado citrato-fosfato 0,1 M pH 3,0 contendo NaCl 0,15 M como solução de extração. De fato, o extrato tampão apresentou atividade inibidora de tripsina (54,5 U/mg) e lectina (atividade hemaglutinante específica: 1,97) e foi selecionado para produção da fração rica em proteínas (PRF). PRF continha 6,4 mg/mL de proteína e apresentou atividades de inibidor de tripsina (87,89 U/mg) e lectina (atividade hemaglutinante específica: 2,5) superiores às observadas para o extrato tampão. LE e PRF foram selecionados para investigação posterior por diferirem em sua composição

protéica, o que permitiria identificar a contribuição de cada classe para as propriedades biológicas.

A análise de CCD revelou a presença de flavonóides em LE e PRF. A análise de CLAE foi realizada monitorando o perfil em um comprimento de onda de 350 nm para a detecção de flavonóides (Figura 1A). Vitexina e rutina foram identificadas em ambas as preparações em picos com tempos de retenção em torno de 24,70 min e 25,75 min, respectivamente. Os espectros de varredura dos picos confirmaram a presença de rutina e vitexina (Figura 1B). Os teores de rutina para LE e PRF foram de 0,12 g% e 0,04 g%, respectivamente, enquanto o teor de vitexina foi de 0,01 g% para LE e 0,05 g% para PRF. De acordo com os espectros de varredura dos demais picos (Figura Complementar), foi possível identificar a presença de outros derivados de flavonóides.

Estudos realizados com células humanas são essenciais para determinar a viabilidade de preparações vegetais para aplicações terapêuticas (Sak, 2012). LE e PRF não exibiram citotoxicidade contra PBMCs e não causaram hemólise. Na avaliação de LE e PRF para toxicidade oral aguda, camundongos tratados com uma dose de 2.000 mg/kg foram observados por 14 dias e mortalidade não foi observada.

Em relação aos sinais comportamentais, foram observados sinais estimulantes nos primeiros 30 min no grupo submetido ao tratamento com LE, como autolimpeza e pedalada, seguido de sinal depressivo de diminuição da deambulação, no intervalo de 30-45 min, quando comparado ao controle. Apenas sinais de diminuição da deambulação foram observados nos animais tratados com PRF durante o período de *scream* hipocrático (60 min). Os efeitos de LE e PRF cessaram após 60 min.

O consumo de água e o peso corporal médio nos animais tratados com LE e PRF foram semelhantes aos do grupo controle, enquanto a diminuição do consumo de ração foi detectada apenas nos animais tratados com LE, conforme mostrado na Tabela 1.

A determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos é importante para definir a toxicidade de uma preparação, pois uma alteração nesses parâmetros indica a ingestão de compostos tóxicos. Os parâmetros hematológicos (Tabela 2) dos animais tratados com LE e PRF foram semelhantes aos do grupo não tratado. A análise bioquímica (Tabela 3) revelou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de ALT nos animais tratados com LE.

Para investigar se as condições consideradas na preparação do extrato permitiram a solubilização do ferro, as concentrações do metal foram determinadas em LE e PRF. LE contém ferro (21,47 $\mu\text{g/dL}$) em concentração 23,8 vezes maior que PRF (0,90 $\mu\text{g/dL}$) e, portanto, a contribuição do complexo ferro-rutina para o aumento de ALT pelo LE não pode ser excluída.

O uso de medicamentos e preparações fitoterápicos está frequentemente associado ao aumento dos níveis de ALT, e alterações nos níveis séricos de ALT podem indicar danos hepatocelulares (Aliyu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). A análise macroscópica dos órgãos de camundongos tratados com LE e PRF não mostrou alterações de cor, volume ou textura quando comparado ao controle. Além disso, os pesos relativos do coração, rim, baço e fígado não diferiram significativamente dos pesos dos órgãos obtidos dos animais controle (Tabela 4).

A Figura 2 mostra a avaliação histológica dos órgãos de camundongos obtidos dos grupos controle, LE e PRF. As amostras de fígado dos animais tratados com LE apresentaram discreto infiltrado leucocitário com presença de vacuolização do tipo reversível no citoplasma dos hepatócitos, concordando com as alterações encontradas nos níveis de ALT. Em contraste, os fígados dos animais controle e dos tratados com PRF apresentaram aspectos homogêneos com a presença de uma cápsula externa fina e demonstraram o desenvolvimento de parênquima, veias centrolobulares de diferentes calibres, hepatócitos poligonais e cordões de hepatócitos regulares.

Os achados histológicos obtidos para os rins dos animais tratados com LE e PRF (Figura 2) foram semelhantes aos obtidos para os animais do grupo controle, apresentando componentes estruturais bem definidos com cápsula fibrosa externa, glomérulos homogêneos e presença do espaço Bowman. Os túbulos proximais e distais distorcidos não apresentaram alterações de calibre ou forma com ausência de manchas inflamatórias. Os dados histológicos estavam de acordo com os parâmetros bioquímicos de uréia e creatinina, não apresentando alterações significativas em relação ao grupo controle, indicando ausência de toxicidade renal.

A Figura 2 mostra fotomicrografias do baço e do coração dos animais. A arquitetura do baço foi preservada nos animais tratados com LE e PRF na presença de polpa branca e vermelha, semelhante aos achados obtidos para os animais controle. Os tecidos cardíacos do grupo controle e dos grupos tratados com LE e PRF não apresentaram degeneração miocárdica com sarcoplasma e fibras integradas.

Os dados obtidos dos ensaios de micronúcleo e cometa são mostrados na Figura 3. Uma comparação entre os grupos controle negativo e tratado revelou que LE e PRF não promoveram aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos ou aumento no DF ou ID das células sanguíneas nucleadas. No grupo controle positivo, houve aumento na frequência de micronúcleos, DF e ID quando comparado ao grupo controle negativo. Os ensaios de micronúcleos e cometas são considerados importantes avaliações em genética toxicológica (OCDE, 2016) e são considerados bons indicadores da segurança de novos produtos, incluindo medicamentos fitoterápicos (Rocha-Miranda *et al.*, 2019). Nossos dados indicaram que LE e PRF na dose de 2000 mg/kg não apresentaram genotoxicidade ou mutagenicidade.

4. Discussão

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar uma preparação proteica contendo inibidor de tripsina e lectina, uma vez que essas duas classes de proteínas foram relatadas em folhas de *M. oleifera* (Khatun *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2012, 2014). Flavonóides também foram encontrados em LE e PRF. Os flavonóides são um grupo de polifenóis presentes nas plantas que conferem proteção contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres (Zhou *et al.*, 2003; Asgary *et al.*, 2005). Os flavonóides demonstram várias atividades farmacológicas, incluindo efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antiangiogênicos e reguladores no sistema cardíaco (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013; Priya *et al.*, 2017).

A maioria dos flavonóides são solúveis em água. Em um estudo previamente relatado realizado com folhas de *M. oleifera*, envolvendo o uso de diferentes solventes de extração, Sreelatha e Padma (2009) mostraram que extrato aquoso a 16,7% (p/v) continha 2,7 g/100 g de flavonóides, enquanto o extrato hidroetanólico continha uma concentração mais elevada (6,2 g/100 g). A rutina (quercetina 3-ramnosilglicosídeo) e a vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo) apresentam atividades antioxidante, antiúlcera, anticancerígena, anti-inflamatória, antidiabética, antimutagênica e antioxidante (Nafees *et al.*, 2015; Aksu *et al.*, 2017; Rosa *et al.*, 2019; Caglayan *et al.*, 2019).

Estudos relataram que a vitexina na concentração de 200 µg/mL, inibidor de tripsina obtido das sementes de *Inga vera* Willd. na concentração de 100 µg/mL e lectina das sementes de *M. oleifera* na concentração de 50 µg/mL não apresentam toxicidade contra PBMCs (Rosa *et al.*, 2019; Coriolano *et al.*, 2020). Além disso, o inibidor de tripsina das flores de *M. oleifera* (MoFTI) apresentou baixa toxicidade *in vitro* contra macrófagos murinos (407,01 µg/mL) e não foi citotóxico para células Vero em concentrações de até 500 µg/mL (Pontual *et al.*, 2018). O MoFTI também não afetou a viabilidade de PBMCs quando testado em concentrações de até 500 µg/mL (Nova *et al.*, 2020). Uma lectina obtida da raiz de

Portulaca elatior Mart. ex Rohrb. também não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos humanos (Silva *et al.*, 2019).

LE e PRF não induziram toxicidade oral aguda. Ensaio de toxicidade aguda envolvendo a administração oral de extratos aquosos de folhas de *M. oleifera* foram conduzidos por Adedapo *et al.* (2009), com doses variando de 400 a 6400 mg/kg, por Awodele *et al.* (2012), com doses variando de 1.000 a 3.000 mg/kg, e por Asare *et al.* (2012), com doses variando de 400 a 2000 mg/kg. Em todos os casos, nenhuma mortalidade foi observada após o tratamento.

Lectinas e inibidores de tripsina pertencem ao grupo de proteínas vegetais tóxicas (Dang; Van-Damme, 2015); entretanto, LE e PRF contendo essas classes de proteínas não promovem mortalidade. Assim, apresentam baixa toxicidade (DL₅₀ acima de 2000 mg/kg) de acordo com o protocolo 423 da OCDE. Notavelmente, o presente estudo destaca a primeira avaliação de um concentrado proteico derivado de folhas de *M. oleifera* para toxicidade aguda.

Awodele *et al.* (2012) também mostraram que a administração oral de extrato aquoso de folhas nas doses de 400, 800, 1600, 3200 e 6400 mg/kg promoveu letargia nos animais nas primeiras duas horas após a administração. As alterações comportamentais detectadas após os tratamentos com LE e PRF podem ser atribuídas à presença de flavonóides. Selvakumar *et al.* (2013) mostraram que os flavonóides (incluindo a rutina) possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e demonstrar ações no sistema nervoso central, levando ao exercício de efeitos ansiolíticos e sedativos. O teor de rutina no LE é três vezes maior do que no PRF, e isso pode estar relacionado a sinais estimulantes detectados após o tratamento com LE. Souza *et al.* (2018) demonstraram que animais tratados com extrato hidroalcoólico de folhas de *Annona muricata* L. contendo rutina (5,20 mg/g), quando administrado (500 a 2000 mg/kg) uma vez por 14 dias, promoveu efeitos como sedação e diminuição da deambulação.

Sinais estimulantes também podem ser atribuídos ao estresse causado durante a gavagem, uma vez que foi relatado que o estresse agudo pode alterar as funções gastrointestinais através do sistema nervoso autônomo com aumento da secreção ácida e atividade das enzimas digestivas (Zuardi, 2010). No entanto, tal fenômeno pode não causar os sinais estimulatórios do LE, uma vez que os sinais não foram detectados após a administração de PRF por gavagem. Meenu-Krishnan e Murugan (2016) também não detectaram alterações comportamentais quando os animais foram tratados com inibidor de protease de *Solanum aculeatissimum* Jacq. (500 a 1000 g/kg) por via oral uma vez por 7 dias.

Diferentemente dos achados relatados no presente estudo, os achados relatados por Adedapo *et al.* (2009) mostraram que o uso de 6,0% de extrato aquoso da folha de *M. oleifera* na faixa de dosagem de 400 a 2000 mg/kg promoveu perda de peso em um período de 21 dias de tratamento. O fato de LE e PRF não reduzirem o ganho de peso revelou que os inibidores de tripsina e lectina das folhas de *M. oleifera* não exerceram efeito antinutricional. Meenu-Krishnan e Murugan (2016) também não detectaram perda de peso em animais tratados com inibidor de protease de *S. aculeatissimum* (500 a 1000 g/kg) por via oral por 7 dias.

Madingol *et al.* (2016) relataram que a ingestão reduzida poderia ser atribuída à presença de metabólitos secundários tóxicos, e o fato de o PRF não alterar esse parâmetro sugeriu que o constituinte ativo era um metabólito secundário e não uma proteína. Estresse ou adaptação fisiológica à ingestão de novos alimentos também podem reduzir o consumo alimentar (Ouédraogo *et al.*, 2011); no entanto, esta hipótese foi inválida aqui, pois PRF foi administrado nas mesmas condições consideradas para LE e não alterou esse parâmetro. Curiosamente, o consumo de folhas de *M. oleifera* tem sido considerado pelas pessoas para perda de peso, e Nahar *et al.* (2016) demonstraram a atividade anti-obesidade do pó de folhas de *M. oleifera*.

Apenas LE causou um aumento nos níveis de ALT. Oliveira *et al.* (2015; 2016) mostraram que animais que receberam por via oral (2000 mg/kg) extrato etanólico de folhas de *Morus alba* L. contendo flavonóide rutina apresentaram aumento nos níveis de ALT. O aumento da atividade da ALT pode ser resultado da maior concentração de rutina no LE do que no PRF.

Roy *et al.* (2015) demonstraram que o complexo vanádio-rutina administrado por via oral (120 mg/kg) promoveu mortalidade de camundongos Balb/C e aumentou os níveis de ALT, sugerindo que a formação de um complexo rutina-metal de transição resultou em toxicidade. A folha de *M. oleifera* contém 103,1 mg/100 g de ferro (Teixeira *et al.*, 2014), e é possível que a alteração na atividade da ALT seja atribuível à formação de um complexo ferro-rutina. No entanto, os dados histológicos associados aos parâmetros bioquímicos revelaram que LE e PRF não causaram danos hepáticos graves.

Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstraram que flavonóides isolados e extratos contendo flavonóides geralmente apresentam baixa toxicidade e propriedades biológicas interessantes do ponto de vista da saúde humana (Peixoto *et al.*, 2019). A rutina não exibiu citotoxicidade na concentração de 200 µM usada em hepatócitos de ratos, exerceu um efeito protetor contra a fibrose hepática induzida por tioacetamida e impediu o desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida por metotrexato em um modelo animal (Caglayan *et al.*, 2019).

A inibição do crescimento e a hipertrofia têm sido associadas à presença de inibidores de tripsina e lectinas, componentes que causam inflamação gástrica, náusea, diarreia, sangramento local, lesão renal e destruição do epitélio do trato gastrointestinal (Sinha *et al.*, 2017; Ramteke *et al.*, 2019). O presente estudo demonstrou que a presença de inibidores de tripsina e lectinas em PRF não levou a danos histológicos. Patriota *et al.* (2021) também mostraram que animais tratados com inibidores de tripsina isolados das flores de *M. oleifera* (15 e 30 mg/kg) não apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e

histológicos. Ramos *et al.* (2020) demonstraram que a lectina isolada das folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (1 e 5 mg/kg) não foi tóxica para animais tratados por via oral por um período de 7 dias, mas animais tratados com extrato salino foliar (100 mg/kg) com atividade de lectina apresentou alterações no valor de AST e no número de monócitos do sangue periférico. LE e PRF não são agentes genotóxicos ou mutagênicos. No entanto, notadamente, Asare *et al.* (2012) detectaram genotoxicidade após a realização de tratamento com extrato aquoso derivado da folha de *M. oleifera* na dose de 3000 mg/kg.

5. Conclusão

O extrato (LE) e o concentrado protéico (PRF) derivados das folhas de *M. oleifera* contendo flavonóides, lectina e inibidores de tripsina não apresentaram propriedades citotóxicas, hemolíticas, genotóxicas ou mutagênicas. A mudança de comportamento e o aumento dos níveis de ALT detectados *in vivo* provavelmente estão relacionados à presença de flavonóides. As folhas de *M. oleifera* são utilizadas para consumo como alimento e medicamento, e este estudo mostra que LE e PRF não são agentes antinutricionais e não apresentam toxicidade aguda. LE e PRF não são agentes genotóxicos ou mutagênicos. O presente estudo contribui para a determinação da segurança do uso de proteínas foliares de *M. oleifera* e incentiva a continuidade na realização de pesquisas toxicológicas.

Declaração de contribuição de autoria CRediT

Robson Raion de Vasconcelos Alves: Conceituação; Curadoria de dados; Análise formal; Investigação; Metodologia; Validação; Visualização; Funções/Escrita - rascunho original. **Alisson Macário de Oliveira:** Curadoria de dados; Análise formal; Investigação;

Metodologia; Recursos; Supervisão; Validação; Visualização; Funções/Escrita - rascunho original. **Gabryella Borges dos Prazeres, Abdênego Rodrigues da Silva, Franciele Florencio Costa, Bárbara Rafaela da Silva Barros, Talita Giselly dos Santos Souza:** Curadoria de dados; Análise formal; Investigação; Metodologia. **Luana Cassandra Breintzenbach Barroso Coelho:** Aquisição de financiamento; Validação; Visualização. **Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Magda Rhayanny Assução Ferreira:** Curadoria de dados; Análise formal; Investigação; Metodologia; Recursos; Validação; Visualização. **Luiz Alberto Lira Soares, Cristiano Aparecido Chagas:** Análise formal; Aquisição de financiamento; Metodologia; Recursos; Supervisão. **Thiago Henrique Napoleão:** Análise formal; Aquisição de financiamento; Recursos; Validação; Visualização; Redação - revisão e edição. **Mariana Pinheiro Fernandes, Patrícia Maria Guedes Paiva:** Conceituação; Análise formal; Aquisição de financiamento; Metodologia; Recursos; Supervisão; Validação; Visualização; Redação - revisão e edição.

Declaração de interesse concorrente

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa (405297/2018-1; 407192/2018-2) e bolsas (LCBBC, LALS, THN e PMGP), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Código Financeiro 001) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15;

APQ-0493- 4.03/14) para apoio financeiro. A RRVA gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa de pós-graduação. Os autores agradecem ao Dr. Carlos Eduardo Sales da Silva por sua assistência técnica.

Referências

- Adedapo, A.A., Mogbojuri, O.M., Emikpe, B.O., 2009. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. J. Med. Plant. Res. 3, 586-591.
<https://doi.org/10.5897/JMPR.9001097>
- Adewale, O.B., Onasanya, A., Anadozie, S.O., Abu, M.F., Akintan, I.A., Ogbole, C.J., Olayide, I.I., Olakunle, B., Afolabi, Jaiyesimi, K.F.B., Ajiboye, O., Fadaka, A.O., 2016. Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extract of *Crassocephalum rubens* leaves in rats. J. Ethnopharmacol. 188, 153-158.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.003>
- Aksu, E.H., Kandemir, F.M., Özkara, M., Ömür, A.D., Küçükler, S., Çomaklı, S., 2017. Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. Andrologia 49, e12593.
<https://doi.org/10.1111/and.12593>
- Alatorre-Cruz, J.M., Pita-López, W., López-Reyes, R.G., Ferriz-Martínez, R.A., Cervantes-Jiménez, R., Carrillo, M.D.J.G., Vargas, P.J. , López-Herrera, G., Méndez, A.J.R., Zamora-Arroyo, A., Gutiérrez-Sánchez, H., Souza, T.R., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T., 2018. Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. Toxicol. Rep. 5, 56-64.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.008>

- 629 Aliyu, M., Odunola, O.A., Owumi, S.E., Gbadegesin, M.A., Choudhary, M.I., Farooq, A.D.,
 630 Rasheed, H., Erukainure, O.L., Ahmed, S., 2012. Daily consumption of honey: effects
 631 on male wister albino rats. *Int. J. Food Nutr. Saf.* 1, 66-74.
- 632 Almeida, A.A.C.D., Carvalho, R.B.F.D., Sousa, D.P.D., Souza, G.F.D., Oliveira, J.D.S.,
 633 Freitas, R.M.D., 2014. Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno em
 634 camundongos adultos. *Rev. Cub. Pl. Med.* 19, 160-71.
- 635 Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A.H., 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with
 636 multiple medicinal uses. *Phytother. Res.* 21, 17-25. <https://doi.org/10.1002/ptr.2023>
- 637 Asare, G.A., Gyan, B., Bugyei, K., Adjei, S., Mahama, R., Addo, P., Otu-Nyarko, L., Wiredu,
 638 E.K., Nyarko, A., 2012. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at
 639 supra-supplementation levels. *J. Ethnopharmacol.* 139, 265-272.
 640 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.009>
- 641 Asgary, S., Naderi, G. H., Askari, N., 2005. Protective effect of flavonoids against red blood
 642 cell hemolysis by free radicals. *Exp. Clin. Cardiol.* 10, 88.
- 643 Awodele, O., Oreagba, I. A., Odoma, S., Silva, J.A.T., Osunkalu, V.O., 2012. Toxicological
 644 evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae). *J.*
 645 *Ethnopharmacol.* 139, 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.008>
- 646 Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., Lev-Ari, S., 2013. *Moringa*
 647 *oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases
 648 cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Compl. Altern.*
 649 *Med.* 13, 212. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212>
- 650 Bing, D.H., Weyand, J.G.M., Stavitsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed
 651 erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124,
 652 1166-1170. <https://doi.org/10.3181/00379727-124-31953>

- 653 Caglayan, C., Kandemir, F.M., Yildirim, S., Kucukler, S., Eser, G., 2019. Rutin protects
 654 mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative
 655 stress, apoptosis and inflammation in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54, 69-78.
 656 <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.04.007>
- 657 Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith,
 658 C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.
 659 <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- 660 Coriolano, M.C., Brito, J.S., Ferreira, G.R.S., Moura, M.C., Melo, C.M.L., Soares, A.K.A.,
 661 Lorena, V.M.B., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Coelho,
 662 L.C.B.B., 2020. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has
 663 differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of
 664 Gram-positive and Gram-negative pathogens. *South Afr. J. Bot.* 129, 198-205.
 665 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.014>
- 666 Dang, L., Van Damme, E.J., 2015. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry* 117, 51-64.
 667 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>
- 668 Green, A.A., Hughes, W.L., 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous
 669 solution of salts and organic solvents. In: Colowick, S., Kaplan, N; (Eds.), *Methods in*
 670 *Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 67–90.
- 671 Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr, M., 1990. The micronucleus
 672 assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated
 673 slides. *Mut. Res. Lett.* 245, 245-249. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B)
- 674 Kala, B.K., Mohan, V.R., 2012. Effect of microwave treatment on the antinutritional factors
 675 of two accessions of velvet bean, *Mucuna pruriens* (L.) DC. var. utilis (Wall. ex
 676 Wight) Bak. ex Burck. *Int. Food Res. J.* 19, 961.

- 677 Khatun, S., Khan, M.M.H., Ashraduzzaman, M., Pervin, F., Bari, L., Absar, N., 2009.
 678 Antibacterial activity and cytotoxicity of three lectins purified from drumstick
 679 (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. J. Bio-Science 17, 89-94.
 680 <https://doi.org/10.3329/jbs.v17i0.7112>
- 681 Kim, W.R., Flamm, S.L., Di Bisceglie, A.M., Bodenheimer, H.C., 2008. Serum activity of
 682 alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. Hepatology 47,
 683 1363-1370. <https://doi.org/10.1002/hep.22109>
- 684 Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., Chen, N., 2018. Nutraceutical or
 685 pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. Nutrients 10, 343.
 686 <https://doi.org/10.3390/nu10030343>
- 687 Lin, M., Zhang, J., Chen, X., 2018. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-
 688 promoting properties. J. Funct. Foods 47, 469-479.
 689 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011>
- 690 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the
 691 Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 692 Ma, Z.F., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., Muhammad, S., 2020. Evaluation of phytochemical
 693 and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food.
 694 South Afr. J. Bot. 129, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.002>
- 695 Madingou, N.O.K., Traore, A., Souza, A., Mounanga, M.M.B., Samseny, R.R.A., Ouedraogo,
 696 S., Traore, A.S., 2016. Preliminary studies of acute and sub-chronic toxicity of the
 697 aqueous extract of *Guibourtia tessmannii* (Harms) J. Leonard stem barks
 698 (Caesalpiniaceae) in mice and rats. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 6, 506-510.
 699 <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.04.001>

- Malone, M.E., Appelqvist, I.A.M., Norton, I.T., 2003. Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 1. Lubrication and deposition considerations. *Food Hydrocoll.* 17, 763-773. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00097-3)
- Manuwa, S.I., Sedara, A.M., Tola, F.A., 2020. Design, fabrication and performance evaluation of moringa (oleifera) dried leaves pulverizer. *J. Agric. Food Res.* 2, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100034>
- Maracajá, P., Silveira, D., Coelho, D., Leite, D., Freire, M., Cavalcanti, M., 2010. Efeito tóxico do extrato de flores de *Moringa oleifera* L. para abelhas *Apis mellifera* africanizadas. *ACSA* 6, 33-37. <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v6i4.101>
- Meenu Krishnan, V.G., Murugan, K., 2016. Acute and subchronic toxicological evaluation of the purified protease inhibitor from the fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq. on Wistar rats. *Cogent Biol.* 2, 1191588. <https://doi.org/10.1080/23312025.2016.1191588>
- Muzumbukilwa, W.T., Nlooto, M., Owira, P.M.O., 2019. Hepatoprotective effects of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) leaf extracts in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J. Funct. Foods* 57, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.050>
- Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., Hasan, S. K., Sultana, S., 2015. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. *Chem. Biol. Interact.* 231, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.021>
- Nahar, S., Faisal, F. M., Iqbal, J., Rahman, M.M., Yusuf, M.A., 2016. Antiobesity activity of *Moringa oleifera* leaves against high fat diet-induced obesity in rats. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.*, 10, 1263-1268. <http://dx.doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20162427>
- Nova, I.C.V., Moreira, L.R., Torres, D.J.L., Oliveira, K.K.D.S., Patriota, L.L.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Lorena, V.M.B., Pontual, E.V., 2020. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers modulates the immune response in

- 725 *vitro* of *Trypanosoma cruzi*-infected human cells. Antibiotics 9, 515.
 726 <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080515>
- 727 OECD, 2001. Guidelines for the testing of chemicals, OECD 423. Acute oral toxicity-Acute
 728 toxic class method. Paris: OECD.
- 729 OECD, 2016. Test. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD guidelines for the
 730 testing of chemicals.
- 731 Ohta, T., Nakamura, S., Nakashima, S., Shimakawa, H., Emi, Y., Matsumoto, T., Ogawa, K.,
 732 Fukaya, M., Oda, Y., Matsuda, H., 2017. Stimulators of acylated ghrelin secretion
 733 from *Moringa oleifera* leaves. Phytochem. Lett. 21, 1-5.
 734 <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.022>
- 735 Oliveira, A.M., Mesquita, M.S., Silva, G.C., Lima, E.O., Medeiros, P.L., Paiva, P.M.G.,
 736 Souza, I.A., Napoleão, T.H., 2015. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of
 737 an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L.(Moraceae). Evid. Bas. Complem.
 738 Altern. Med. 2015, 513978. <https://doi.org/10.1155/2015/513978>
- 739 Oliveira, A.M., Nascimento, M.F., Ferreira, M.R.A., Moura, D.F., Souza, T.G.S., Silva, G.C.,
 740 Ramos, E.H.S., Paiva, P.M.G., Medeiros, P.L., Silva, T.G., Soares, L.A.L., Chagas,
 741 C.A., Souza, I.A., Napoleão, T.H., 2016. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and
 742 inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L.
 743 (Moraceae) in mice. J. Ethnopharmacol. 194, 162-168.
 744 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.004>
- 745 Oliveira, V.B.D., Mezzomo, T.R., Moraes, E.F.D., 2018. Conhecimento e uso de plantas
 746 medicinais por usuários de unidades básicas de saúde na região de Colombo, PR. Ver.
 747 Bras. Ciênc. Saúde 22, 57-64. <https://doi.org/10.4034/RBCS.2018.22.01.08>

- 748 Ouédraogo, O., Amyot, M., 2011. Effects of various cooking methods and food components
749 on bioaccessibility of mercury from fish. *Environ. Res.* 111, 1064-1069.
750 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.09.018>
- 751 Owens III, F.S., Dada, O., Cyrus, J.W., Adedoyin, O.O., Adunlin, G., 2020. The effects of
752 *Moringa oleifera* on blood glucose levels: A scoping review of the literature. *Compl.*
753 *Ther. Med.* 50, 102362. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102362>
- 754 Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin
755 isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36,
756 113-118. <https://doi.org/10.1007/BF02929691>
- 757 Patriota, L.L.S., Ramos, D.B.M., Santos, A.C.L.A., Silva, Y.A., Silva, M.G., Torres, D.J.L.,
758 Procópio, T.F., Oliveira, A.M., Coelho, L.C.B.B., Pontual, E.V., Silva, D.C.N., Paiva,
759 P.M.G., Lorena, V.M.B., Mendes, R.L., Napoleão, T.H., 2020. Antitumor activity of
760 *Moringa oleifera* (drumstick tree) flower trypsin inhibitor (MoFTI) in sarcoma 180-
761 bearing mice. *Food Chem. Toxicol.* 145, 111691.
762 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111691>
- 763 Peixoto, J.D.C., Neves, B.J., Vasconcelos, F.G., Napolitano, H.B., Barbalho, M.G.D.S.,
764 Rosseto, L.P., 2019. Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and
765 Biological Profile. *Molecules*, 24, 2891. <https://doi.org/10.3390/molecules24162891>
- 766 Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M.E., Saura-Calixto, F., 2013. Non-extractable polyphenols, a
767 major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition*
768 *Res. Rev.* 26, 118-129. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000097>
- 769 Pontual, E.V., Carvalho, B.E.A., Bezerra, R.S., Coelho, L.C.B.B., Napoleão, T.H., Paiva,
770 P.M.G., 2012. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers.
771 *Food Chem.* 135, 1848-1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.087>

- 772 Pontual, E.V., Pires-Neto, D.F., Fraige, K., Higino, T.M.M., Carvalho, B.E.A., Alves,
773 N.M.P., Lima, T.A., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Bolzani, V.S., Figueiredo,
774 R.C.B.Q., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2018. A trypsin inhibitor from *Moringa*
775 *oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over
776 mammalian cells. Nat. Prod. Res. 32, 2940-2944.
777 <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1389932>
- 778 Priya, S.H., Prakasan, N., Purushothaman, J., 2017. Antioxidant activity, phenolic-flavonoid
779 content and high-performance liquid chromatography profiling of three different
780 variants of *Syzygium cumini* seeds: a comparative study. J. Intercul.
781 Ethnopharmacol. 6, 107. <https://doi.org/10.5455/jice.20161229055555>
- 782 Ramos, D.B.M., Araújo, M.T.M.F., Araújo, T.C.L., Silva, Y.A., Santos, A.C.L.A., Silva,
783 M.G., Paiva, P.M.G., Mendes, R.L., Napoleão, T.H., 2020. Antinociceptive activity of
784 *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. J.
785 Ethnopharmacol. 259, 112952. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112952>.
- 786 Ramteke, R., Doneria, R., Gendley, M.K., 2019. Antinutritional factors in feed and fodder
787 used for livestock and poultry feeding. Act. Sci. Nutr. Health 3, 39-48.
- 788 Rocha-Miranda, F., Venâncio, A., 2019. Mycotoxigenic fungi in plant-based supplements and
789 medicines. Curr. Opin. Food Sci. 30, 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.003>
- 790 Rosa, V.M., Ariotti, K., Bressan, C.A., Silva, E.G., Dallaporta, M., Júnior, G.B., Costa, S.T.,
791 Vargas, A.C., Baldisserotto, B., Finamor, I. A., Pavanato, M.A., 2019. Dietary
792 addition of rutin impairs inflammatory response and protects muscle of silver catfish
793 (*Rhamdia quelen*) from apoptosis and oxidative stress in *Aeromonas hydrophila*-
794 induced infection. Comp. Biochem. Physiol. C 226, 108611.
795 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108611>

- Roy, S., Majumdar, S., Singh, A.K., Ghosh, B., Ghosh, N., Manna, S., Chakraborty, T., Mallick, S., 2015. Synthesis, characterization, antioxidant status, and toxicity study of vanadium–rutin complex in Balb/c mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 166, 183-200. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0270-2>
- Sak, A., Stuschke, M., Groneberg, M., Kübler, D., Pöttgen, C., Eberhardt, W.E., 2012. Inhibiting the aurora B kinase potently suppresses repopulation during fractionated irradiation of human lung cancer cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 84, 492-499. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.12.021>
- Selvakumar, K., Bavithra, S., Ganesh, L., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunakaran, J., 2013. Polychlorinated biphenyls induced oxidative stress mediated neurodegeneration in hippocampus and behavioral changes of adult rats: Anxiolytic-like effects of quercetin. *Toxicol. Lett.* 222, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.06.237>
- Silva, J.D.F., Silva, S.P., Silva, P.M., Vieira, A.M., Araújo, L.C.C., Lima, T.A., Oliveira, A.P.S., Carvalho, L.V.N., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M., Pinheiro, I.O., Zingali, R.B., Cavalcanti, M.S.M., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2019. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 126, 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.188>
- Sinha, K., Khare, V., 2017. Review on: Antinutritional factors in vegetable crops. *Pharma Innovation* 6, 353-358.
- Sousa-Coelho, I.D.D., Neto, C.J.C.L., Souza, T.G.S., Silva, M.A., Chagas, C.A., Santos, K.R.P., Teixeira, V.W., Teixeira, Á.A.C., 2018. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy. *Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 832, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.018>

- 821 Souza, D.O., Sales, V.S., Rodrigues, C.K.S., Oliveira, L.R., Lemos, I.C.S., Delmondes, G.A.,
 822 Monteiro, A.B., Nascimento, E.P., Figueiredo, F.R.S.D.N., Costa, J.G.M., Cruz,
 823 G.M.P., Viana, G.S.B., Barbosa, R., Menezes, I.R.A., Felipe, C.F.B, Kerntopf, M.R.,
 824 2018. Phytochemical analysis and central effects of *Annona muricata* Linnaeus:
 825 possible involvement of the gabaergic and monoaminergic systems. Iran. J. Pharm.
 826 Res. 17, 1306.
- 827 Sreelatha, S., Padma, P.R., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa*
 828 *oleifera* leaves in two stages of maturity. Plant Foods Human Nutr. 64, 303-311.
 829 <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
- 830 Teixeira, C.M.L.L., Kirsten, F.V., Teixeira, P.C.N., 2012. Evaluation of *Moringa oleifera*
 831 seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. J. Appl.
 832 Phycol. 24, 557-563. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9773-1>
- 833 Teixeira, E.M.B., Carvalho, M.R.B., Neves, V.A., Silva, M.A., Arantes-Pereira, L., 2014.
 834 Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam.
 835 leaves. Food Chem. 147, 51-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>
- 836 Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Rojas,
 837 M.E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro*
 838 and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206-221.
 839 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- 840 Tiloke, C., Anand, K., Gengan, R.M., Chuturgoon, A.A., 2018. *Moringa oleifera* and their
 841 phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. Biomed.
 842 Pharmacother. 108, 457-466. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.060>
- 843 Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M.M., Fernandez, M.L., 2017. Bioactive components in
 844 *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. Antioxidants 6, 91.
 845 <https://doi.org/10.3390/antiox6040091>

- 846 Zhou, Y., Hileman, E. O., Plunkett, W., Keating, M. J., Huang, P., 2003. Free radical stress in
847 chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-
848 generating anticancer agents. *Blood* 101, 4098-4104. [https://doi.org/10.1182/blood-](https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2512)
849 2002-08-2512
- 850 Zuardi, A.W., 2010. Fisiologia do estresse e sua influência na saúde. São Paulo: USP,
851 Departamento de Neurociência e ciência do comportamento. Available in: de
852 <http://mp.fmrp.usp.br/~psicomed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf>.
853

854 **Tabela 1** - Consumo de água e ração e ganho de peso dos camundongos controle e tratados
 855 com LE e PRF das folhas de *Moringa oleifera* por 14 dias.

Parâmetros	Controle	LE	PRF
Consumo de água (mL)	25,46 ± 0,80	23,55 ± 0,66	24,71 ± 0,33
Consumo de comida (g)	17,64 ± 1,21	13,14 ± 1,05*	17,85 ± 1,65
Ganho de peso (g)	38,85 ± 3,09	40,01 ± 3,54	40,12 ± 3,47

856 Os valores representam a média ± DP (n=3/grupo). Diferenças significativas ($p > 0,05$) foram
 857 encontradas em comparação com o controle (*).

858

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com LE e PRF das folha de *Moringa oleifera* (2.000 mg/kg v.o.) por 14 dias.

Parâmetros	Controle	LE	PRF
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	$5,00 \pm 0,12$	$4,99 \pm 1,04$	$5,02 \pm 0,32$
Hematocrito (%)	$38,85 \pm 0,12$	$38,96 \pm 0,35$	$39,07 \pm 0,27$
Hemoglobina (g/dL)	$13,22 \pm 0,11$	$13,22 \pm 0,28$	$13,41 \pm 0,20$
VCM (fL)	$84,00 \pm 0,51$	$83,67 \pm 0,61$	$84,21 \pm 0,24$
HCM (pg)	$28,17 \pm 0,32$	$28,20 \pm 0,20$	$28,01 \pm 0,35$
CHCM (%)	$35,22 \pm 0,43$	$35,02 \pm 0,34$	$35,47 \pm 0,61$
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$6,26 \pm 0,18$	$6,17 \pm 0,42$	$6,28 \pm 0,55$
Segmentados (%)	$53,79 \pm 0,66$	$54,74 \pm 0,67$	$53,81 \pm 0,79$
Limfócitos (%)	$29,22 \pm 0,32$	$30,08 \pm 0,35$	$29,28 \pm 0,40$
Monócitos (%)	$15,33 \pm 0,55$	$15,09 \pm 0,22$	$15,29 \pm 0,42$

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média. Os valores representam a média \pm DP (n=3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com LE e PRF das
folha de *Moringa oleifera* (2.000 mg/kg v.o.) por 14 dias.

Parâmetros	Controle	LE	PRF
Albumina (g/dL)	1,99 ± 0,09	2,10 ± 0,14	2,00 ± 0,11
ALT (U/L)	68,20 ± 0,22	72,95 ± 0,45*	67,95 ± 0,45
AST (U/L)	92,09 ± 1,02	90,07 ± 0,93	91,07 ± 1,01
Proteína Total (g/dL)	6,20 ± 0,10	6,12 ± 0,22	6,19 ± 0,24
Fosfatase alcalina (IU/L)	12,61 ± 0,08	12,38 ± 0,24	12,43 ± 0,16
GGT (U/L)	9,60 ± 0,08	9,48 ± 0,38	9,54 ± 0,06
Creatinina (mg/dL)	0,23 ± 0,08	0,22 ± 0,07	0,20 ± 0,09
Ureia	3,67 ± 0,12	3,52 ± 0,51	3,66 ± 0,14
Colesterol total (mg/dL)	78,45 ± 0,21	78,44 ± 0,76	79,00 ± 0,09
Triglicerídeos (mg/dL)	100,08 ± 0,91	101,32 ± 1,09	99,56 ± 0,75

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil
transferase. Os valores representam a média ± DP (n=3/grupo). * Diferenças significativas (p
> 0,05) foram encontradas em comparação com o controle.

872 **Tabela 4** - Avaliação do peso relativo (g/10 g de peso corporal do animal) de órgãos de
 873 camundongos tratados com LE e PRF das folha de *Moringa oleifera* (2.000 mg/kg v.o.) por
 874 14 dias.

Parâmetros	Controle	LE	PRF
Coração (g)	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,00
Fígado (g)	2,03 ± 0,14	2,50 ± 0,26	2,05 ± 0,22
Rins (g)	0,57 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,58 ± 0,05
Baço (g)	0,18 ± 0,00	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,01

875 Os valores representam a média ± DP (n = 3/grupo). Não foram encontradas diferenças
 876 significativas (p > 0,05) em comparação com o controle. Não foram observadas diferenças
 877 significativas (p > 0,05) entre os grupos.

878

879 **Legendas de figuras**

880 **Figura 1** - Caracterização química do extrato salino foliar de *Moringa oleifera* (LE) e fração
881 rica em proteínas (PRF). (A) Perfis de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de
882 vitexina e rutina (1), LE (2) e PRF (3) em um comprimento de onda de 350 nm. (B) Espectros
883 de varredura de vitexina (a) e rutina (b) e seus picos correspondentes nas amostras.

884

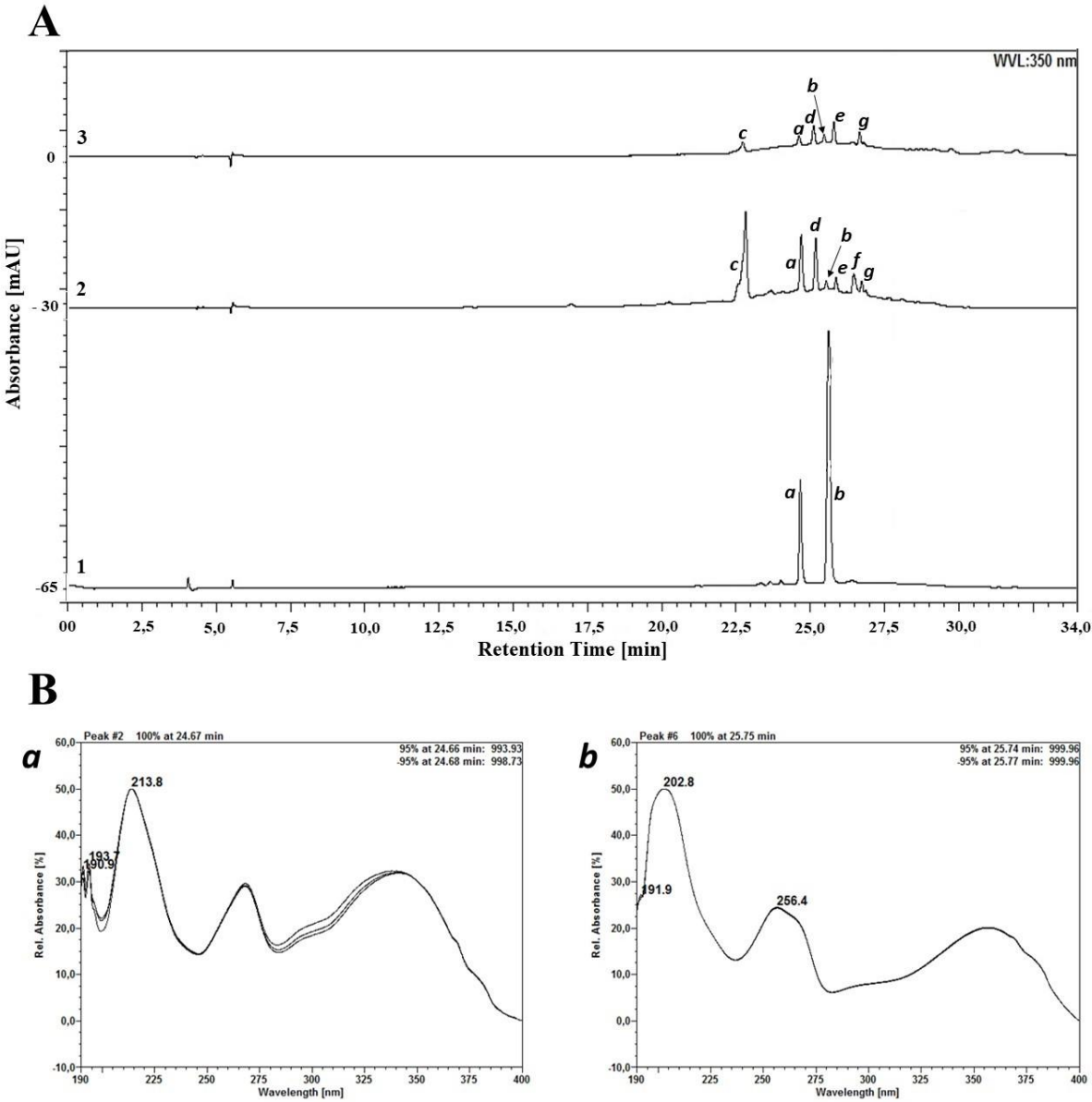
Figura 2 - Fotomicrografias representativas do fígado, rim, baço e coração dos animais dos grupos controle (NaCl 0,15 M), extrato da folha de *M. oleifera* (LE) (2000 mg/kg) e fração rica em proteínas (PRF) (2000 mg/kg). Fígado: Veias centrolobulares (v) de diferentes calibres, hepatócitos poligonais e cordões de hepatócitos regulares podem ser observados nas imagens. Os animais tratados com LE apresentaram discreto infiltrado leucocitário na presença de vacuolização no citoplasma dos hepatócitos. Rins: Componentes estruturais bem definidos podem ser observados com cápsula externa fibrosa, glomérulos homogêneos (Gr) e presença de espaço de Bowman em todos os animais tratados. Baço: A preservação das estruturas pode ser observada como os nódulos linfáticos (Nd) sem alterações em todos os animais tratados. Coração: Miocárdio (M) com sarcoplasma e fibras integrais podem ser observados. Aproximação: 400x.

897 **Figura 3** - Testes de micronúcleos e ensaio cometa. PCE: eritrócitos policromáticos; NC:
898 controle negativo (solução salina); PC: controle positivo (dose de ciclofosfamida: 25 mg/kg);
899 LE (extrato de folha) e PRF (fração rica em proteínas) doses até 2000 mg/kg. As estrelas
900 representam resultados significativos. Os valores foram apresentados em barras apenas
901 quando a comparação foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

902

903 **Figura Suplementar** - Espectros de varredura de outros flavonóides identificados em LE e
904 PRF (c - g).
905

906 **Figura 1**

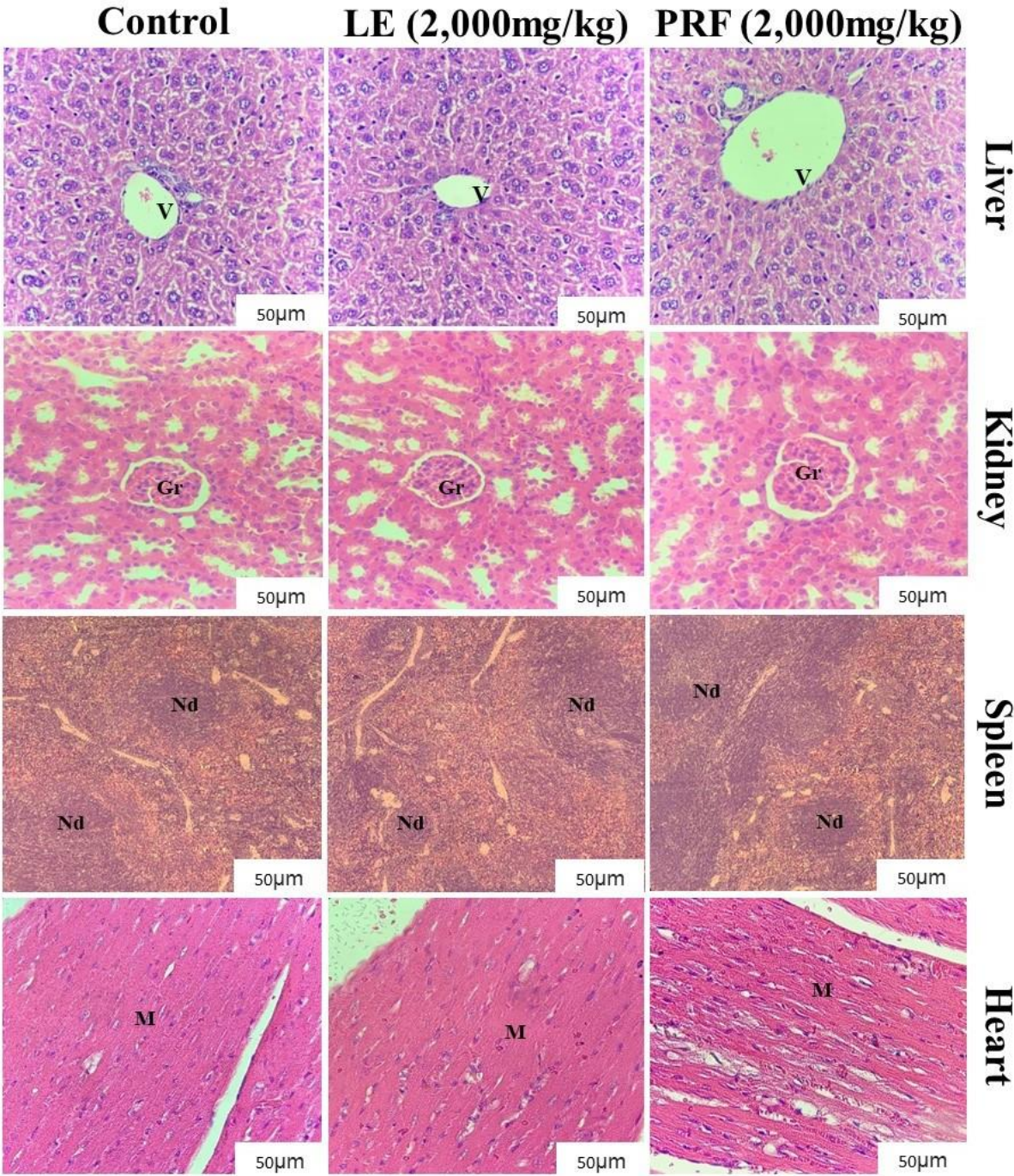


907

908

909

910 **Figura 2**

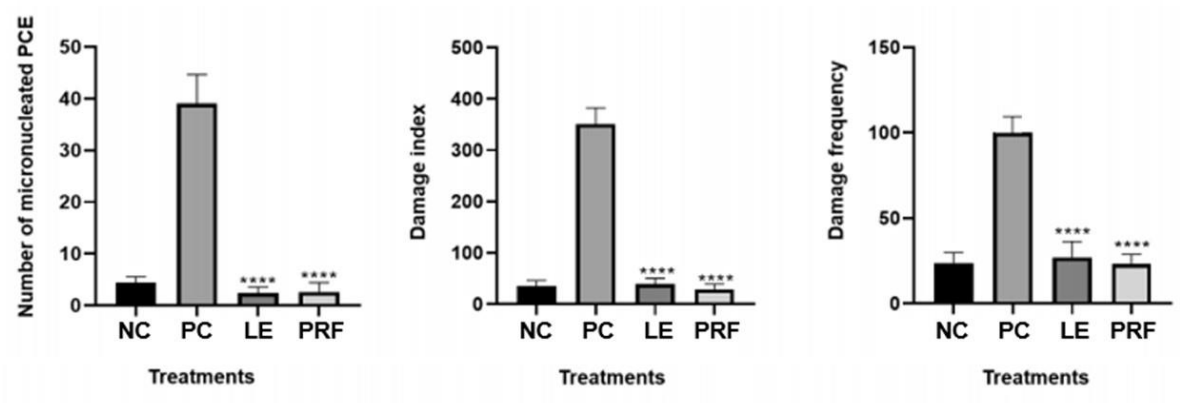


911

912

913

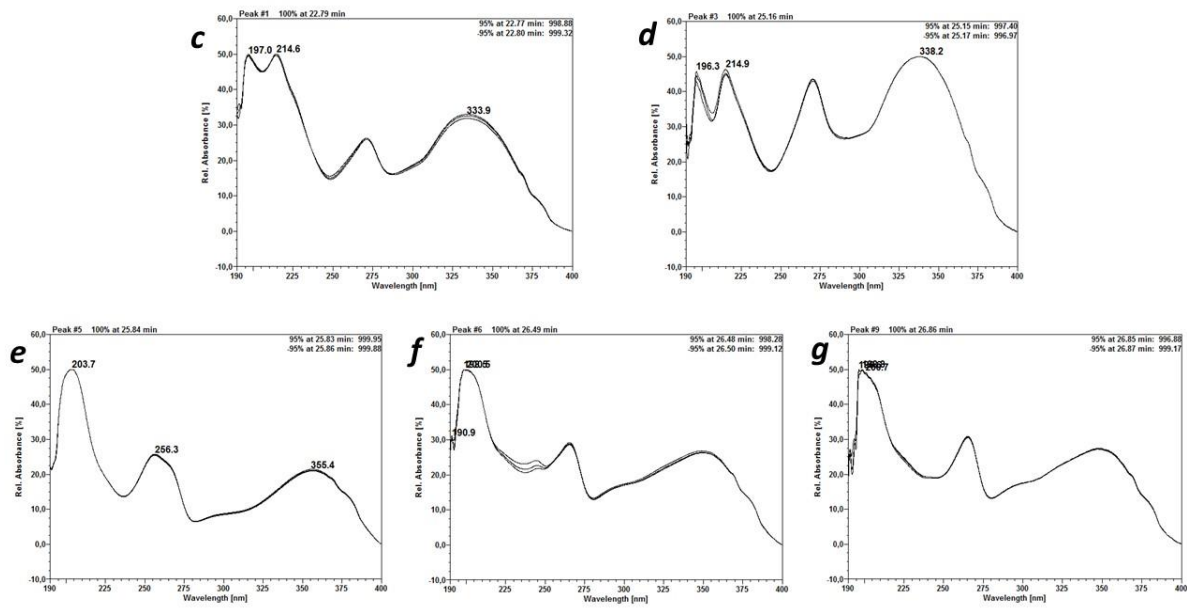
914 **Figura 3**



915

916

917 **Figura Suplementar**



3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBAGUDA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISE METABOLÔMICA EM RATOS WISTAR TRATADOS COM FRAÇÃO RICA EM PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* LAM



ISSN: 0891-5849

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO A FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE

Fator de Impacto: 7.376 (2021)

Qualis CAPES A1 (2016)

Toxicidade subaguda, atividade antioxidante e análise metabolômica em ratos tratados com fração rica em proteínas das folhas de *Moringa oleifera*

Robson Raion de Vasconcelos Alves^a, Alisson Macário de Oliveira^a, Gabrielle Borges Prazeres^a, Talitta Ricarly Lopes de Arruda Lima^b, Edmilson Rodrigues da Rocha-Junior^c, Alessandre Carmo Crispim^c, Luana Cassandra Breintenbach Barroso Coelho^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Thiago Mendonça de Aquino^c, Edson de Souza Bento^c, Luiz Carlos Caetano^c, Thiago Henrique Napoleão^a, Mariana Pinheiro Fernandes^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Bioquímica, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.*

^c*Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Tabuleiro do Martins, Maceió, Alagoas, Brazil.*

*Autor Correspondente. E-mail: patricia.paiva@ufpe.br

Resumo

Estudos sobre a toxicidade de extratos orgânicos e aquosos das folhas de *Moringa oleifera* já foi realizado, no entanto estudos sobre a segurança de uso das proteínas de folhas são escassos. Uma fração (PRF) obtida a partir do extrato de folhas apresentou metabólitos secundários (rutina e vixetina) e proteínas (inibidor de tripsina e lectina). Nesse trabalho, foi investigada a toxicidade oral subaguda em ratos tratados com PRF em diferentes doses (20, 40 e 80 mg/kg/dia) por 28 dias. Adicionalmente, foi determinada a atividade antioxidante de PRF e análise metabolômica em tecido hepático dos animais. Os animais tratados com PRF em todas os tratamentos não apresentaram alterações comportamentais e os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram similares aqueles dos animais não tratados. PRF em todas as concentrações aumentou os níveis de TBARS, sem alterar os de carbonila e diminuiu o balanço redox (relação GSH/GSSG), enquanto aumento de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) foi detectado nas concentrações de 40 e 80 mg/kg/dia e dos níveis de sulfidrila na concentração de 20 mg/kg/dia. Análise metabolômica revelou 43 metabólitos polares no extrato de fígado e maior quantidade de aminoácidos essenciais nos animais tratados com PRF. Um aumento da atividade enzimática da xantina oxidase foi comprovada pela diminuição de hipoxantina e aumento de xantina, elevando a produção de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, PRF não induziu sinais de toxicidade nos animais tratados, no entanto elevou os níveis de marcadores do estresse oxidativo. Metabólitos identificados são correlacionados a dano oxidativo.

Palavras-Chave: Catalase. Superóxido Dismutase. Glutatona. Xantina. Hipoxantina.

1. Introdução

A desnutrição energético-proteica é tida como um dos problemas mais comuns nos países em desenvolvimento causando consequências graves principalmente em crianças como o marasmo e kwashiorkor (Estrada; Jimenes; Palma, 2018). Proteínas de origem vegetal surgem como alternativas na dieta de boa parte da população desses países, devido os altos preços das proteínas de origem animal, levando a população a consumi-las (Mune *et al.*, 2016).

A *Moringa oleifera*, popularmente conhecida como moringa, é tida como uma planta multi-uso devido quase todas as suas partes serem utilizadas na alimentação e na medicina popular. As folhas de *Moringa oleifera* são utilizadas para cuidados com a saúde e alimentação pelo seu alto teor de proteínas, vitaminas e minerais (Gopalakrishnan *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2020). A farinha de folhas compõe a formulação de alimentos infantis aumentando o conteúdo proteico (Anwar *et al.*, 2007). As folhas são bastante utilizadas para tratar desnutrição e para aumentar e enriquecer o leite materno de mães em fase de amamentação e, de acordo com Moyo *et al.* (2011) e Teixeira *et al.* (2014), o teor proteico encontrado nas folhas de *M. oleifera* é de 30,3% e 28,7%, respectivamente.

Atividades biológicas como antioxidante e hepatoprotetora já foram atribuídas as folhas de *M. oleifera* (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). O extrato hidroetanólico das folhas foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica e restaurar os níveis de enzimas antioxidantes hepáticas, em animais com hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (Uma *et al.*, 2010). Já o tratamento por 60 dias com extrato etanólico de folhas de *M. oleifera*, reverteu os efeitos do dano hepático induzido por Teclacloreto de carbono (CCl₄) (Singh *et al.*, 2014).

Embora as folhas da *M. oleifera* representem importante fonte de proteína, produtos de origem natural podem desencadear quadros de toxicidade em quem os consomem (Leandro *et al.*, 2017; Unuofin *et al.*, 2018). Apesar da ampla utilização de composto de origem natural,

seja na alimentação ou na medicina popular, a toxicidade é raramente testada. Os ensaios de toxicidade *in vivo* permitem a compreensão do mecanismo de ação de determinado produto, indicação de índice terapêutico e concentração que ser administrada ou consumida (Denny e Stewart, 2017). Em ensaios de toxicidade subaguda, o composto é administrado diariamente por um período de 28 dias, em uma dose limite de 1000 mg/kg/dia, onde se estabelece a partir de qual concentração há a presença sinais de toxicidade, efeito cumulativo e danos em órgãos específicos (OECD, 2008; Tahraoui *et al.*, 2010). O extrato metanólico das folhas de *M. oleifera*, administrado por 28 dias na concentração de 1000 mg/kg, foi capaz de causar alterações comportamentais, histopatológicas e desencadeou leucocitose nos animais tratados (Ajayi *et al.*, 2016).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a obtenção de uma fração rica em proteína (PRF) contendo lectina e inibidor de tripsina, tidos como fatores antinutricionais. Lectinas são proteínas hemaglutinantes que reconhecem carboidratos que podem interferir na digestão e absorção de nutrientes, por interagir com enzimas digestivas e superfície de células intestinais (Silva e Silva, 2000). Os inibidores de tripsina reduzem a digestibilidade de proteínas a nível intestinal (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002). Em estudo anterior (dados não publicados), nosso grupo de pesquisa mostrou que animais tratados com PRF em uma única dose (2.000 mg/kg) por via oral não apresentaram sinais de toxicidade após 14 dias da administração.

O estudo relata a investigação de toxicidade subaguda em diferentes concentrações de PRF (20, 40 e 80 mg/kg/dia) administradas por um periodo de 28 dias e o efeito de PRF sob marcadores do estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes e estado redox celular (razão GSH/GSSG). Também, foram identificados e quantificados os metabólitos presentes em amostras no fígado de ratos Wistar tratados com PRF.

2. Metodologia

2.1. Produção de PRF

Folhas de *M. oleifera* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, em Recife, Estado de Pernambuco, com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (38690) do Ministério do Meio Ambiente. Um exemplar de comprovante (número 73.345) foi arquivado no herbário Dárdano de Andrade Lima (Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brasil).

A fração rica em proteínas (PRF) foi obtida a partir da farinha de folhas (7,5 g) homogeneizada em agitador magnético (4 °C por 4 h) com 100 mL de tampão citrato fosfato pH 3,0 contendo NaCl 0,15 M. Em seguida, o homogenato foi filtrado em papel de filtro, centrifugado (9.000 g; 15 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato tamponado. Após tratamento do extrato com sulfato de amônio (60% w/v), a fração precipitada contendo proteína foi coletada após centrifugação (9.000 g; 15 min, 24 °C) e em seguida dialisada (em membrana de 3,5 kDa) contra água destilada (6h a 4 °C), correspondendo a PRF. O material foi concentrado por liofilização e ressuspendido em NaCl 0,15 M.

A quantificação proteica foi realizada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando curva padrão (31,25 a 500 µg/mL) de albumina sérica bovina (BSA). A fração proteica (0,2 mL) foi incubada (10 min) com 1 mL de uma solução alcalina de cobre (1 mL de sulfato de cobre a 0,5% (p/v) em citrato de sódio a 1% (p/v) e 50 mL de solução de carbonato de sódio a 2% (p/v) em hidróxido de sódio a 0,1% (p/v). Após incubação em temperatura ambiente, 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteus, diluído 1:1 com água, foi adicionado aos tubos de ensaio e, após 30 min, foi medida a absorbância a 720 nm.

2.2. Determinação da atividade inibidora de tripsina e atividade hemaglutinante

O ensaio de atividade inibidora de tripsina foi realizado de acordo com Pontual *et al.* (2012) em placa de 96 poços de fundo chato onde foi adicionada a amostra (20 μ L) a ser testada, tripsina bovina a 0,1 mg/mL (5 μ L), o substrato sintético BApNA 8 mM (5 μ L) e tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 em NaCl 0,15 M para completar um volume final de 200 μ L. Antes e após a incubação a 37 °C por 120 min, foi determinada a absorbância em 405 nm. No tubo controle a amostra foi substituída por tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 em NaCl 0,15 M. O teste foi realizado em triplicata. Uma unidade de atividade inibidora de tripsina (U/mg) foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a absorbância em 0,01 em relação ao controle.

A determinação de atividade hemaglutinante foi realizada em placas de microtitulação, de acordo com Paiva e Coelho (1992). Aliquota de 50 μ L da amostra foi serialmente diluída em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 μ L de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos tratados com glutaraldeído. Uma unidade de atividade hemaglutinante (título⁻¹) foi definida como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu total hemaglutinação. A atividade hemaglutinante específica foi definida pela razão entre o título e a quantidade de proteínas (mg). Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado incubando (15 min, 28 °C) PRF com as glicoproteínas (2,0 mg/mL) albumina, azocaseína, caseína e fetuína antes da determinação da atividade hemaglutinante.

2.3. Avaliação da toxicidade subaguda

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), mantidos no viveiro do Departamento de Antibióticos da UFPE em ciclo 12h claro/escuro e temperatura em torno de 21°C. Todos os animais receberam água e o mesmo tipo de ração *ad libitum* durante todo o experimento. O procedimento foi encaminhado para apreciação e teve sua execussão

145 aprovada pelo Comitê de Ética de uso animal da UFPE (nº 0070/2018 CEUA/UFPE).

146 A toxicidade subaguda foi determinada de acordo com a OECD, Guideline 407
147 (OECD, 2008). Os animais (60 dias) foram divididos nos seguintes grupos, cada um
148 composto por 5 machos: controle (C), que recebeu o veículo (solução salina 0,9%); os
149 grupos tratados com PRF em diferentes concentrações ($T_1 = 20$ mg/kg; $T_2 = 40$ mg/kg e; T_3
150 $= 80$ mg/kg). PRF e o veículo foram administrados diariamente por gavagem durante 28 dias
151 e os ratos foram observados diariamente.

152 Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (2:1; v/v) no final do 28º dia,
153 por via intraperitoneal, e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a realização dos
154 exames hematológicos e séricos. O fígado, rim, baço, coração e pulmão foram coletados para
155 análise histológica. Uma parte do fígado foi removido para avaliação de estresse oxidativo e
156 uso na análise metabólica.

157 2.3.1. *Análise bioquímica, hematológica, de hemostasia e eletrólitos*

158 A glicose plasmática foi medida utilizando tiras reagentes One Touch Ultra Johnson &
159 Johnson. O sangue dos animais foi colhido e os seguintes parâmetros bioquímicos foram
160 avaliados: proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato
161 aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase (GGT), uréia e
162 creatinina, usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador
163 COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça). Análise hematológica foi
164 realizada utilizando um analisador automático (Sangue de animal Counter-ABC Vet,
165 Montpellier, França) e microscopia óptica; os parâmetros avaliados foram: eritrócitos,
166 hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular
167 média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e
168 diferenciada dos leucócitos. A hemostasia avaliou o tempo de protrombina (TP), o tempo
169

tromboplastina parcial ativada (TTPA) e o tempo de trombina (TT), utilizando kit específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) em coagulômetro semiautomático (CloTimer-Drake, Sorocaba, Brasil). A análise de eletrólitos (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) foi realizada por AVL 9180 Analisador de Eletrólitos (Roche, Basileia, Suíça).

2.3.2. Análise histopatológica

A análise histológica do fígado, rim, baço, coração e pulmão dos animais do grupo controle e dos grupos tratados com PRF foram realizadas por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, v/v) e em seguida desidratadas através de uma série gradual de etanol (70-100%), diafanizado em xilol, e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (5 mm) foram corados com hematoxilina-eosina e montados usando lâminulas com resina Entellan (Merck, Alemanha). Os materiais foram observados sob um microscópio Motic BA200 acoplado a um Moticam 1.000 1.3 MP câmera digital (Motic Incorporação Ltd, Causeway Bay, Hong Kong).

2.4 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo

2.4.1. Preparo do homogeneizado do tecido hepático

O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 50 mM e EDTA 1 mM, pH 7,4; com adição de ortovanadato de sódio 1 mM e PMSF 2 mM). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1180g, a 4° C, por 10 min e os sobrenadantes submetidos à quantificação proteica de acordo com método de Bradford *et al.* (1976).

2.4.2. *Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)*

Para a dosagem de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978). Adicionou-se a uma alíquota (300 µg proteína) do homogeneizado ao ácido tricloroacético (TCA) a 30%, o material foi centrifugado a 1180g por 10 minutos, o sobrenadante retirado e adicionado ao ácido tiobarbitúrico a 0.73%. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada, utilizada para a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA), utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em µM/µg de proteína.

2.4.4. *Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas)*

A avaliação da oxidação de proteínas descrito por Zanatta *et al.* (2013). As proteínas (300µg) do homogeneizado foram precipitadas em TCA a 30% seguido de centrifugação a 1180g por 15 minutos, o pellet foi ressuspensão e adicionado DNPH 10mM dissolvido em HCl 2.5 N e incubado em local livre de luz a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA 20% foram centrifugadas e passaram por uma série de lavagens com tampão contendo acetato de etila e etanol, até o precipitado ser ressuspensão em cloridrato de guanidina e levado ao espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA) para leitura em um comprimento de onda de 370nm (37°C). Os resultados foram expressos em nmol/µg de proteína.

2.4.5. *Avaliação do conteúdo de sulfidril-SH*

O conteúdo de sulfidril foi determinado a partir da reação com o composto DTNB [5,5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid)] (Ellman, 1959). A alíquota do homogeneizado (300 µg de proteína) foi incubada no escuro após a adição de DTNB 10mM e o volume final foi de 1

mL completado com tampão de extração pH 7.4 e realizada a leitura com absorbância (30°C) a 412nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em M/ μ g de proteína.

2.4.6. Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD) foi feita de acordo com Misra e Fridovich (1972). homogeneizado de fígado (80 μ g de proteína) foi incubado no tampão carbonato de sódio (0,05 %, pH 10.2, 0.1 mM de EDTA) em banho-maria a 37°C, antes da avaliação da atividade enzimática. A reação teve início pela adição de 20 μ L de epinefrina (150 mM), em ácido acético (0.05 %). A absorbância foi lida a 480nm por 3 min em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a auto-oxidação de 1 μ mol de epinefrina por minuto.

2.4.7. Avaliação da atividade enzimática da Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi monitorada de acordo com Aebi (1974). O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H₂O₂, que nas nossas condições de temperatura e pH foi definido como 4.6×10^7 . Assim, 0,3M de H₂O₂ foi adicionado a amostra (80 μ g de proteína), seguido de adição do tampão fosfato 50mM, pH 7.0 a 20°C, a absorção de decaimento foi monitorizada por 4 min a 240nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Aebi, 1974). Uma unidade de catalase foi definida como quantidade de proteína requerida para converter 1 μ mol de H₂O₂ em H₂O por minuto.

2.4.8. Avaliação da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (GST)

Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se a amostra (120µg de proteína) ao tampão fosfato (0.1M) e EDTA (1mM), amostra, GSH (1mM) e CDNB (1mM). A absorbância (340nm) foi registrada por um período de aproximadamente 3 min com controle da temperatura (30°C), em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de quanto 1µmol do composto DNP-SG por minuto. (Habig *et al.*, 1974).

2.4.9. Quantificação do balanço redox (razão GSH/GSSG)

A razão GSH/GSSG foi avaliada através da quantificação dos níveis da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) segundo o método de Hissin e Hilf (1976). Em tampão 0,1M fosfato contendo 5mM de EDTA (pH 8.0) foi adicionado 120 µg do homogenato do fígado e o fluorescente ortoftaldeído (1µM), e então incubado a temperatura ambiente, por 15 minutos e lido em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA), utilizando os comprimentos de onda de 350nm de excitação e 420nm de emissão. Para determinar os níveis de GSSG, a amostra foi incubada com 0.04M de N-ethylmaleimide por 30 minutos, seguido da adição de tampão NaOH a 0,1M. Quando os preparos estavam prontos, seguindo os mesmos passos de GSH foi executado para determinar GSSG. O estado redox foi determinado pela relação GSH/GSSG (Hissin; Hilf, 1976).

2.5 Preparação e análise de amostras de tecido hepático por ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras de tecido hepático foram obtidas seguindo protocolo definido por Beckonert *et al.* (2007) com modificações. Os solventes metanol, clorofórmio e água destilada estavam em temperatura de 4 °C. Tecido hepático congelado (0,5 g) foi transferido para um

269 tubo de vidro e homogeneizado com metanol (4,0 mL/g) e água (0,85 mL/g). A preparação foi
270 sonicada por 20 min. Em seguida, foi adicionado 2,0 mL/g de clorofórmio à preparação e
271 sonicada novamente. Posteriormente, foi adicionado 2 mL/g de clorofórmio e 2 mL/g de água
272 ao tubo e agitado em vórtex. A preparação foi mantida em gelo por 15 min. Os tubos foram
273 centrifugados a 1000 g, por 15 min a 4 °C, resultando em uma fase superior de metanol/água
274 (com metabólitos polares) e uma fase inferior de clorofórmio (com compostos lipofílicos),
275 delimitados por proteínas e fragmentos celulares. As fases metanol/água e clorofórmio foram
276 separadas e os solventes evaporados em SpeedVac. As preparações foram armazenadas a -80 °C.

277 Às amostras foi adicionado 600 µL de uma solução tampão [tampão fosfato de sódio,
278 100% de D₂O, pH = 7,4 e 1 mM de TSP (padrão de deslocamento)]. Todo experimento de
279 RMN foi realizado em espectrômetro Bruker AVANCE III 600 MHz equipado com sonda
280 PABBO de 5 mm a 300K. Todos os espectros de RMN-¹H foram realizados utilizando-se da
281 sequência de pulsos *noesygppr1g* para supressão do sinal de ressonância da água por pré-
282 saturação. Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros: NS: 128
283 (número de experimentos); DS: 4 (número de experimentos falsos); D1: 4,00 s (tempo de
284 relaxação); D8: 0,09 s (tempo de mistura); TD: 64K (número de pontos do espectro); SW:
285 20,0290 ppm (largura da janela); O1P: 4,69 ppm (posição onde aparece o sinal referente a
286 água e, portanto, é irradiada); AQ: 4,0 s (tempo de aquisição); P1: 90° (ângulo do pulso).

287 Os espectros foram pré-processados no software TopSpin® 4.1.3, onde foram
288 realizados correção de fase e calibração do deslocamento químico com referência no TSP (δ =
289 0 ppm). Para identificação dos metabólitos utilizou-se o software Chenomx® e do banco de
290 dados disponível na plataforma online www.hmdb.ca. A matriz de dados foi preparada
291 utilizando-se do software MatLab®, onde todos os espectros foram sobrepostos, alinhados,
292 cortados e normalizados, por fim os dados foram transportados para o Excel® formando uma

matriz de dados contendo aproximadamente 24 mil variáveis. Para a análise estatística multivariada utilizou-se do software Simca® e da plataforma online www.metaboanalyst.ca.

2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm SD e submetidos à ANOVA de um fator seguido de teste de Bonferroni. Para comparação dos demais dados foi utilizado o teste T de STUDENT não pareado. O nível de significância foi mantido em $p < 0,05$ para todas as análises.

3. Resultados e Discussão

Estudos mostram que as folhas de *M. oleifera* são uma boa fonte de proteínas de origem vegetal e rica em macro e micronutrientes (Moyo *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2014), além disso apresentam uma grande importância farmacológica, devido a atividades biológicas como a antioxidante e hepatoprotetora (Singh *et al.*, 2014).

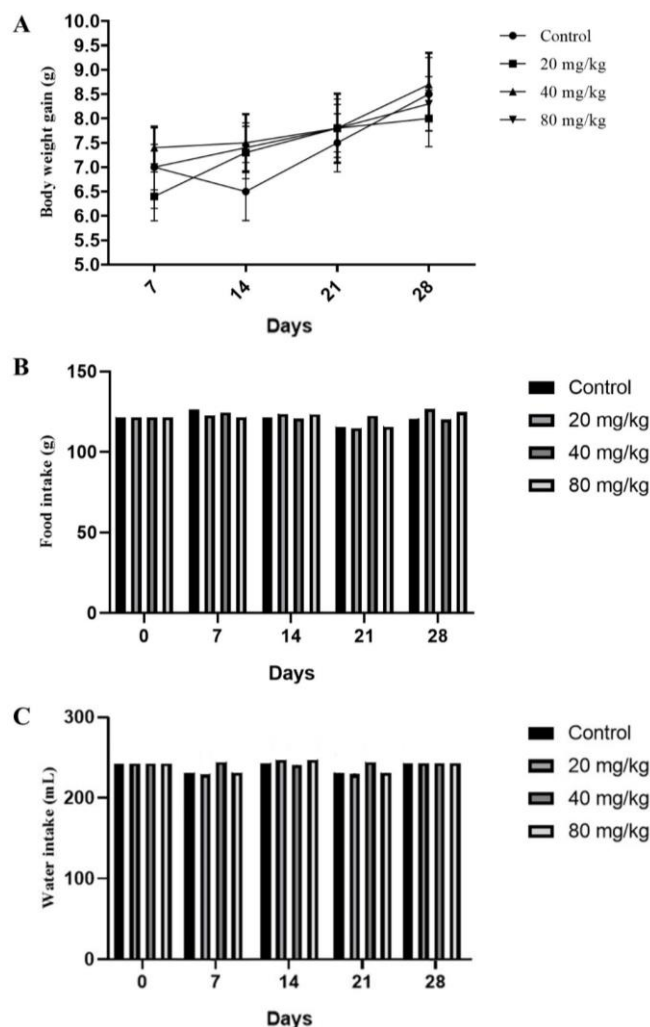
PRF foi obtida das folhas de *M. oleifera* seguindo protocolo pré-estabelecido. PRF apresentou concentração proteica de 6,0 mg/mL, atividade lectinica específica (AHE) de 2,67 $\text{titulo}^{-1}/\text{mg/mL}$ inibida pelas glicoproteínas (albumina, azocaseína, caseína e fetuina: 0,67) e inibidora de tripsina específica (AITE) de 81,4. Em trabalho anterior, além de lectina e inibidor de tripsina, foi observado que PRF também apresentava os flavonoides rutina e vitexina e baixa concentração de ferro. PRF não foi citotóxica, hemolítica e genotóxica e também não desencadeou sinais de toxicidade (análise comportamental, hematológica, bioquímica e histológica) quando administrada em única dose (2.000 mg/kg) no intervalo de 14 dias.

Inibidores de proteases são considerados compostos antinutricionais por interferir na absorção de nutrientes devido à sua atividade inibitória sobre enzimas digestivas em humanos e animais (Kostekli; Karakaya, 2017). Inibidores de tripsina impedem a hidrólise de proteínas e, conseqüentemente, que aminoácidos sejam liberados e absorvidos, causando desconforto gástrico (Scrimgeour *et al.*, 2006). A presença de inibidores de tripsina em compostos naturais interfere no metabolismo normal e sistêmico de órgãos como pâncreas, fígado e dos músculos, prejudicando a taxa de crescimento dos animais (Lima *et al.*, 2004). As lectinas, por sua vez, interferem na absorção de nutrientes por meio da ligação aos receptores glicoproteicos das células epiteliais da mucosa intestinal (Daffodil *et al.*, 2016). Lectinas são capazes de resistir à digestão gástrica e intestinal e permanecerem intactas por vários dias (Alatorre-Cruz *et al.*, 2018). Poucos estudos sobre a toxicidade subaguda de proteínas obtidas das folhas de *M. oleifera* foram relatadas. Para responder esse questionamento, este trabalho determinou a toxicidade oral em dose repetida de PRF por 28 dias e suas conseqüências a nível hepático.

Na avaliação da toxicidade, após a administração oral de PRF nas concentrações de 20, 40 e 80 mg/kg/dia, não foram observados sinais estimulantes ou depressores durante o período 60 min de observação referentes ao *screening* hipocrático.

Na figura 1A, observamos que PRF não interferiu no ganho de peso dos animais tratados, mesmo na concentração mais elevada, em comparação com o grupo controle. Também não houve diferença significativa no consumo de ração (Figura 1B) e de água (Figura 1C), o que indica que administração de doses repetidas por via oral de PRF não teve efeito sobre o desenvolvimento dos animais. Também não houve mortalidade o que indica que aplicação diária de PRF, nas concentrações mencionadas, é considerada de baixa toxicidade de acordo com protocolo 407 da *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 2008).

Figura 1: Efeito da PRF (20, 40 e 80 mg/kg por via oral) ou solução salina 0,9% (controle) no ganho de peso corporal (A), consumo semanal de alimentos (g) (B) e água (mL) (C) de ratos Wistar tratados por via oral por 28 dias.



Sem resultado significativo em relação ao controle com $p < 0,05$. ANOVA *two way* (teste de Tukey). Fonte: O Autor (2023)

No entanto, para avaliar efetivamente a segurança de PRF é necessário investigar se há sinais de toxicidade através parâmetros hematológicos, bioquímicos, hemostasia e concentração de eletrólitos. As análises hematológicas e de coagulação (hemostáticos) são capazes de fornecer informações sobre o *status* fisiológico e patológico em humanos e animais uma vez que o sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis a compostos tóxicos (Rahman *et al.*, 2001; Igwebuike *et al.*, 2007). No presente estudo, não foram

detectadas alterações hematológicas (Tabela 1) e hemostasia (Tabela 2) uma vez que os valores encontrados para os animais do grupo controle e tratados não diferiram estatisticamente.

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados com a PRF em dose repetida por 28 dias.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
RBC	8,33±0,65	8,11±0,55	7,89±0,69	8,03±0,73
HCT	40,18±1,49	39,45±1,66	40,24±1,89	39,78±2,04
HB	13,37±0,46	13,95±0,90	13,61±0,87	13,84±1,03
MCV	52,29±1,81	52,68±1,32	51,94±1,85	52,89±1,27
MCH	17,08±0,53	16,88±1,10	17,13±0,91	16,92±0,87
MCHC	34,55±0,63	34,91±1,18	35,04±1,01	35,54±0,97
PLT	882,55±9,85	893,66±9,13	899,83±9,05	880,43±8,74
WBC	8,6±0,78	8,22±0,65	8,06±0,78	8,45±0,80
SEG	70,45±3,27	71,56±2,79	72,14±2,65	70,44±2,83
LYM	24,27±0,81	25,04±0,93	24,82±0,87	25,18±0,71
MON	3,51±0,50	3,31±0,36	3,40±0,41	3,43±0,54
BOS	0,09±0,02	0,12±0,05	0,10±0,04	0,14±0,07
EOS	1,57±0,32	1,62±0,38	1,46±0,40	1,52±0,32

RBC: Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$); HCT: Hematócrito (%); HB: Hemoglobina (g/dL); MCV: Volume corpuscular médio (%); MCH: Volume corpuscular da hemoglobina (%); MCHC: Volume corpuscular da concentração da hemoglobina (%); PLT: Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$); WBC: Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$); SEG: Segmentados (%); LYM: Linfócitos (%); MON: Monócitos (%); BOS: Basófilos; EOS: Eosinófilos. Valores representados com média \pm desvio padrão (n=5/group). Diferenças significantes ($p > 0,05$) não foram encontradas em comparação com o controle. Fonte: O Autor (2023)

366

367

Tabela 2 - Parâmetros hemostáticos de ratos Wistar tratados com a PRF em dose repetida por 28 dias.

Tratamentos	Parâmetros (segundos)		
	APTT	PT	TT
Controle	16,07±0,98	13,35±0,93	19,13±1,21
20 mg/kg	17,04±1,45	13,03±1,09	20,05±1,26
40 mg/kg	15,87±1,28	13,79±0,84	20,14±1,33
80 mg/kg	15,78±1,31	14,04±1,23	19,39±1,20

368

APTT: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada; PT: Tempo de Protrombina; TT: Tempo de Trombina.

369

Valores representados com média ± desvio padrão (n=5/group). Diferenças significantes ($p > 0,05$) não foram

370

encontradas em comparação com o controle. Fonte: O Autor (2023)

371

372

A interpretação do perfil hematológico pode fornecer dados necessários para avaliação

373

da saúde animal, indicando a ocorrência de alterações que podem ser causadas por estresse,

374

nutrição, idade, dentre outros fatores (Campbell, 2004). Asiedu-Gyekye *et al.* (2014), em seu

375

estudo de toxicidade subaguda com aplicações diárias infusão de folhas de *M. oleifera* (MOE)

376

por 14 dias, mostraram que as concentrações de (40 e 80 mg/kg/dia) desencadearam um

377

aumento nos valores de leucócitos, diminuição do volume corpuscular médio e aumento

378

significativo da contagem de plaquetas, em comparação ao controle. No entanto, não foram

379

observadas reações adversas e achados histopatológicos evidentes de toxicidade. Dessa forma,

380

os autores concluíram que a infusão das folhas de *M. oleifera* é razoavelmente seguro para

381

consumo.

382

Ingestão por longos períodos de substâncias químicas de origem vegetal podem causar

383

danos em órgãos como fígado, rim, coração e até mesmo o sistema gastrointestinal (Ramaiah,

384

2007; Greaves, 2007). Lesões em órgãos-alvos podem surgir mediante administração de

385

compostos tóxicos e serem detectadas por enzimas específicas, como nos casos de lesão

hepática com elevação dos níveis de enzimas transaminase, como a enzima alanino aminotransferase (ALT). ALT é um marcador mais sensível que aspartato aminotransferase (AST), pois está localizada no citosol dos hepatócitos e dano tecidual hepático acarreta liberação dessa enzima na corrente sanguínea (Janeway, 2005).

As análises bioquímicas mostraram uma diminuição significativa nos níveis de glicose sanguínea dos animais tratados com todas as concentrações de PRF, em comparação com controle. Devido a sua especificidade em se ligar a sítios e receptores específicos na superfície das células intestinais, as lectinas podem acarretar interferência na absorção da glicose (Redondo e Alvarez-Pellitero., 2010). A lectina presente em PRF tem afinidade por glicoproteína e é possível que o efeito hipoglicemiante de PRF ocorra devido a interferência no processo de absorção por interação da lectina com receptores glicosilados na superfície dos enterócitos. Asanuma-Date *et al.* (2012) avaliaram a internalização de glicose por *Sodium-glucose cotransporter type 1* (SGLT-1) na presença de α -amilase pancreática e de lectinas. O estudo revelou que as lectinas não interferiram na absorção de glicose por SGLT-1 mas diminuição na captação da glicose pelo sistema foi detectada quando foi utilizada a associação entre lectina e α -amilase pancreática, que é uma enzima que apresenta afinidade por regiões altamente glicosiladas presentes nas membranas das bordas em escova dos enterócitos.

Paula *et al.* (2017) demonstraram o efeito semelhante a insulina de um isolado proteico (Mo-LPI) com atividade lectínica obtido de folhas de *M. oleifera*. A administração diária por sete dias de Mo-LPI (500 mg/kg i.p.) em animais diabéticos, resultou em diminuição significativa no nível de glicose sanguínea, de forma lenta e gradual, com efeito redutor semelhante ao da insulina. Adicionalmente, Mo-LPI apresentou reação cruzada com um anticorpo anti-insulina. PRF é um isolado proteico também produzido a partir das folhas de *M. oleifera* que apresenta atividades biológicas distintas daquelas de Mo-LPI, desde que apenas PRF apresenta atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho e tem efeito

hipoglicemiante quando administrada por via oral. Atividades biológicas distintas podem ser decorrentes da presença de diferentes constituintes em PRF e Mo-LPI. O procedimento utilizado para produção de Mo-LPI diferentemente daquele utilizado na produção de PRF, incluiu a presença no tampão de extração de inibidores de serino (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e metaloproteases (ácido etilenodiaminotetraacético) o que pode resultar em diferentes misturas de peptídeos e de polivinilpolipirrolidona que pode ter resultado em diferente constituição de metabólitos secundários.

PRF contém os flavonoides rutina e vitexina e o efeito hipoglicemiante também pode ser devido a presença de metabólitos secundários. Jadhav e Puchchakayala (2012) demonstraram que a rutina (100 mg/kg) diminuiu a concentração de glicose plasmática em ratos diabéticos por aumento da captação celular e diminuição da atividade de transportadores de glicose. Outros flavonoides como a quercetina e ácido elágico demonstraram o mesmo efeito. Adicionalmente, Sunarwidhi, Sudarsono e Nugroho (2014) atribuíram o efeito hipoglicemiante do extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* a flavonoides como a rutina (2,90%), reduzindo significativamente o nível da glicose plasmática em ratos com diabetes mellitus induzida por estreptozotocina.

Biomarcadores renais, hepáticos e perfil lipídico dos animais tratados com PRF em relação ao controle (Tabela 3), sugerem que o efeito cumulativo de PRF não causou alteração em tecidos alvos. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Awodele *et al.* (2012), onde os autores revelaram que animais tratados diariamente com extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* nas concentrações de 250, 500 e 1500 mg/kg/dia, durante 60 dias, não apresentaram alterações dos parâmetros bioquímicos analisados. No entanto, em nosso estudo anterior onde o extrato salino das folhas de *M. oleifera*, elevou os valores de ALT em ensaio de toxicidade aguda (2.000 mg/kg), sendo atribuído tal efeito a uma alta concentração de rutina e ferro (complex ferro-rutina).

De acordo com Kurpińska e Skrzypczak (2010), dietas ricas em proteínas podem ocasionar diminuição da função renal com elevação dos níveis de ureia e creatinina. No entanto, a administração diária de PRF, não causou alterações desses biomarcadores nos animais tratados em comparação com o controle, diferentemente do estudo conduzido por Asiedu-Gyekye *et al.* (2014) que relataram níveis de ureia sanguínea elevados nos animais tratados com infusão de folhas de *M. oleifera* em uma concentração de 80 mg/kg/dia.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos do sangue de ratos Wistar tratados com a PRF em dose repetida por 28 dias.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
GLU	103,66±8,50	78,67±5,03*	81,30±3,21*	87,00±2,04*
ALB	40,55±2,71	42,10±2,82	40,69±2,75	42,58±3,10
ALT	56,99±2,77	58,06±2,55	55,77±3,21	57,50±3,38
AST	143,57±4,27	139,94±6,31	148,66±7,30	140,79±6,13
ALP	14,17±0,93	15,22±1,20	13,79±1,32	14,90±1,51
BIL	0,58±0,19	0,49±0,17	0,54±0,15	0,53±0,19
GGT	15,26±1,02	14,62±1,08	14,45±1,27	15,56±1,31
TP	69,21±2,33	68,88±4,24	71,09±4,78	70,62±4,16
UR	0,38±0,11	0,44±0,13	0,36±0,16	0,42±0,17
CRE	4,06±0,81	3,92±0,78	3,81±0,80	3,90±0,74
TC	74,29±3,12	75,11±4,09	77,25±4,46	75,83±4,78
TG	80,10±3,71	82,58±4,79	83,02±5,46	82,71±5,28
HDL-c	32,35±2,01	33,61±3,44	34,50±3,81	35,03±4,20
LDL-c	28,82±1,77	28,13±2,13	27,29±2,34	28,56±2,78
VLDL	14,65±1,24	13,84±1,89	14,41±1,22	15,07±1,55

GLU: Glicose mg/dL; ALB: albumina (g/dL); ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALP: fosfatase alcalina (U/L); BIL: bilirubina (mg/dL); GGT: gama-glutamil transferase; TP: proteína total (g/dL); UR: uréia sanguínea (mg/dL); CRE: creatinina (mg/dL); TC: colesterol total (mg/dL) TG: triglicerídeos (mg/dL); HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade. Valores representados com média \pm desvio padrão (n=5/group). Diferenças significantes ($p > 0,05$) foram encontradas em comparação com o controle (*). Fonte: O Autor (2023)

Compostos naturais administrados em doses elevadas e de forma repetida, podem causar danos nos glomérulos e túbulos renais, o que resulta na perda da função de filtração glomerular, diminuição da reabsorção tubular e perda de capacidade de absorção de íons (Zhou *et al.*, 2017). Adicionalmente, alterações na funcionalidade renal também podem ser visualizadas através de eletrólitos plasmáticos (Bellomo *et al.*, 2012). Não foram observadas alterações significativas nas concentrações dos eletrólitos em todos os grupos tratados com PRF, em comparação com o controle (Tabela 4).

Dessa forma, análise sanguínea dos parâmetros analisados revelou que PRF nas concentrações analisadas não foi desencadeou toxicidade nos animais tratados.

Tabela 4 - Avaliação dos eletrólitos no soro sanguíneo de ratos Wistar tratados com a PRF

Tratamentos	Parâmetros			
	Na ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	K ⁺
Controle	122,45 \pm 8,36	93,53 \pm 6,72	92,32 \pm 4,57	7,34 \pm 0,61
20 mg/kg	125,36 \pm 9,28	93,44 \pm 5,39	92,91 \pm 5,61	7,57 \pm 0,84
40 mg/kg	128,52 \pm 7,22	96,61 \pm 5,21	91,49 \pm 6,35	7,41 \pm 0,77
80 mg/kg	123,55 \pm 9,01	95,38 \pm 6,38	92,20 \pm 5,33	7,62 \pm 0,71

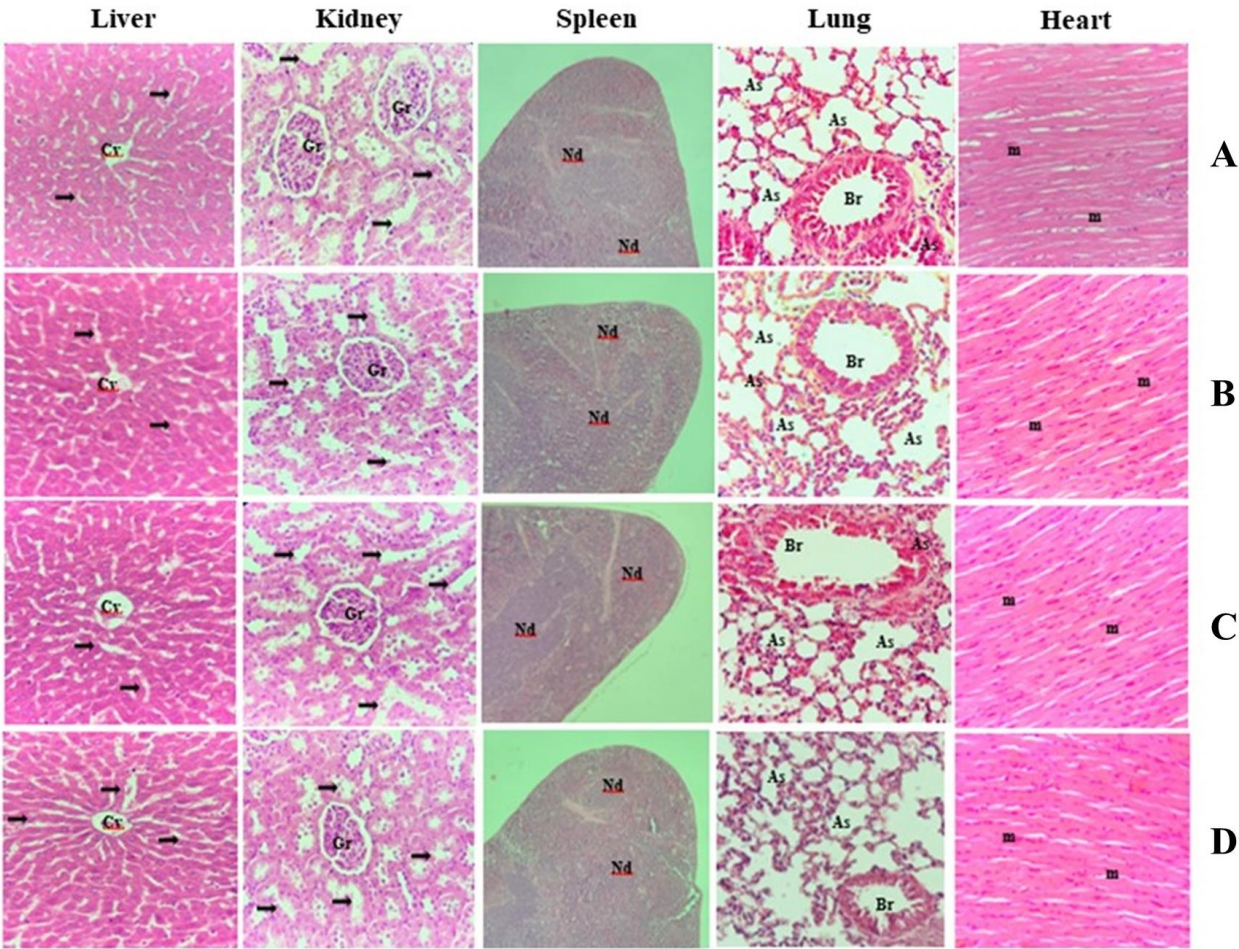
Valores representados com média \pm desvio padrão (n=5/group). Diferenças significantes ($p > 0,05$) não foram encontradas em comparação com o controle. Fonte: O Autor (2023)

Em análise histopatológica, PRF não apresentou sinais de toxicidade em nenhuma das concentrações administradas. A análise do tecido renal revelou glomérulos com distribuição homogênea e morfologia cortical preservada, com manutenção do espaço de Bowman, para todos os animais (Figura 2 A – D). Túbulos proximais e distais contorcidos bem definidos sem sinais aparentes de degeneração ocasionados pelo tratamento. O baço no grupo controle (Figura 2A) mostrou uma arquitetura normal com polpas vermelha e branca bem delimitadas de dimensões normais. Nos grupos tratados com PRF (Figura 2B – D) apresentaram aparência e morfologia normais.

O tecido cardíaco dos animais que receberam a solução salina (Figura 2A) e tratados com PRF (Figura 2B – D) apresentaram estrutura miocárdica preservada, sem sinais de degeneração, necrose, inflamação ou outras alterações. O tecido pulmonar dos animais tratados com PRF também apresentou morfologia normal como no grupo controle.

A avaliação histopatológica do fígado mostrou filamentos regulares de hepatócitos com espaço sinusoidal bem definido. Veias lobulares com calibres usuais definidos, circundado por tecido conjuntivo frouxo, sem atividade reativa visível, para os grupos controle e tratados com PRF (Figura 2 A – D), sugerindo conformidade com os níveis normais das enzimas hepáticas, que indicam ausência de lesões nesse órgão.

Figura 2 - Fotomicrografias representativas do fígado, rim, baço, pulmão e coração de animais dos grupos controle (NaCl 0,15M) (A) e fração rica em proteínas (PRF) nas concentrações de 20 mg/kg/dia (B), 40 mg/kg/dia (C) e 80 mg/kg/dia



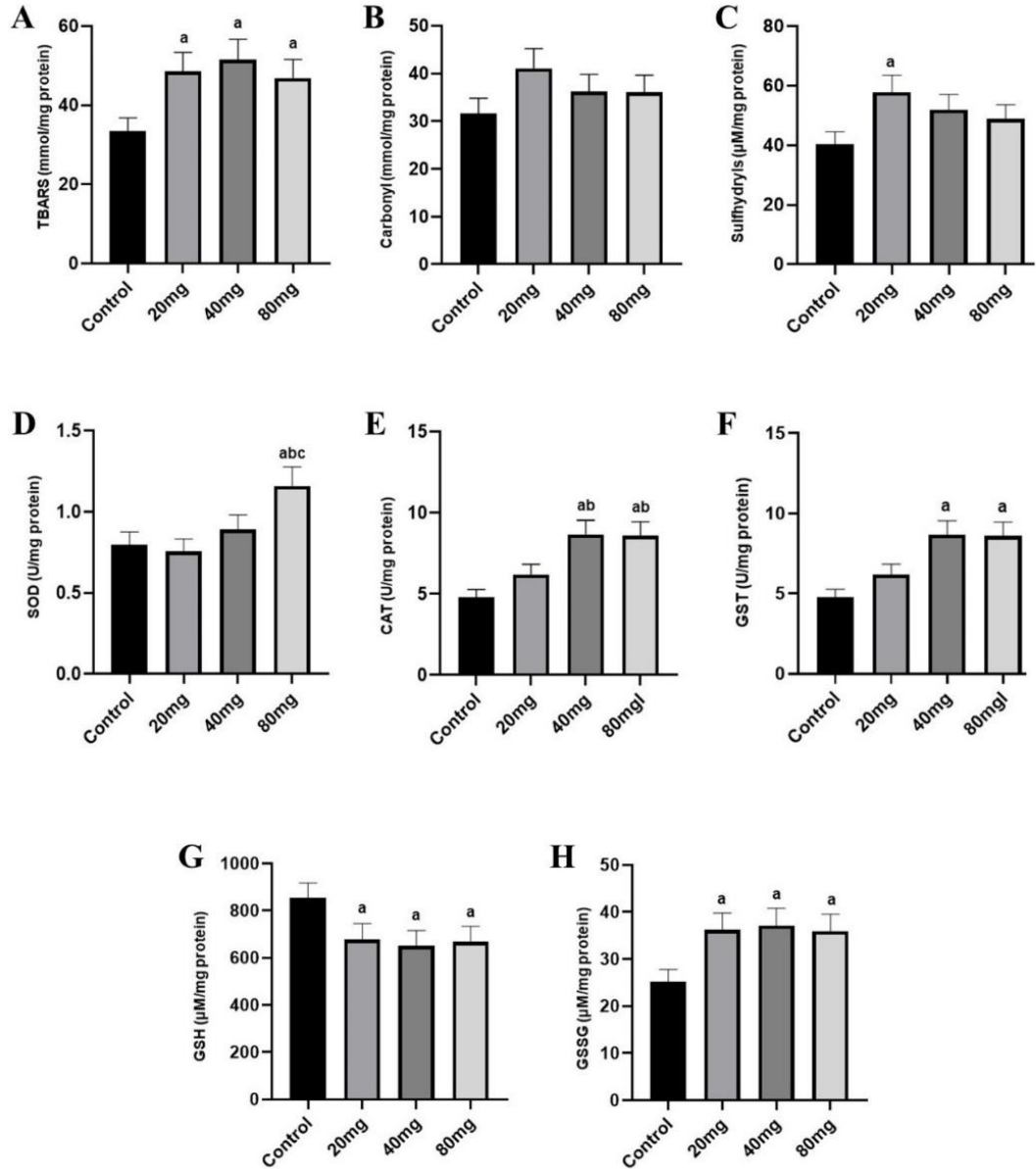
(D).

Fígado: As veias centrolobulares (Cv) de calibres diferentes, hepatócitos poligonais e filamentos de hepatócitos regulares (setas), são observados nas imagens. **Rins:** Possível ver componentes estruturais bem definidos com uma capsula fibrosa externa, glomérulos homogêneos (Gr) e presença do espaço de Bowman em todos os tratamentos. **Baço:** Estruturas preservadas como os nódulos linfáticos (Nd) sem alterações em todos os tratamentos. **Pulmão:** parênquima pulmonar com arquitetura preservada com bronquíolos (Br), septos alveolares e alvéolos normais (As). **Coração:** Pode ser observado miocárdio (M) com o sarcoplasma e fibras integras. Aproximação: 400x. Fonte: O Autor (2023)

O estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionado com desordens fisiopatológicas, logo, biomarcadores de estresse oxidativo, TBARS e carbonila foram avaliados (Figura 3). Os lipídios são mais susceptíveis à oxidação pelos radicais livres do que as proteínas, devido os elétrons mais expostos e vulneráveis presentes nos ácidos graxos insaturados (Trachootham *et al.*, 2008), o que foi constatado uma vez que os resultados mostraram que a administração de PRF por 28 dias causou peroxidação lipídica, com elevação dos níveis de TBARS (Figura 3A), sem alterar os níveis de carbonila (Figura 3B) em todas as concentrações.

O estresse oxidativo pode ser induzido por um aumento nos agentes pró-oxidativos ou por um sistema de defesa antioxidante insuficientes ou defeituosos como reportado por Cogo *et al.* (2009) e Ferreira *et al.* (2016). As maiores concentrações de PRF elevaram a resposta antioxidante enzimática de SOD (Figura 3D), CAT (Figura 3E) e GST (Figura 3F) em comparação com o grupo controle.

Figura 3 - Níveis de biomarcadores do estresse oxidativo TBARS(A), Carbonila (B) e Sulfidril (C), antioxidantes enzimáticos Superóxido Dismutase (SOD) (D), Catalase (CAT) (E) e Glutaciona-S-Transferase (GST) (F) e antioxidantes não enzimáticos Glutaciona reduzida (GSH) (G) e oxidada (GSSG) (H) em homogeneizado de fígado de ratos Wistar tratados com fração rica em proteínas (PRF) nas concentrações de 20 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia e 80 mg/kg/dia e NaCl 0,15 M (controle) durante 28 dias.



Protein-rich fraction of *Moringa oleifera* leaves

Os valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5/grupo). Diferenças significativas (p > 0,05) foram encontradas em comparação com o controle (a) e entre grupos (b, 20mg/kg; c, 40mg/kg). Fonte: O Autor (2023)

O aumento das enzimas antioxidantes ocorreu para favorecer a eliminação do ânion superóxido formado no estresse oxidativo. Essa eliminação ocorreu pela ação da enzima superóxido dismutase (Mn-SOD ou Cu/Zn-SOD), gerando como produto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na presença de H_2O_2 os grupamentos sulfidrilas das proteínas de membrana são oxidados para sua forma sulfênica (Cys-SOH), causando alterações alostéricas que alteram a atividade dessas proteínas (An *et al.*, 2015). Provavelmente, o aumento de H_2O_2 , elevou a atividade da catalase, auxiliando os hepatócitos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, convertendo H_2O_2 em água e oxigênio (Belo e Souza, 2016), protegendo os grupamentos sulfidrilas (Figura 3 C) e diminuindo o dano proteico como foi observado pela dosagem de carbonila. A glutathione-S-transferase é capaz de regular o produto de peroxidação lipídica, eliminando o agente oxidante da célula (Awasthi *et al.*, 2017), logo, o aumento de GST se justifica.

A razão tiol/dissulfeto encontrado entre o GSH e GSSG (par redox não equilibrado) difere substancialmente entre os compartimentos celulares. No entanto, uma alteração significativa na proporção GSH/GSSG indica alterações no metabolismo redox da célula (Flohe, 2013). Dessa forma, alguns autores consideram que a proporção de glutathione reduzida para oxidada dentro das células pode ser usada como um marcador de estresse celular (Zitka *et al.*, 2012)

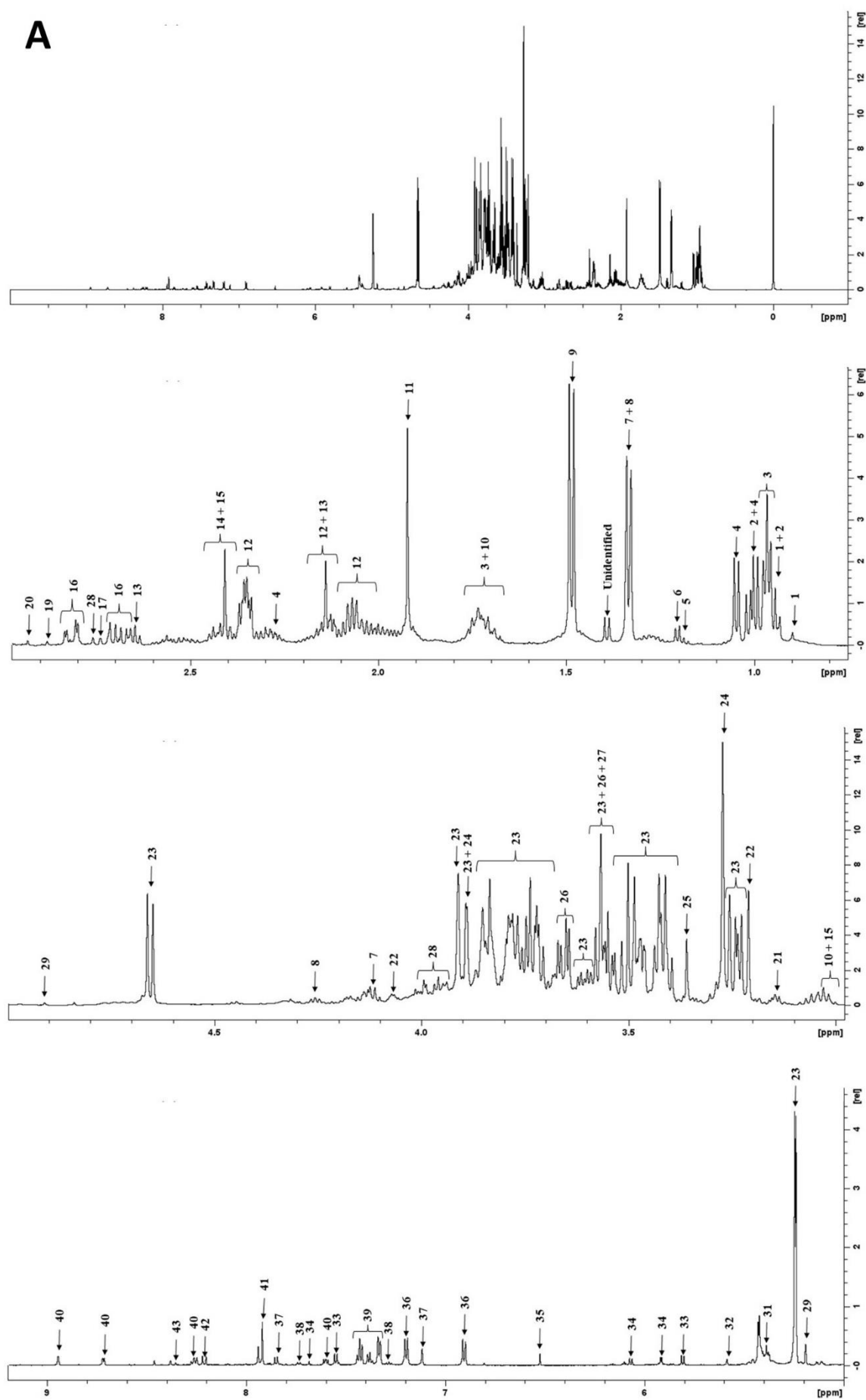
No estresse oxidativo há uma maior oxidação da glutathione que pode ser exportado para fora da célula, o que contribui para uma perda líquida de GSH intracelular sob a forma de GSSG (Jones, 2002). De acordo com Shan *et al.* (1990), a disponibilidade limitada do NADPH também pode levar ao aumento do GSSG e, conseqüentemente a uma diminuição de GSH, deixando as células mais sensíveis ao dano oxidativo. Os níveis elevados de GSSG e diminuídos de GSH em todos os tratamentos com PRF (Figura 3G e 3H), sugerem uma

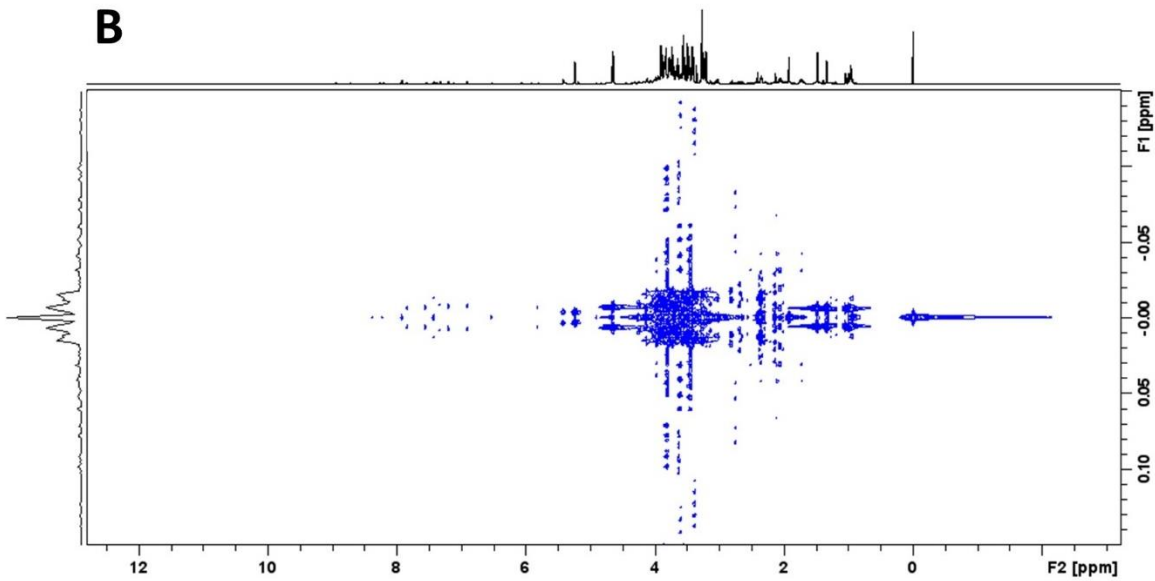
diminuição da atividade da enzima glutathione redutase devido uma baixa disponibilidade de NADPH interferindo na razão GSH/GSSG.

Análise metabolômica tem sido aplicada em estudos de toxicidade demonstrando que o perfil metabólico desempenha papel importante na descoberta e validação de novos biomarcadores, bem como contribui para o entendimento e interpretação dos mecanismos de ação tóxica no organismo (Canuto *et al.*, 2018). Os metabólitos são produtos finais ou intermediários nas vias anabólicas ou catabólicas, logo, alterações nesses perfis fornecem informações sobre as vias potencialmente afetadas (Xião *et al.*, 2017)

A figura 4 mostra a representação do espectro RMN-¹H (figura 4A) dos metabólitos obtidos do extrato polar do fígado dos ratos. Foram identificados 43 metabólitos com base na análise deconvolução espectral utilizando Chenomx e a literatura (Xião *et al.*, 2017) e validação por 2D da espectroscopia por J-resolvido ¹H (JRES) (figura 4B). Dentre os metabólitos identificados, há uma variedade de aminoácidos, carboidratos, produtos da glicólise, quebra de triacilgliceróis, intermediários do ciclo do ácido cítrico entre outros. As atribuições detalhadas dos metabólitos estão listadas na tabela 5.

Figura 4 – Espectro de RMN-¹H 600 MHz unidimensional (A) de metabólitos típicos do extrato polar do fígado e espectroscopia 2D por J-resolvido ¹H (B) (controle qualitativo).





Fonte: O Autor (2023)

Tabela 5 - Deslocamento químico e multiplicidade dos metabólitos identificados, em amostra polar de tecido hepático de ratos

Numeração	Metabólito	δ ^1H (ppm) e multiplicidade
1	Ácido Pantotênico	0.89 (si), 0.93 (si)
2	Isoleucina	0.94 (tri), 0.99 (du)
3	Leucina	0.97 (ddu), 1.71 (mult)
4	Valina	0.99 (du), 1.04 (du), 2.26 (mult)
5	Etanol	1.18 (tri)
6	3-Ácido Hidroxibutírico	1.20 (du)
7	Lactato	1.33 (du), 4.11 (qua)
8	Treonina	1.33 (du), 4.25 (mult)
*	Não Identificado	1.39 (du)
9	Alanina	1.48 (du)
10	Lisina	1.69 (qui), 3.02 (tri)
11	Acetato	1.92 (si)

12	Glutamato	2.06 (mult), 2.13 (mult), 2.36 (mult)
13	Metionina	2.14 (si), 2.64 (tri)
14	Succinato	2.40 (si)
15	2-Oxoglutarato	2.44 (tri), 3.01 (tri)
16	Aspartato	2.67 (qua), 2.81 (ddu)
17	Sarcosina	2.74 (si)
18	2-Deoxiguanosina	2.76 (qui)
19	Trimetilamina	2.88 (si)
20	Dimetilglicina	2.93 (si)
21	Etanolamina	3.14 (tri)
22	Colina	3.2 (si), 4.06 (mult)
23	Glicose	3.23 (qua), 3.40 (tri), 3.41 (tri), 3.47 (mult), 3.50 (tri), 3.54 (ddu), 3.64 (mult), 3.72 (tri), 3.74 (qua), 3.76 (qua), 3.83 (mult), 3.90 (ddu), 4.65 (du), 5.24 (du)
24	Betaina	3.27 (si), 3.88 (si)
25	Metanol	3.36 (si)
26	Glicerol	3.56 (qua), 3.65 (qua)
27	Glicina	3.56 (si)
28	Serina	3.93(ddu), 3.97 (ddu)
29	Manose	4.91 (si), 5.18 (du)
31	Alontoina	5.39 (si)
32	2-Etilacrilato	5.58 (si)
33	Uracila	5.8 (du), 7.55 (du)
34	Citidina	5.91 (du), 6.07 (du), 7.84 (du)

35	Fumarato	6.52 (si)
36	Tirosina	6.9 (du), 7.19 (du)
37	Histidina	7.11 (si), 7.84 (si)
38	Triptofano	7.28 (tri), 7.73 (du)
39	Fenilalanina	7.33 (du), 7.37 (tri), 7.43 (tri)
40	Niacinamida	7.6 (mult), 8.25 (mult), 8.71 (ddu), 8.94 (du)
41	Xantina	7.91 (si)
42	Hipoxantina	8.19 (si), 8.21 (si)
43	FAPi-adenina	8.35 (si)

* Metabólito não identificado no Chenomix RMN Suite. FAPi: formamidopirimidina. Multiplicidade indicada por: singuleto (si), duplete (du); tripleto (tri), quarteto (qua), quinteto (qui), multiplete (mult) e duplo duplete (ddu). Fonte: O Autor (2023).

A deconvolução espectral foi realizada para obter a concentração individual dos metabólitos pelo espectro de RMN. Os resultados foram normalizados e obtivemos uma estimativa da concentração absoluta dos metabólitos presentes no fígado dos animais, onde posteriormente foi realizada análise multivariada dos dados.

O gráfico de PLS-DA (Figura 5A), indica que houve uma separação entre os quatro grupos: o grupo controle e os três grupos tratados com PRF (20, 40 e 80 mg/kg/dia). Os pontos agrupados indicam que os metabolomas das amostras foram semelhantes, enquanto os pontos dispersos implicam diferenças distintas (Rocha *et al.*, 2020). Dessa forma, as amostras foram mantidas e é mostrada a correlação entre as variáveis (metabólitos) em PC1 e PC2 (Figura 5B), identificando as variáveis significativas responsáveis pela separação entre os grupos. Os parâmetros estatísticos R^2 (0.809) e Q^2 (0.611), mostram que há uma boa correlação nos modelos, indicando alta afinidade e capacidade preditiva. De acordo com o próprio SIMCA, $Q^2 \geq 0,5$ é admitido para uma boa previsibilidade, logo, nossos dados foram

considerados aceitáveis para a qualidade do ajuste em sistemas biológicos ($R^2 \geq 0,7$ e $Q^2 \geq 0,4$) (Jiménez-Contreras *et al.* 2009).

Para uma melhor visualização da variação dos metabólitos entre os grupos tratados e o grupo controle, foi construído o mapa de calor (Figura 6).

Figura 5 - Gráfico de scores das amostras obtido por PLS-DA dos animais tratados com PRF em diferentes concentrações e tratados com NaCl 0,15 M (controle) (A). Gráfico do loadings para o PLS-DA relacionando os pesos da PC1 e PC2 (B).

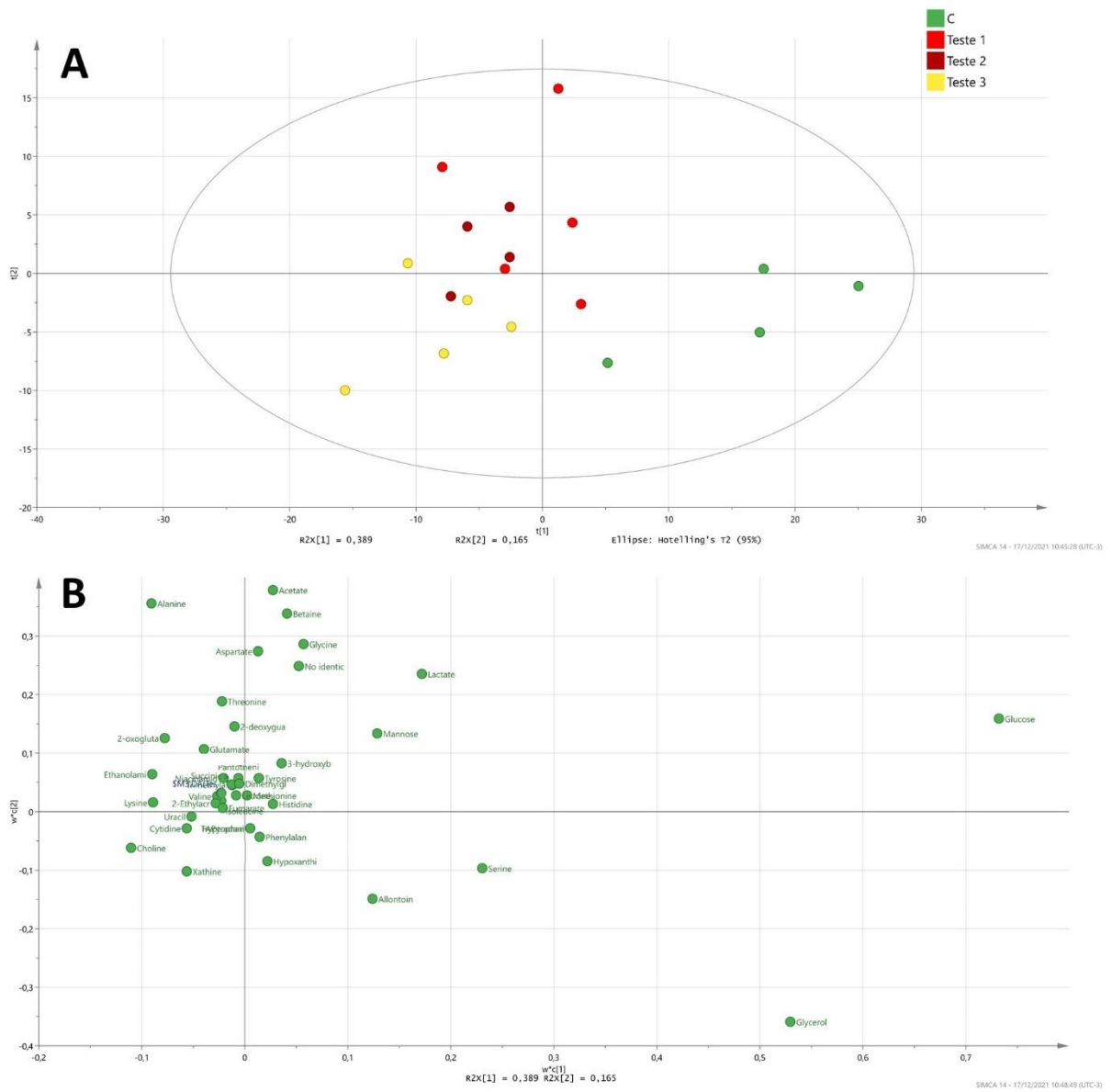
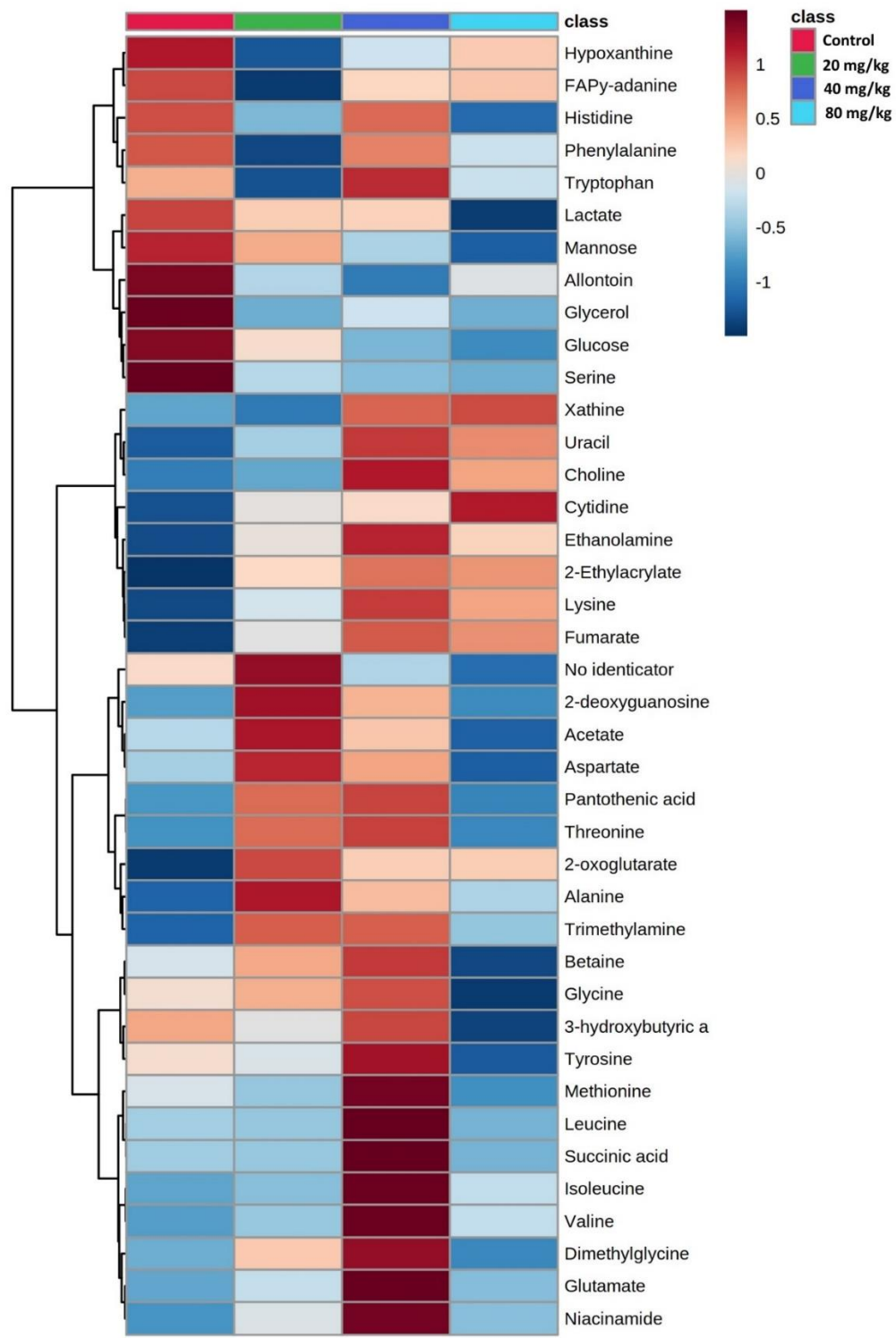


Figura 6 - Dendograma associado ao mapa de calor (heatmap) para os 43 metabólitos. A cor está correlacionada positivamente com intensidade da variação dos metabólitos com vermelho indicando alta intensidade e azul indicando baixa intensidade.



Fonte: O Autor (2023)

A figura 6 evidencia uma diminuição da concentração de glicose e manose nos animais tratados, o que já era esperado devido seu efeito hipoglicemiante. Quando os níveis glicêmicos caem abaixo dos níveis fisiológicos normais, os fatores glicorreguladores são ativados para conter a hipoglicemia principalmente por meio da intensificação da gliconeogênese e glicogenólise hepática e, como consequência, ocorre a insulinemia e as respostas dos hormônios contrarreguladores entram em ação. À medida que as reservas de glicogênio se esgotam, a produção de glicose pela gliconeogênese aumenta (Bavelloni, 2011). Não foram encontrados metabólitos da via glicolítica ou glicogênio hepático na amostra de fígado dos animais, isso aliado ao efeito hipoglicemiante sugere que a gliconeogênese está sendo utilizada para produção de compostos glicídicos a partir de outros compostos como aminoácidos, lactato e piruvato.

O processo da gliconeogênese é energeticamente desfavorável e só ocorre em condições em que ATP e NADH estejam disponíveis. O ATP necessário será obtido por meio da oxidação de ácidos graxos, e a manutenção do equilíbrio NAD^+/NADH é necessária para manter a via ativa; curiosamente observamos que a concentração de lactato nos animais tratados estava diminuída e isso pode ser resultante por um aumento da atividade da lactato desidrogenase que oxida lactato a piruvato por meio da redução de NAD^+ a NADH, sendo essa uma das vias de manutenção do equilíbrio NAD^+/NADH (Alshawi e Agius, 2019).

Uma diminuição da concentração de glicose (Figura 7), interfere diretamente na produção de glicose-6-fosfato que é um intermediário comum a via glicolítica, gliconeogênese, glicogênese e via das pentoses fosfato. Sob as condições hipoglicemiantes já contextualizadas, podemos supor que a via das pentoses-fosfato possa estar diminuída, uma vez que a glicose-6-fosfato estaria sendo deslocada para síntese de glicose. O NADP citosólico é reciclado a NADPH pela via oxidativa da pentose-fosfato principalmente no fígado, sendo essa via necessária para manter relação NADPH/NADP normal. Estando essa

via supostamente suprimida haverá diminuição da produção de NADPH (Chen *et al.*, 2019). Portanto esse quadro metabólico que foi acionado em resposta à hipoglicemia, gerada por PRF, pode explicar a diminuição do balanço redox das glutanionas (GSH/GSSG) (Figuras 3G e 3H), o qual foi observado pelos ensaios de análise do estresse oxidativo, pois necessitam do equilíbrio NADPH/NADP mantido pela via da pentose-fosfato.

Ácidos graxos livres e o glicerol são exemplos de intermediários para produção de energia. Os ácidos graxos normalmente são encontrados ligados ao glicerol, formando os triacilgliceróis. O triacilglicerol do tecido adiposo é quebrado liberando ácidos graxos livres e glicerol. O glicerol é transportado livremente pelo sangue até o fígado, onde pode ser utilizado na gliconeogênese. Os ácidos graxos ligam-se à albumina para serem carreados no plasma e quando absorvidos pelas células hepáticas serão direcionados para beta-oxidação (Nelson e Cox, 2018).

O glicerol hepático nos animais tratados com PRF estava diminuído, esse dado associado a valores de triacilgliceróis e VLDL normais no perfil bioquímico sugere a utilização do glicerol na via da gliconeogênese. Esse deslocamento ocorre por meio da fosforilação do glicerol, pela glicerol quinase, gerando glicerol-3-fosfato que será oxidado á diidroxiacetona fosfato e este último convertido em gliceraldeído-3-fosfato, intermediário da gliconeogênese (Nelson e Cox, 2018).

O acúmulo de ácidos graxos sinaliza a disponibilidade desse metabólito como combustível para a produção de energia. Na matriz mitocondrial os ácidos graxos serão beta-oxidados e produzem Acetil-CoA, o qual terá sua energia conservada em NADH e ATP por meio do ciclo do ácido cítrico, ou então serão deslocados para produção de corpos cetônicos (Vishwanath, 2016). A conversão de ácidos graxos em glicose não é possível pois a reação a piruvato desidrogenase é irreversível e não existe outra rota que possibilite a carboxilação e redução do Acetil-CoA até piruvato (Stacpoole *et al.*, 2017). Em condições de hipoglicemia,

os ácidos graxos serão mobilizados para serem fontes de energia e o excesso de Acetil-CoA será um ativador alostérico das enzimas de síntese de corpos cetônicos. Essa afirmativa explica os níveis aumentados de 3-hidroxiacetil-CoA encontrado nos hepatócitos de indivíduos tratados com PRF. O 3-hidroxiacetil-CoA pode ser utilizado como fonte energética para o cérebro em casos de hipoglicemia, atuando também como neuroprotetor (Pereira *et al.*, 2010).

O Acetil-CoA também é obtido por uma descarboxilação oxidativa do piruvato, produto da ação catalítica da piruvato desidrogenase. Piruvato desidrogenase é um complexo de 3 enzimas que agem sequencialmente e necessitam de 5 coenzimas: o pirofosfato de tiamina (TPP – *thiamine pyrophosphate*), dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD – *flavin adenine dinucleotide*), Coenzima A (CoA), dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD – *nicotinamide adenine dinucleotide*) e lipoato. Coenzima A e NAD tem como precursores o ácido pantotênico e a niacinamida, respectivamente, que são vitaminas essenciais à nutrição humana. Os resultados observados nos indivíduos tratados mostram níveis elevados de niacinamida e ácido pantotênico, sugerindo que o complexo piruvato desidrogenase está com sua atividade aumentada, provavelmente por um aumento da síntese proteica (*up-regulation*) que elevou a necessidade respectivas coenzimas e, portanto, a concentração dessas no citoplasma.

A alimentação rica em proteínas fornece aminoácidos com cadeias laterais com estruturas variadas. Em condições hipoglicêmicas os aminoácidos serão mobilizados para gerarem energia; inicialmente ocorrerão reações de transaminações que removem e transferem o grupo amino de um aminoácido para um alfa-cetoácido específico para formação de outros aminoácidos e bases nitrogenadas, ou o grupo amino pode ser eliminado sob a forma de ureia e o esqueleto carbônico ser oxidado para gerar energia (Santos *et al.*, 2015). A

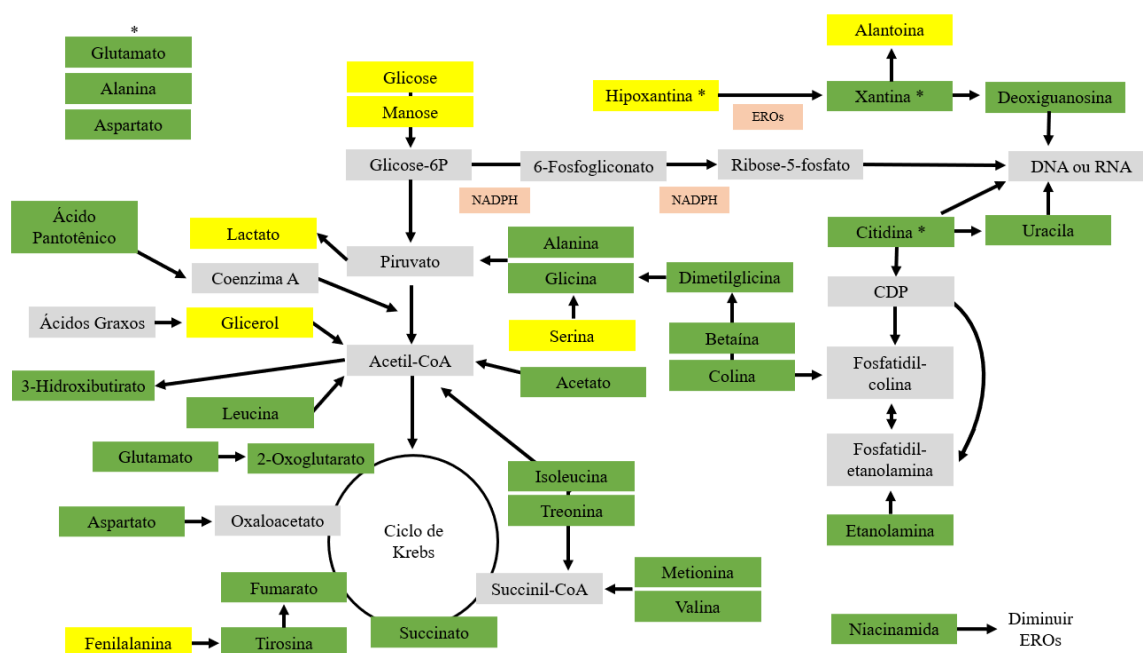
alta concentração de aminoácidos nos indivíduos tratados com a PRF, pode estar refletindo a utilização e direcionamento desses para as vias de produção de energia.

Os aminoácidos provenientes de proteínas de origem alimentar são absorvidos para a sangue e encaminhados ao fígado por meio do sistema porta-hepático. Em caso de hipoglicemia, o glucagon mobiliza e aumenta a captação de aminoácidos no fígado. O fígado é um órgão importante para o metabolismo dos aminoácidos, pois constantemente sintetiza aminoácidos não essenciais para atender as exigências do organismo (Maragon; Melo, 2004). As folhas de *M. oleífera* são ricas em aminoácidos essenciais (Melesse *et al.*, 2012) e foi constatado que a concentração de aminoácidos essenciais estava mais elevada no fígado dos animais tratados com PRF (Figura 6).

Aminoácidos glicogênicos ou glicocetogênicos são convertidos em piruvato ou intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico como fumarato, succinil-CoA e 2-oxaloglutarato que podem sofrer oxidação a oxalacetato. Fumarato é um intermediário do Ciclo do Ácido Cítrico que pode ser obtido pela degradação da tirosina e a baixa concentração de fenilalanina nos animais tratados com PRF, pode indicar que esse aminoácido foi convertido em tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase. Tirosina é o único aminoácido não essencial glicocetogênico que, ao gerar fumarato, libera acetoacetato (Matthews *et al.*, 2007).

Figura 7 – Esquema das principais vias metabólicas

envolvidas.



Fonte: O Autor (2023)

O aumento da concentração de 2-oxoglutarato e glutamato e a não alteração dos níveis de ureia plasmática nos animais tratados com PRF, sugere ativação do processo de transaminação, onde os compostos nitrogenados podem ser utilizados para produzir novos aminoácidos ou novos compostos (Kristensen *et al.*, 2002). O aumento de 2-oxoglutarato pode ser explicado pela gliconeogênese anaplerótica, por ativação das transaminases ligadas ao glutamato no fígado para gerar fonte de carbono derivado do catabolismo de aminoácidos. No fígado, o esqueleto carbônico da glutamina serve como precursor para a gliconeogênese (Alpers, 2006) e aumento fisiológico nos níveis de 2-oxoglutarato já foram observados em leveduras e bactérias (Brauer *et al.*, 2006), no fígado de pombos em jejum (Kaminsky *et al.*, 1982) e em humanos após exercício físico (Brugnara *et al.*, 2012).

Acetato encontrou-se elevado nos animais tratados com PRF. Os esqueletos carbônicos de muitos aminoácidos podem ser utilizados sob a forma de acetato. A quebra de

726 treonina libera glicina e acetaldeído que por sua vez é convertido em acetato pela acetaldeído
727 desidrogenase. Acetato pode ser convertido em acetil-CoA pela enzima acetil-CoA sintetase
728 (Wang *et al.*, 2009) e dessa forma, o aumento de aminoácidos e intermediários do Ciclo do
729 Ácido Cítrico encontrados no metaboloma dos animais pode indicar que esse ciclo foi
730 acionado para a produção de energia.

731 Dietas ricas em proteínas também podem interferir no metabolismo das purinas e
732 pirimidinas. Como mencionado anteriormente, a diminuição da glicose inibe a via das
733 pentoses fosfato e, conseqüentemente, a produção de ribose, requerida para a formação dos
734 ácidos nucleicos pode estar comprometida. O metabolismo de alguns aminoácidos como
735 glutamina, aspartato e alanina podem produzir guanina via deoxiguanosina. A xantina é
736 produto da conversão da hipoxantina pela ação da enzima xantina oxidase que faz parte do
737 metabolismo das purinas (xantosina – deoxiguanosina). Essa mesma enzima, catalisa a
738 oxidação da xantina em ácido úrico, produto final no metabolismo das purinas em humanos.
739 Em alguns mamíferos (como nos ratos), aves e répteis, o ácido úrico é convertido em
740 alantoina pela enzima urato oxidase (Lai *et al.*, 2015). O aumento de xantina e diminuição da
741 hipoxantina nos animais tratados com PRF, pode indicar aumento da atividade da enzima
742 xantina oxidase.

743 A xantina oxidase é uma das responsáveis pela formação extra-mitocondrial de
744 espécies reativas de oxigênio. Os elétrons derivados do substrato no cofator Mo (molibdênio)
745 da xantina oxidase reduzem O_2 no cofator FAD na forma univalente, o que acarreta a geração
746 de ânion superóxido (O_2^-) que, quanto de forma bivalente, forma peróxido de hidrogênio
747 (H_2O_2) (Kelley *et al.*, 2010). Dessa forma, o aumento da peroxidação lipídica detectado nos
748 animais tratados com PRF, como mencionado anteriormente, pode estar relacionado com a
749 produção de EROs pela ação da xantina oxidase.

Níveis elevados de citidina e uracila, são correlacionados a aumento no metabolismo das bases pirimídicas, e o aumento de citidina ocasiona aumento de colina e etanolamina. Difosfato de citidina (CDP) é importante intermediário na formação de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, fosfolipídios de membrana celular e o aumento desses metabólitos no metaboloma de animais tratados com PRF, pode ser devido a degradação oxidativa (Lager *et al.*, 2015) detectado pelos níveis de TBARS no tecido hepático dos animais tratados.

Vale salientar que os níveis de colina e betaína estão elevados nos animais tratados com PRF. A colina e a betaína são obtidas da dieta ou por síntese “de novo” nos tecidos (Ueland, 2011). No fígado, a betaína é obtida pela oxidação da colina é convertida em betaína aldeído por ação da enzima colina-desidrogenase e a betaína aldeído é posteriormente oxidado a nível mitocondrial em betaína pela betaína aldeído-desidrogenase (Li *et al.*, 1986). Dessa forma, a colina está relacionada ao metabolismo do monocarbono. A colina é sintetizada de novo a partir da catalise da fosfatidiletanolamina pela enzima fosfatidiletanolamina-N-metiltransferase (PEMT) (Ueland, 2011).

A betaína é conhecida por melhorar os efeitos adversos do álcool e gordura no fígado (Barak *et al.*, 1997). A betaína também serve como uma fonte de monocarbono quando outras fontes se tornam limitadas (folato e metionina, por exemplo). Além disso, uma suplementação de betaína e colina tem efeito redutor nos níveis de homocisteína (Olthof e Verhoef, 2005).

Para verificar as suposições levantadas nesse trabalho, realizamos uma correlação entre os metabólitos encontrados na amostra polar do fígado dos ratos com os indicadores do estresse oxidativo. Os resultados são observados em um mapa de calor (Figura 8).

Na figura 8 podemos observar uma forte correlação da relação GSH/GSSG com as concentrações de glicose, manose, glicerol, alantoina e o aminoácido serina. Como mencionado anteriormente, glicose e manose são metabólitos envolvidos na via das pentoses-fostato. O glicerol é produto da quebra de triacilgliceróis, o qual pode ser utilizado como

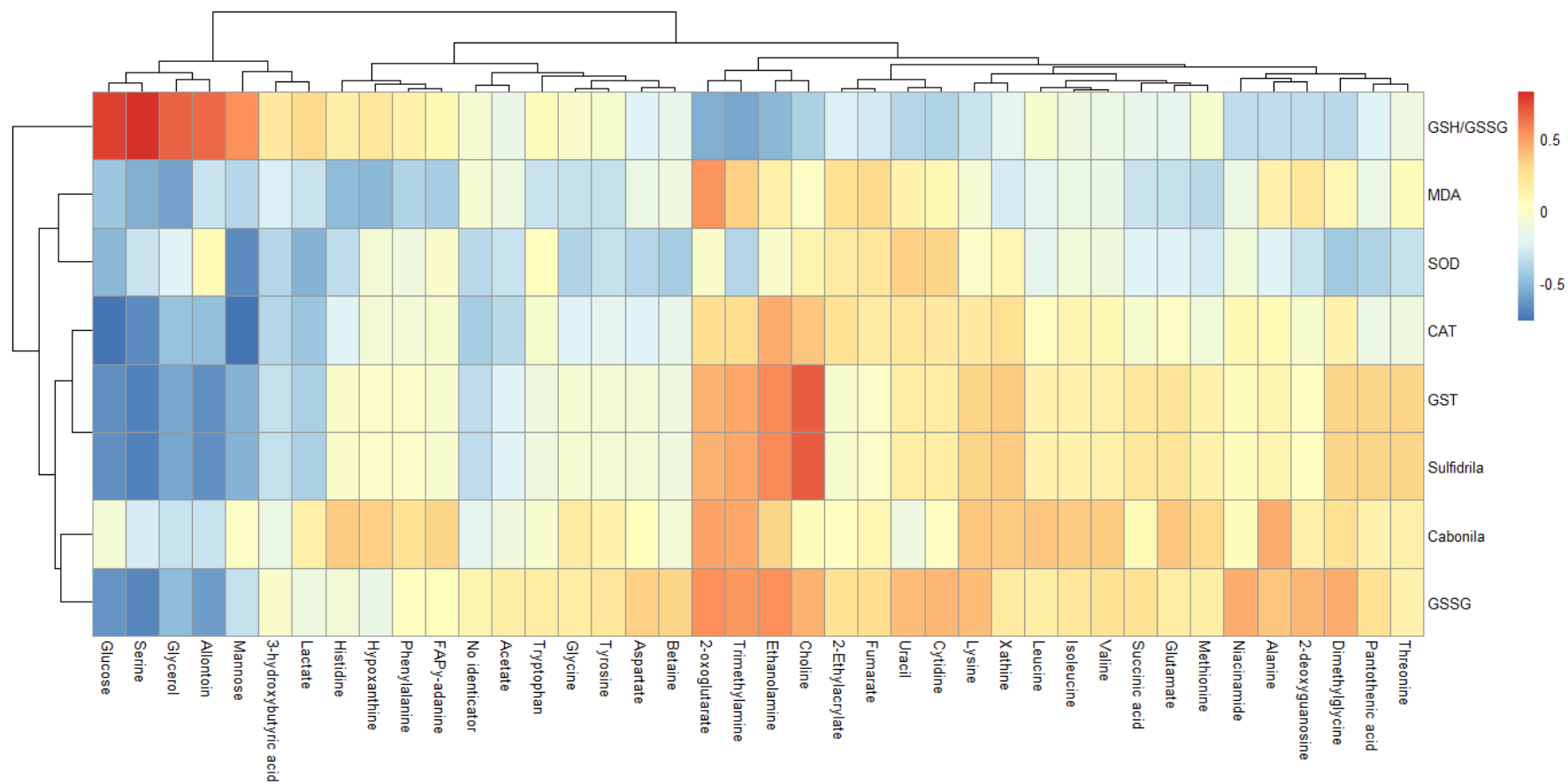
intermediário no processo da gliconeogênese. E, conseqüentemente, envolvidos na redução de NADP à NADPH. A enzima glutathione redutase (GR) é responsável pela redução de GSSG em GSH, usando uma molécula de NADPH como doadora de elétrons (Couto; Wood; Barber, 2016). Com a diminuição de NADPH a atividade da enzima é comprometida, podendo causar dano oxidativo tecidual como foi relatado.

Kristal *et al.* (1999), relataram que aumento simultâneo nos níveis de xantina e o ácido pode ocorrer em quadros de disfunção mitocondrial progressiva, como no diabetes tipo 1. Como a alantoina é o produto final da degradação das purinas e nos animais tratados com PRF esse metabólito estava diminuído, pode-se deduzir que PRF promova alteração a nível mitocondrial. Adicionalmente, o aumento de xantina ocorreu pela ação da enzima xantina oxidase, elevando a produção de H_2O_2 , como mencionamos anteriormente.

A serina é um aminoácido não essencial capaz de melhorar a expressão gênica da glutathione peroxidase e está envolvida na produção da glutathione reduzida como precursor da glicina, um dos aminoácidos que forma a glutathione (Zhou *et al.*, 2017). Dessa forma, a diminuição de serina provavelmente se deu pela síntese de glicina na tentativa de aumentar a produção da glutathione (Maddocks *et al.*, 2013).

Uma outra forte correlação é observada entre a colina, sulfidrilas e glutathione S-Transferase (GST). Em ratos foi constatado que a colina dietética reduziu o produto de oxidação de proteínas em mitocôndrias do cérebro (Pacelli *et al.*, 2010), corroborando com os nossos achados. Em ratos, o fígado é considerado o órgão mais sensível a alterações nos níveis de colina e deficiência de colina, leva as mitocôndrias à dano oxidativo. Em ratos, a deficiência de colina diminuiu as concentrações hepáticas de colina e de metabólitos de colina (Zeisel; Blustajn, 1994) e, portanto, é provável que os níveis elevados de colina encontrados nos animais tratados com PRF, elevou a produção de GST para sanar o dano oxidativo.

Figura 8 - Correlação dos metabólitos encontrados na amostra polar do fígado dos ratos com biomarcadores do estresse oxidativo.



Fonte: O Autor (2023)

803 **Conclusão**

804 PRF não desencadeou mudança comportamental e não foi agente antinutricional nas
805 concentrações de 20, 40 e 80 mg/kg em aplicações diárias por 28 dias. PRF não desencadeou
806 alterações hematológicas, homeostase, eletrólitos ou histopatológicas. PRF apresentou efeito
807 hipoglicemiante. PRF aumentou os níveis de TBARS, sem alterar carbonilas ou sufidrilas, o
808 que ocasionou a aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase
809 (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) nas maiores concentrações (40 e 80 mg/kg/dia). PRF
810 também diminuiu a correlação dos antioxidantes proteicos não enzimáticos (GSH/GSSG) em
811 todas as concentrações.

812 PRF atuou como uma substância hipoglicemiante que hipoteticamente atua na
813 diminuição da captação da glicose pelos enterócitos. Esse efeito causou depleção dos níveis
814 de glicose e glicogênio hepático que levou a ativação das rotas de oxidação de ácidos graxos e
815 biossíntese de corpos cetônicos, além de ativação da gliconeogênese e utilização de
816 aminoácidos como percussores de rotas glicocetogênicas, uma vez que foi observado aumento
817 dos intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico. PRF também alterou o equilíbrio redox, uma
818 vez que os baixos níveis de glicose podem afetar negativamente a síntese do NADPH pela via
819 da pentose-fosfato, diminuindo a eficiência do sistema antioxidante da glutatona.

820

821 **Agradecimentos**

822

823 Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
824 Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa (LCBBC, PMGP e THN). Também
825 agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
826 (FACEPE), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao
827 Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) pelo apoio financeiro. RRV Alves

gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa de pós-graduação. Agradecemos a Carlos Eduardo Sales da Silva pela assistência técnica.

Referências

- AEBI, H. Catalase. In: **Methods of enzymatic analysis**. Academic press, 1974. p. 673-684.
- AJAYI, T. O. *et al.* Toxicological evaluation of *Moringa oleifera* Lam seeds and leaves in Wistar rats. **Pharmacogn. Commn**, 6(2), 100-111, 2016.
- ALATORRE-CRUZ, J. M. *et al.* Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. **Toxicology reports**, 5, 56-64, 2018.
- ALPERS, D. H. Glutamine: do the data support the cause for glutamine supplementation in humans. **Gastroenterology**, v. 130, n. 2, p. S106-S116, 2006.
- ALSHAWI, A.; AGIUS, L. Low metformin causes a more oxidized mitochondrial NADH/NAD redox state in hepatocytes and inhibits gluconeogenesis by a redox-independent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 8, p. 2839-5691, 2019.
- AN, F. *et al.* Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 11, p. 724-732, 2015.
- ANWAR, F. *et al.* Physico-chemical characteristics of *Moringa oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. **Pak. J. Bot**, v. 39, n. 5, p. 1443-1453, 2007.
- ASANUMA-DATE, K. *et al.* Functional regulation of sugar assimilation by N-glycan-specific interaction of pancreatic α -amylase with glycoproteins of duodenal brush

- border membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 27, p. 23104-23118, 2012.
- ASIEDU-GYEKYE, I. J. *et al.* Micro-and macroelemental composition and safety evaluation of the nutraceutical *Moringa oleifera* leaves. **Journal of Toxicology**, 2014.
- AWASTHI, Y. C. *et al.* Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 235-243, 2017.
- AWODELE, O. *et al.* Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae). **Journal of ethnopharmacology**, 139(2), 330-336, 2012.
- BARAK, A. J. *et al.* The effect of betaine in reversing alcoholic steatosis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 21, n. 6, p. 1100-1102, 1997.
- BAVELLONI, P. L. O papel do glucagon na reversão da crise hipoglicêmica. **UNINGÁ Review**, v. 5, n. 3, 2011.
- BECKONERT, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692, 2007.
- BELLOMO, R. *et al.* Acute kidney injury. **The Lancet**, 380(9843), 756-766, 2012.
- BELO, M. F. R.; SOUZA, A. L. F. Estudo cinético da enzima catalase (EC 1.11. 1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAUER, M. J. *et al.* Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 51, p. 19302-19307, 2006.

- 877 BRUGNARA, L. *et al.* Metabolomics approach for analyzing the effects of exercise in
878 subjects with type 1 diabetes mellitus. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40600, 2012.
- 879 BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**.
880 Academic press, 1978. p. 302-310.
- 881 CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of Birds. In: Thrall, M.A. **Veterinary Hematology**
882 **and Clinical Chemistry**. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, p. 479-492,
883 2004.
- 884 CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative
885 pplications. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.
- 886 CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A
887 review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539,
888 2002.
- 889 CHEN, L. *et al.* NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports
890 folate metabolism. **Nature metabolism**, v. 1, n. 3, p. 404-415, 2019.
- 891 COGO, A. J. D. *et al.* Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de
892 impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.
- 893 COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes
894 on cellular redox homoeostasis network. **Free radical biology and medicine**, v. 95, p.
895 27-42, 2016.
- 896 DAFFODIL, E. D. *et al.* Nutritional and antinutritional assessment of *Mucuna pruriens* (L.)
897 DC var. utilis (Wall ex. Wight) Bak. Ex Burck and *Mucuna deeringiana* (Bort) Merril:
898 An underutilized tribal pulse. **International Food Research Journal**, 23(4), 1501,
899 2016.

- 900 DENNY, K. H.; STEWART, R. K. Acute, subacute, subchronic, and chronic general toxicity
901 testing for preclinical drug development. *In: A **Comprehensive Guide to Toxicology***
902 **in Nonclinical Drug Development**. Academic Press, p. 109-127, 2017.
- 903 ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82,
904 n. 1, p. 70-77, 1959.
- 905 ESTRADA, C. P.; JIMÉNEZ, F. C.; PALMA, L. G. V. Protein quality in the diet of infants
906 with severe malnutrition. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 90, n. 1, p. 59-69, 2018.
- 907 FERREIRA, D. J. S. *et al.* Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in
908 brainstem of weaned rats: immediate response to maternal protein restriction. **Brain**
909 **research**, v. 1642, p. 553-561, 2016.
- 910 FLOHE, L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. **Biochimica et Biophysica Acta**
911 **(BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3139-3142, 2013.
- 912 GOPALAKRISHNAN, L. *et al.* *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its
913 medicinal application. **Food science and human wellness**, 5(2), p. 49-56, 2016
- 914 GREAVES, P. Liver and pancreas. **Histopathology of Preclinical Toxicity Studies**, 457-
915 503, 2007.
- 916 HABIG, W. H. *et al.* Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid
917 formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- 918 HISSIN, P. J.; HILF, P. L. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced
919 glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214-226, 1976.
- 920 IGWEBUIKE, U. M. *et al.* Effects of Nigerian Qua Iboe Brent crude oil on rat spleen and
921 haematological parameters. **Veterinarski arhiv**, 77(3), 247, 2007.
- 922 JADHAV, R.; PUCHCHAKAYALA, G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of
923 flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide
924 induced type 2 diabetic rats. **Group**, v. 1, p. 100g, 2012.

- 925 JANEWAY, C. A. **Immunobiology: the immune system in health and disease**, 2005.
- 926 JIMÉNEZ-CONTRERAS, E. *et al.* Response Surface Methodology and its application in
927 evaluating scientific activity. **Scientometrics**, v. 79, n. 1, p. 201-218, 2009.
- 928 JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological
929 significance. **Methods in enzymology**, v. 348, p. 93-112, 2002
- 930 KELLEY, E. E. *et al.* Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine
931 oxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 4, p. 493-498, 2010.
- 932 KOSTEKLI, M.; KARAKAYA, K. G. Protease inhibitors in various flours and breads: Effect
933 of fermentation, baking and in vitro digestion on trypsin and chymotrypsin inhibitory
934 activities. **Food chemistry**, 224, 62-68, 2017.
- 935 KRISTAL, B. S. *et al.* Purine catabolism: links to mitochondrial respiration and antioxidant
936 defenses. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 370, n. 1, p. 22-33, 1999.
- 937 KRISTENSEN, N. B. *et al.* Absorption and metabolism of α -ketoglutarate in growing
938 pigs. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 86, n. 7-8, p. 239-245,
939 2002.
- 940 LAGER, I. *et al.* Novel reactions in acyl editing of phosphatidylcholine by
941 lysophosphatidylcholine transacylase (LPCT) and acyl-CoA: glycerophosphocholine
942 acyltransferase (GPCAT) activities in microsomal preparations of plant tissues. **Planta**,
943 v. 241, n. 2, p. 347-358, 2015.
- 944 LAI, Y. S. *et al.* Mass-spectrometry-based serum metabolomics of a C57BL/6J mouse model
945 of high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease development. **Journal of**
946 **agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7873-7884, 2015.
- 947 LEANDRO, Y. A. S. *et al.* Uso de plantas medicinais nos cuidados de saúde dos moradores
948 de assentamento no município de Anapu, Pará, Brasil. **Biodiversidade**, 16(2), 2017.

- 949 LI, G. *et al.* Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) expression and betaine production in
950 Sugarbeet cultivars with different tolerances to drought stress. **Sugar Tech**, v. 18, n. 4,
951 p. 420-423, 2016.
- 952 LIMA, L. M. *et al.* Comparative digestibility and the inhibition of mammalian digestive
953 enzymes from mature and immature cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds.
954 **Food Control**. 15, 107-110, 2004.
- 955 LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of**
956 **biological chemistry**, 193, 265-275, 1951.
- 957 MA, Z. F. *et al.* Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa*
958 *oleifera*) as a potential functional food. **South African Journal of Botany**, 129, 40-46,
959 2020.
- 960 MADDOCKS, O. D. K. *et al.* Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic
961 remodelling in cancer cells. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 542-546, 2013.
- 962 MARANGON, A. F. C.; MELO, R. A. Consumo de proteínas e ganho de massa
963 muscular. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 297-306, 2004.
- 964 MATTHEWS, D. E. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. **The**
965 **Journal of nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1549S-1555S, 2007.
- 966 MELESSE, A. *et al.* Effects of elevation and season on nutrient composition of leaves and
967 green pods of *Moringa stenopetala* and *Moringa oleifera*. **Agroforestry systems**, v. 86,
968 n. 3, p. 505-518, 2012.
- 969 MISRA, H. P.; FRIDOVICH, E. P. The role of superoxide anion in the autoxidation of
970 epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological**
971 **chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- 972 MOYO, B. *et al.* Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.)
973 leaves. **African Journal of Biotechnology**, 10(60), 12925-12933, 2011.

- 974 MUNE, M. *et al.* A comparison on the nutritional quality of proteins from *Moringa oleifera*
975 leaves and seeds. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1213618, 2016.
- 976 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora,
977 2018.
- 978 OECD. **Guideline for testing of chemicals**, 2008. Repeated dose 28-day oral toxicity study
979 in rodents, 2008.
- 980 OLTHOF, M. R.; VERHOEF, P. Effects of betaine intake on plasma homocysteine
981 concentrations and consequences for health. **Current drug metabolism**, v. 6, n. 1, p.
982 15-22, 2005.
- 983 PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two
984 lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Applied biochemistry and**
985 **biotechnology**, 36(2), 113-118, 1992.
- 986 PACELLI, C. *et al.* Dietary choline deprivation impairs rat brain mitochondrial function and
987 behavioral phenotype. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 6, p. 1072-1079, 2010.
- 988 PAULA, P. C. *et al.* A protein isolate from *Moringa oleifera* leaves has hypoglycemic and
989 antioxidant effects in alloxan-induced diabetic mice. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 271,
990 2017.
- 991 PEREIRA, E. S. *et al.* Dieta cetogênica: como o uso de uma dieta pode interferir em
992 mecanismos neuropatológicos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 78-
993 82, 2010.
- 994 PONTUAL, E. V. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and
995 acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and**
996 **Physiology**, 79(3), 135-152, 2012.

- 997 RAHMAN, M. F. *et al.* Effects of Vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine
 998 aminotransferase profiles in a subchronic study with rats. **Human & experimental**
 999 **toxicology**, 20(5), 243-249, 2001.
- 1000 RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical
 1001 parameters. **Food and chemical toxicology**, 45(9), 1551-1557, 2007.
- 1002 REDONDO, M. J.; ALVAREZ-PELLITERO, P. The effect of lectins on the attachment and
 1003 invasion of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Psetta maxima* L.)
 1004 intestinal epithelium *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 577-581,
 1005 2010
- 1006 ROCHA, J. R. da *et al.* Evaluation of the metabolic production of the endophytic fungus
 1007 *Phomopsis* sp. **Química Nova**, v. 43, p. 314-318, 2020.
- 1008 SANTOS, L. *et al.* Desordens do metabolismo de aminoácidos e intermediários do ciclo da
 1009 ureia: uma revisão. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 4, n. 2, 2015.
- 1010 SCRIMGEOUR, K. G. *et al.* Principles of biochemistry. **Pearson**, 2006.
- 1011 SHAN, X. *et al.* Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology &**
 1012 **therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.
- 1013 SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e
 1014 lectinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 3-9, 2000.
- 1015 SINGH, D. *et al.* Evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of *Moringa*
 1016 *oleifera* Lam. leaves in carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Antioxidants**, 3(3), 569-
 1017 591, 2014.
- 1018 STACPOOLE, P. W. Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase complex/pyruvate
 1019 dehydrogenase kinase (PDC/PDK) axis in cancer. **JNCI: Journal of the National**
 1020 **Cancer Institute**, v. 109, n. 11, 2017.

- 1021 SUNARWIDHI, A. L.; SUDARSONO, S.; NUGROHO, A. E. Hypoglycemic effect of
 1022 combination of *Azadirachta indica* A. Juss. and *Gynura procumbens* (Lour.) Merr.
 1023 ethanolic extracts standardized by rutin and quercetin in alloxan-induced hyperglycemic
 1024 rats. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. Suppl 2, p. 613, 2014.
- 1025 TAHRAOUI, A. *et al.* Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of
 1026 *Centaureum erythraea* in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, 132(1), 48-55,
 1027 2010.
- 1028 TEIXEIRA, E. M. B. *et al.* Chemical characteristics and fractionation of proteins from
 1029 *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Food chemistry**, 147, 51-54, 2014.
- 1030 TRACHOOTHAM, D. *et al.* Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & redox**
 1031 **signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.
- 1032 UELAND, P. M. Choline and betaine in health and disease. **Journal of inherited metabolic**
 1033 **disease**, v. 34, n. 1, p. 3-15, 2011.
- 1034 UMA, N. *et al.* *Moringa oleifera* enhances liver antioxidant status via elevation of antioxidant
 1035 enzymes activity and counteracts paracetamol-induced hepatotoxicity. **Malaysian**
 1036 **journal of nutrition**, 16(2), 2010.
- 1037 UNUOFIN, J. O. *et al.* Evaluation of acute and subacute toxicity of whole-plant aqueous
 1038 extract of *Vernonia mespilifolia* Less. in Wistar rats. **Journal of integrative medicine**,
 1039 16(5), p. 335-341, 2018.
- 1040 VISHWANATH, V. A. Fatty acid beta-oxidation disorders: a brief review. **Annals of**
 1041 **neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 51-55, 2016.
- 1042 WANG, J. *et al.* Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine
 1043 catabolism. **Science**, v. 325, n. 5939, p. 435-439, 2009.
- 1044 XIAO, X. *et al.* NMR-based metabolomics analysis of liver from C57BL/6 mouse exposed to
 1045 ionizing radiation. **Radiation research**, v. 188, n. 1, p. 44-55, 2017.

- 1046 ZANATTA, A. *et al.* Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-
1047 methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex
1048 of young rats. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 33, n. 1, p. 137-146, 2013.
- 1049 ZEISEL, S. H.; BLUSZTAJN, J. K. Choline and human nutrition. **Annual review of**
1050 **nutrition**, v. 14, n. 1, p. 269-296, 1994.
- 1051 ZHOU, X. *et al.* Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and
1052 methionine cycle in mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 11, p.
1053 1700262, 2017.
- 1054 ZITKA, O. *et al.* Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress
1055 in paediatric tumour patients. **Oncology letters**, v. 4, n. 6, p. 1247-1253, 2012.

4 CONCLUSÕES

- Lectina, inibidor de tripsina, os flavonoides rutina e vitexina e ferro foram identificados no extrato salino (LE) e fração rica em proteína (PRF) obtidos de folhas de *M. oleifera*;
- LE e PRF não apresentaram toxicidade aguda após administração oral de única dose de 2000 mg/kg, em 14 dias. Foram observadas alterações comportamentais em ambos os tratamentos. Já aumento da ALT e infiltrado leucocitário hepático foi detectado apenas nos animais tratados com LE. LE e PRF não foram citotóxicos, hemolíticos ou genotóxicos;
- PRF não apresentou toxicidade subaguda para os animais avaliados após administração oral em doses repetidas de 20, 40 e 80mg/kg/dia, durante 28 dias. Os dados mostraram que PRF: a) não promoveu alterações comportamentais e nos parâmetros hematológicos, de hemostasia, eletrólitos e histopatológicos; b) PRF foi agente hipoglicemiante; c) elevou os níveis de TBARS no fígado dos animais tratados sem causar danos oxidativos em proteínas (carbonila); d) elevou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) nas maiores concentrações testadas, em resposta ao estresse oxidativo e; e) diminuiu a relação não enzimáticas glutathione reduzida e glutathione oxidada em todas as concentrações testadas;
- 43 metabólitos polares foram identificados no fígado de animais tratados com PRF. O estudo revelou que PRF foi fonte de aminoácidos essenciais, elevou a produção de radicais livres extra-mitochondriais, ocasionando dano oxidativo, comprometeu a produção de coenzimas reduzidas (NADPH), ativou a via da gliconeogênese e o Ciclo do Ácido Cítrico.

REFERÊNCIAS

- ACHEAMPONG, M. A. *et al.* Kinetics modelling of Cu (II) biosorption on to coconut shell and *Moringa oleifera* seeds from tropical regions. **Environmental technology**, v. 33, n. 4, p. 409-417, 2012.
- AGRA-NETO, A. C. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.
- AJA, P. M. *et al.* Chemical constituents of *Moringa oleifera* leaves and seeds from Abakaliki, Nigeria. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 310-321, 2014.
- AJAYI, T. O.; MOODY, J. O.; AKINTAYO, C. H. Toxicological evaluation of *Moringa oleifera* Lam seeds and leaves in Wistar rats. **Pharmacogn. Commn**, v. 6, n. 2, p. 100-111, 2016.
- AL-ASMARI, A. K. *et al.* *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. **PloS one**, v. 10, n. 8, 2015.
- ALBINATI, A. C. L. *et al.* Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 621-627, 2009.
- ALKAZEMI, D. *et al.* Alterations in glutathione redox homeostasis among adolescents with obesity and anemia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- ALVES, A. C. S. **Tratamento com fluoxetina em ratos neonatos: efeitos na bioenergetica mitocondrial e estresse oxidativo no fígado de ratos adultos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2017
- ALVES, R. R. V. *et al.* Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.
- ANWAR, F. *et al.* *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.

ARAÚJO, L. C. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.

ARAÚJO, G. L. *et al.* Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55-62, 2014.

ASARE, G. A. *et al.* Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 265-272, 2012.

AUDI, J. *et al.* Ricin poisoning: a comprehensive review. **Jama**, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

AWODELE, O. *et al.* Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 330-336, 2012.

BALLERSTADT, R. *et al.* Concanavalin A for in vivo glucose sensing: a biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 2, p. 275-284, 2006.

BARROS, M. C. *et al.* *Moringa oleifera* Toxicology: An Overview. Chapter 2. **Moringa oleifera Properties, Applications and Health Effects. 2021.**

BEDEKAR, P. A. *et al.* *Moringa oleifera*-mediated coagulation of textile wastewater and its biodegradation using novel consortium-BBA grown on agricultural waste substratum. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 20963-20976, 2016.

BELO, M. R. F.; SOUZA, A. L. F. Estudo cinético da enzima catalase (EC 1.11. 1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, 2016.

BENEVIDES, C. M. *et al.* Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BERKOVICH, L. *et al.* *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 212, 2013.

BLASI, F. *et al.* Seasonal variations in antioxidant compounds of *Olea europaea* leaves collected from different Italian cultivars. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, 2016.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* *Vibrio* spp. from *Macrobrachium amazonicum* prawn farming are inhibited by *Moringa oleifera* extracts. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 11, p. 919-922, 2015.

CÁCERES, A. *et al.* Pharmacologie properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 233-237, 1992.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free radical biology and medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CÂMARA, B. B. *et al.* Caracterização físico-química, toxicológica e nutricional das folhas da *Moringa oleifera* Lam secas e in natura. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 11, p. 178111450, 2019.

CARVALHO, K. A. *et al.* Avaliação do uso de sais na precipitação de uma proteína empregada como agente antiviral. 2015.

CARVALHO, R. B. F. **Desenvolvimento tecnológico de um complexo de inclusão do nerolidol com ciclodextrina e avaliação de propriedades farmacológicas.** 2017.

CARVALHO, D. M. A. *et al.* **Revisão metodológica: influência de fatores ambientais e genéticos no perfil comportamental de ratos das linhagens isogênicas Lewis (LEW) e Spontaneously Hypertensive Rats (SHR).** 2020. ufsc

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL-FILHO, V. Produtos Naturais e Sintéticos com potencial terapêutico: 15 anos de estudos realizados no núcleo de investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/UNIVALI. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 4, n. 02, p. 6-23, 2013.

CHANG, R. **Físico-Química:- Para as Ciências Químicas e Biológicas.** AMGH Editora, 2009.

CHAPMAN, K. L. *et al.* Pharmaceutical toxicology: designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 88-103, 2013.

CHEN, D. Q. *et al.* Metabolomic application in toxicity evaluation and toxicological biomarker identification of natural product. **Chemico-biological interactions**, v. 252, p. 114-130, 2016.

CHOUDHARY, M. K. *et al.* Assessment of the antiulcer potential of *Moringa oleifera* root-bark extract in rats. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 6, n. 4, p. 214-220, 2013.

CHUMARK, P. *et al.* The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 439-446, 2008.

COELHO, J. S. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

CORIOLO, M. C. *et al.* Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 198-205, 2020.

CORREIA, F. J. *et al.* **O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos.** UFSC, 2015.

CROWELL, A. M. J. *et al.* Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica chimica acta**, v. 796, p. 48-54, 2013.

CSÁKY, I.; FEKETE, S. Soybean: feed quality and safety. Part 1: biologically active components. A review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 3, p. 299-313, 2004.

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** Dissertação. Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia. Universidade Federal do Ceará, 2006.

DALUKDENIYA, D. A. C. K. *et al.* Antimicrobial activity of different extracts of leaves bark and roots of *Moringa oleifera* (Lam). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 687-691, 2016.

DAS, N. *et al.* *Moringa oleifera* Lam. leaf extract prevents early liver injury and restores antioxidant status in mice fed with high-fat diet. 2012.

DENNY, K. H.; STEWART, C. W. Acute, subacute, subchronic, and chronic general toxicity testing for preclinical drug development. In: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. Academic Press, 2017.

EL-HADARY, A. E.; RAMADAN, M. F. Antioxidant traits and protective impact of *Moringa oleifera* leaf extract against diclofenac sodium-induced liver toxicity in rats. **Journal of food biochemistry**, v. 43, n. 2, p. e12704, 2019.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for life Journal**, v. 1, n. 5, p. 1-15, 2005.

FALASCA, S.; BERNABÉ, M. A. **Potenciales usos y delimitación del área de cultivo de *Moringa oleifera* en Argentina**. 2008.

FENTON, H. J. H. LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, v. 65, n. 0, p. 899-910, 1894.

FERNANDES, C. P. M. *et al.* Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 1, p. 91-104, 2016.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, R. S. *et al.* Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 2, p. 186-192, 2011.

FIGUEIRA, T. R. *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029-2074, 2013.

FREITAS, J. H. E. S. *et al.* Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, p. 133-141, 2016.

FURBEE, R. B. *et al.* Hepatotoxicity associated with herbal products. **Clinics in laboratory medicine**, v. 26, n. 1, p. 227-241, 2006.

GALLÃO, M. I. *et al.* Chemical and structural evaluation of moringa seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 106, 2006.

GHEBREMICHAEL, K. A. *et al.* A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water research**, v. 39, n. 11, p. 2338-2344, 2005.

GIFONI, J. M. *et al.* A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, p. 406-415, 2012.

GOLDANSAZ, S. A. *et al.* Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177675, 2017.

GULATI, O. P. Pycnogenol® in metabolic syndrome and related disorders. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 949-968, 2015.

GUO, P. *et al.* NMR-based metabolomics approach to study the chronic toxicity of crude ricin from castor bean kernels on rats. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 9, p. 2426-2440, 2014.

HABECK, T. H. **Prospecção química e biológica do fungo endofítico Camarops sp. isolado de Alibertia macrophylla**. 2012.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences**, v. 147, n. 861, p. 332-351, 1934.

HUANG, G. J. *et al.* Protective effect of antrosterol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 709-716, 2012.

HWANG, Y. H. *et al.* *In vitro* and *in vivo* genotoxicity assessment of *Aristolochia manshuriensis* Kom. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

ILLSINGER, S. *et al.* Preeclampsia and HELLP syndrome: impaired mitochondrial function in umbilical endothelial cells. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 3, p. 219-226, 2010.

JAFFE, W. G. Über phytotoxine aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*). **Arzneimittel Forsch**, v. 10, p. 1012, 1960.

JAISWAL, D. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 392-396, 2009.

JOSHI, A. L. Studies in proteins of double bean (*P. lunatus*) with special reference to its hemagglutinins. **Toxicon**, v. 10, p. 89-91, 1972.

KARADI, R. V. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 306-311, 2006.

KATRE, U. V. *et al.* Structure–activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 203-207, 2008.

KIEMLE, D. J.; SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identification spectrométrique de composés organiques-3ème édition**. De Boeck Supérieur, 2016.

KIM, Y. S. *et al.* Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 9, n. 15, p. 1479-1492, 2009.

KIM, Y. S. *et al.* A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from *Moringa oleifera* Lam. seeds in rats. **Toxicology reports**, v. 5, p. 418-426, 2018.

KINI, S. G. *et al.* Morintides: cargo-free chitin-binding peptides from *Moringa oleifera*. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 68, 2017.

KNUDSEN, T. B. *et al.* FutureTox II: *in vitro* data and *in silico* models for predictive toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 143, n. 2, p. 256-267, 2015.

KPEMISSI, M. *et al.* Acute and subchronic oral toxicity assessments of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in Wistar rats. **Toxicology reports**, v. 7, p. 162-168, 2020.

KUETE, V. *et al.* Mutagenicity and carcinogenicity of African medicinal plants. In: **Toxicological survey of African medicinal Plants**. Elsevier. p. 277-322, 2014.

LAI, T. Y. *et al.* Taohe Chengqi Tang ameliorates acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. **Zhong xi yi jie he xue bao= Journal of Chinese integrative medicine**, v. 8, n. 1, p. 49-55, 2010.

LI, W. *et al.* Experimental and theoretical investigation of the adsorption behaviour of new triazole derivatives as inhibitors for mild steel corrosion in acid media. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 22, p. 6386-6394, 2007.

LIANG, Q. *et al.* Nephrotoxicity study of Aristolochia fangchi in rats by metabonomics. **Zhong xi yi jie he xue bao= Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 7, n. 8, p. 746-752, 2009.

LIENER, I. E.; PALLANSCH, M. J. Purification of a toxic substance from defatted soy bean flour. **Journal of Biological Chemistry**, v. 197, n. 1, p. 29-36, 1952.

LIENER, I. E.; ROSE, J. E. Say In, a toxic protein from the soybean **Immunochemical** properties. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 83: 539–544. 1953.

LIMA, A. P. M. *et al.* Avaliação da toxicidade oral aguda do extrato aquoso de *Ssyzygium jambolanum*–jambolão em camundongos. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 5, 2019.

LIN, M. *et al.* Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. **Journal of functional foods**, v. 47, p. 469-479, 2018.

LOMBARDI, G. *et al.* Phenol composition and antioxidant capacity of red wines produced in Central Italy changes after one-year storage. **J. Appl. Bot. Food Qual**, v. 90, p. 197-204, 2017.

LUZ, L. A. *et al.* Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 44, p. 94-99, 2017.

MA, C. *et al.* Metabonomic study of biochemical changes in the urine of Morning Glory Seed treated rat. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p. 559-566, 2010.

MA, Z. F. *et al.* Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 40-46, 2020.

MACAMBIRA, G. M. *et al.* Caracterização nutricional das folhas de *Moringa oleifera* (MOL) para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 570-578, 2018.

MANUWA, S. I.; SEDARA, A. M.; TOLA, F. A. Design, Fabrication and Performance Evaluation of *Moringa oleifera* Dried Leaves Pulverizer. **Journal of Agriculture and Food Research**, p. 100034, 2020.

MARACAJÁ, P. B. *et al.* Efeito tóxico do extrato de flores de *Moringa oleifera* L. para abelhas *Apis mellifera* africanizadas. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 6, n. 3, p. 33-37, 2010.

MARIAM, S. H. S. *et al.* Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 144, p. 133-138, 2015.

MAZUMDER, U. K. *et al.* Evaluation of hematological and hepatorenal functions of methanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. root treated mice. 1999.

MENDES, M. M. P. G.; JESUS SOUZA, C. S. A. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde-RSF**, v. 4, n. 2, 2017

MERCIER, K. A. *et al.* A metabolomics pilot study on desmoid tumors and novel drug candidates. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

MIYAKE, K. *et al.* Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity. **PloS one**, v. 2, n. 8, p. e687, 2007.

MOODLEY, I. Acute toxicity of *Moringa oleifera* leaf powder in rats. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 5, n. 5, p. 180-185, 2017.

MORGAN, C. R.; OPIO, C.; MIGABO, S. Chemical composition of *Moringa* (*Moringa oleifera*) root powder solution and effects of *Moringa* root powder on *E. coli* growth in contaminated water. **South African Journal of Botany**, 2019.

MOURA, M. C. *et al.* Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water. **Advances in environmental research**, v. 21, p. 269-285, 2011.

MOURA, M. C. *et al.* Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.

MOYO, B. *et al.* Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 60, p. 12925-12933, 2011.

NARAYANAN, A. *et al.* Avascular necrosis of femoral head: a metabolomic, biophysical, biochemical, electron microscopic and histopathological characterization. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2017.

NASCIMENTO, J. R. *et al.* **Estudos dos parâmetros físico-químicos para reação de transesterificação.** 2012.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. **Water research**, v. 32, n. 3, p. 781-791, 1998.

NEILD, G. H. *et al.* Uroscopy in the 21st century: high-field NMR spectroscopy. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association**, v. 12, n. 3, p. 404-417, 1997.

NIEDZWIECKI, A. *et al.* Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 552, 2016.

NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 5, p. 719-23, Mar 1 2005.

NOVA, I. C. V. *et al.* A Trypsin Inhibitor from *Moringa oleifera* Flowers Modulates the Immune Response In Vitro of Trypanosoma cruzi-Infected Human Cells. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 515, 2020.

OECD. **Guideline for testing of Chemicals, 2001.** Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, 2001.

OECD. **Guideline for testing of chemicals, 2008.** Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, 2008.

OGBE, A. O.; AFFIKU, J. P. Effect of polyherbal aqueous extracts (*Moringa oleifera*, Gum arabic and wild *Ganoderma lucidum*) in comparison with antibiotic on growth performance and haematological parameters of broiler chickens. **Res. J. Recent Sci**, v. 1, n. 7, p. 10-18, 2012.

OHTAA, T. *et al.* Stimulators of acylated ghrelin secretion from *Moringa oleifera* leaves. **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 1-5, 2017.

OKUMU, M. O. *et al.* Acute toxicity of the aqueous-methanolic *Moringa oleifera* (Lam) leaf extract on female wistar albino rats. **IJBCEP**, v. 5, n. 4, p. 1856-61, 2016.

OLIVEIRA, C. F. R. *et al.* Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L.(Moraceae) in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 162-168, 2016.

OLIVEIRA, C. F. R. *et al.* A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 142, p. 67-76, 2017.

OLUDURO, A. O.; ADERIYE, B. I. Effect of *Moringa oleifera* seed extract on vital organs and tissue enzymes activities of male albino rats. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 9, p. 537e40, 2009.

OYAGBEMI, A. A. *et al.* Toxicological evaluations of methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves in liver and kidney of male Wistar rats. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 307-312, 2013.

OZAWA, T. Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 31, n. 4, p. 377-390, 1999.

PAIVA, P. M. G. *et al.* Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.

PAIVA, P. M. G. *et al.* Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, v. 1, p. 641-649, 2013.

PANDA, S. *et al.* Cardioprotective potential of N, α -l-rhamnopyranosyl vincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: *In vivo* and *in vitro* studies. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 4, p. 959-962, 2013.

PANDO, S. C. Purificação e caracterização parcial de inibidores de serinoproteinases em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia: *Ormosia smithii* (Tendo-branco) e *Ormosia excelsa* (Tendo-amarelo). 2010.

PATRIOTA, L. L. *et al.* Antitumor activity of *Moringa oleifera* (drumstick tree) flower trypsin inhibitor (MoFTI) in sarcoma 180-bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 145, p. 111691, 2020.

PATRIOTA, L. L. *et al.* The trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers (MoFTI) inhibits acute inflammation in mice by reducing cytokine and nitric oxide levels. **South African Journal of Botany**, v. 143, p. 474-481, 2021.

PAULA, P. C. *et al.* A protein isolate from *Moringa oleifera* leaves has hypoglycemic and antioxidant effects in alloxan-induced diabetic mice. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 271, 2017.

PEREIRA, M. L. *et al.* Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 11, p. 1078-1085, 2011.

PEREIRA, M. L. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinoceptiva via oral.** Tese. Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará, UFC. 2014.

PINA, J. C. *et al.* Influência de diferentes substratos na produção de fitoconstituintes de *Moringa oleifera* lam. Cultivada a pleno sol. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 1076-1087, 2018.

PITZ, H. S. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos de cascas de jabuticaba (*Plinia peruviana*) e sua atuação durante o processo de cicatrização. 2018.

POLLINI, L. *et al.* Impact of ultrasound extraction parameters on the antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaves. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 277, 2020

PONTUAL, E. V. *et al.* Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1848-1854, 2012.

PONTUAL, E. V. *et al.* A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. **Natural product research**, v. 32, n. 24, p. 2940-2944, 2018.

QUIJANO, C. *et al.* Interplay between oxidant species and energy metabolism. **Redox biology**, v. 8, p. 28-42, 2016.

RAJ, A. J. *et al.* Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* (Lam.) root extract. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 5, p. 1426-1427, 2011.

RAMIREZ, Tzutzuy *et al.* Metabolomics in toxicology and preclinical research. **Altex**, v. 30, n. 2, p. 209, 2013.

REDDY, D. H. K. *et al.* Optimization of Cd (II), Cu (II) and Ni (II) biosorption by chemically modified *Moringa oleifera* leaves powder. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3, p. 1077-1086, 2012.

REMIÃO, José Oscar. **Bioquímica: guia de aulas práticas**. EDIPUCRS, 2003.

REN, S. *et al.* Integration of metabolomics and transcriptomics reveals major metabolic pathways and potential biomarker involved in prostate cancer. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 1, p. 154-163, 2016.

RESOLUÇÃO-RE Nº 1.478/2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-re-n-1.478-de-3-de-junho-de-2019-152008784>>

ROCHA, J. R. da *et al.* Evaluation of the metabolic production of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Química Nova**, v. 43, p. 314-318, 2020.

ROCHA-FILHO, C. A. A. *et al.* Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 132, p. 188-192, 2015.

ROCHA FILHO, C. A. A. **Investigação do caule do Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) como fonte de inibidor de tripsina com ação antibacteriana**. Dissertação de Mestrado. 2015.

RODRIGUES, N. E. R. **Avaliação da toxicidade aguda, subaguda e reprodutiva do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* L.** Tese. Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE. 2017.

ROLIM, L. A. D. M. M. *et al.* Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. T53-T58, 2011.

SABADIN, G. A. *et al.* Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. **Vaccine**, v. 35, n. 48, p. 6649-6656, 2017.

SABADIN, G. A. **Enzimas relacionadas ao equilíbrio redox em carrapatos e uso vacinal de uma glutathione S-transferase**. 2019.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. *et al.* Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. **Food analytical methods**, v. 3, n. 3, p. 175-180, 2010.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, n. 6, p. 975-980, 2005.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.

SANTOS, N. D. L. *et al.* Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.

SANTOS, N. D. L. *et al.* Evaluation of *Moringa oleifera* seed lectin in traps for the capture of *Aedes aegypti* eggs and adults under semi-field conditions. **Parasitology research**, v. 113, n. 5, p. 1837-1842, 2014.

SANTOS, L. M. M. *et al.* Anti-Candida activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 2, p. 101074, 2021.

SEVTAP, A. *et al.* Preventive role of Pycnogenol® against the hyperglycemia-induced oxidative stress and DNA damage in diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 54-63, 2019.

SHASTRI, B. N. **The Wealth of India – A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products: Raw Material**, vol. 3, Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) Publications, New Delhi, 1995.

SHEBEK, K. *et al.* The flocculating cationic polypeptide from *Moringa oleifera* seeds damages bacterial cell membranes by causing membrane fusion. **Langmuir**, v. 31, n. 15, p. 4496-4502, 2015.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 3-9, 2000.

SILVA, J. D. F. **Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana da raiz de *Portulaca elatior***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

SILVA, L. L. S. *et al.* Ecotoxicity of water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Chemosphere**, v. 185, p. 178-182, 2017.

SILVA-NETO, J. X. *et al.* A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 980, 2017.

SILVA, G. C. *et al.* Toxicity assessment of saline extract and lectin-rich fraction from *Microgramma vacciniifolia* rhizome. **Toxicon**, v. 187, p. 65-74, 2020.

SINGH, G. P.; SHARMA, S. K. Antimicrobial evaluation of leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 1-4, 2012.

SINHA, M. *et al.* Leaf extract of *Moringa oleifera* prevents ionizing radiation-induced oxidative stress in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1167-1172, 2011.

SINHA, M. *et al.* Amelioration of ionizing radiation induced lipid peroxidation in mouse liver by *Moringa oleifera* Lam. leaf extract. 2012.

SOUZA, C. G. *et al.* Fatores antinutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função dos compostos secundários. **Pubvet**, v. 13, p. 166, 2019.

SPITELLER, G. Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 959, n. 1, p. 30-44, 2002.

SREELATHA, S.; PADMA, L. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. **Plant foods for human nutrition**, v. 64, n. 4, p. 303, 2009.

STEUER, A. E. *et al.* Metabolomic strategies in biomarker research—new approach for indirect identification of drug consumption and sample manipulation in clinical and forensic toxicology?. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 319, 2019.

SULASTRI, E. *et al.* Total phenolic, total flavonoid, quercetin content and antioxidant activity of standardized extract of *Moringa oleifera* leaf from regions with different elevation. **Pharmacognosy journal**, v. 10, n. 6s, 2018.

SURESH, S. *et al.* Phytochemical analysis and pharmacological evaluation of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. in ovalbumin induced allergic asthma. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 484-493, 2020.

TAHRAOUI, A. *et al.* Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 48-55, 2010.

TAN, W. S. *et al.* *Moringa oleifera* flower extract suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via NF- κ B pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

TEIXEIRA, E. M. B. *et al.* Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Food chemistry**, v. 147, p. 51-54, 2014.

THAPA, A.; CARROLL, N. J. Dietary modulation of oxidative stress in Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1583, 2017.

TONHOLO, D. R. **Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* de moléculas potencialmente terapêuticas**. Dissertação. Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. 2018.

TRACHOOTHAM, D. *et al.* Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TSCHELIESSNIG, A. *et al.* Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. **Journal of biotechnology**, v. 188, p. 17-28, 2014.

TSHABALALA, T. *et al.* Potential substitution of the root with the leaf in the use of *Moringa oleifera* for antimicrobial, antidiabetic and antioxidant properties. **South African Journal of Botany**, 2019.

UMA, N.; FAKURAZI, S.; HAIRUSZAH, I. *Moringa oleifera* enhances liver antioxidant status via elevation of antioxidant enzymes activity and counteracts paracetamol-induced hepatotoxicity. **Malaysian journal of nutrition**, v. 16, n. 2, 2010.

VANDENBORRE, G. *et al.* Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VERGARA-JIMENEZ, M. *et al.* Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 91, 2017.

VERMA, A. R. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2196-2201, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level**. 2013.

WANG, Z *et al.* Targeted metabolomic profiling of cardioprotective effect of Ginkgo biloba L. extract on myocardial ischemia in rats. **Phytomedicine**, v. 23, n. 6, p. 621-631, 2016.

WU, W.; SUN, R. Toxicological studies on plant proteins: a review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 377-386, 2012.

WU, M. X. *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity studies of the aqueous extract from radix, radix with cortex and cortex of *Psammosilene tunicoides* in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213, p. 199-209, 2018.

XUE, L. M. *et al.* Hepatotoxic constituents and toxicological mechanism of *Xanthium strumarium* L. fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 272-282, 2014.

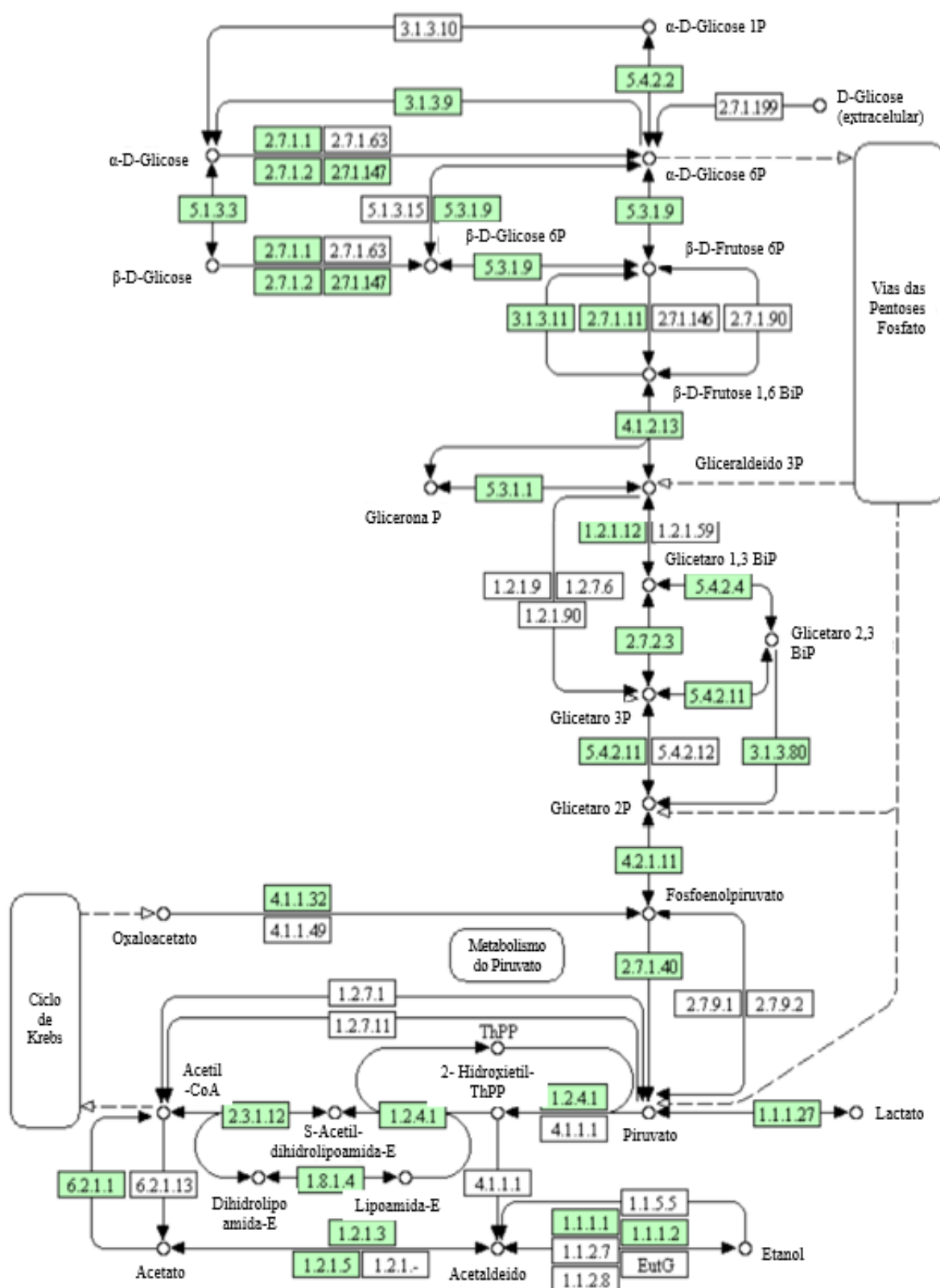
YUJING, L. *et al.* *In vivo* acute and subacute toxicities of phenolic extract from rambutan (*Nephelium lappaceum*) peels by oral administration. **Food Chemistry**, p. 126618, 2020.

ZHANG, L. *et al.* Emerging approaches in predictive toxicology. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 55, n. 9, p. 679-688, 2014.

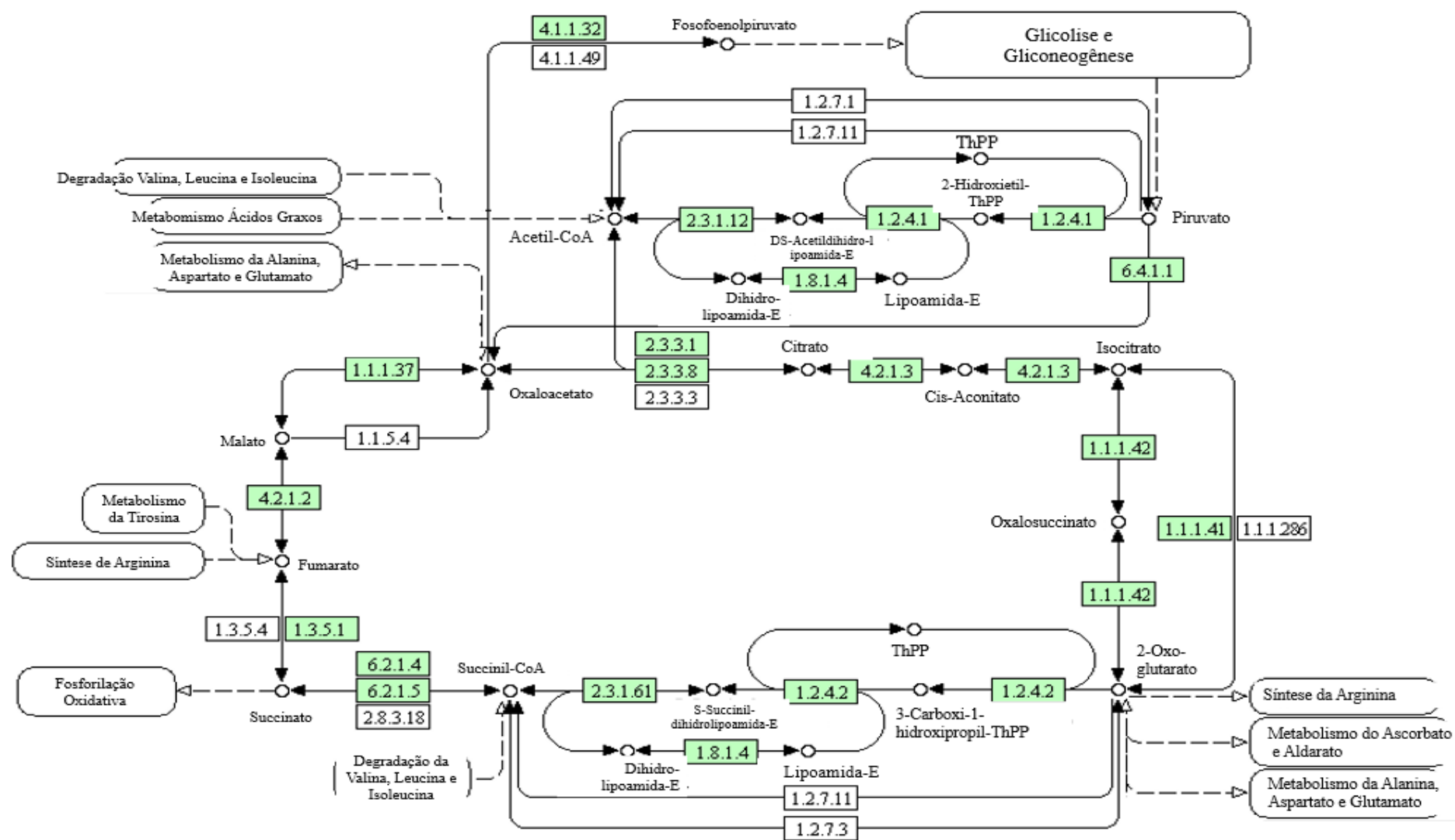
ANEXO I – Vias Metabólicas (Kegg Partway - <https://www.genome.jp/pathway/>)

ANEXO A – Vias Metabólicas

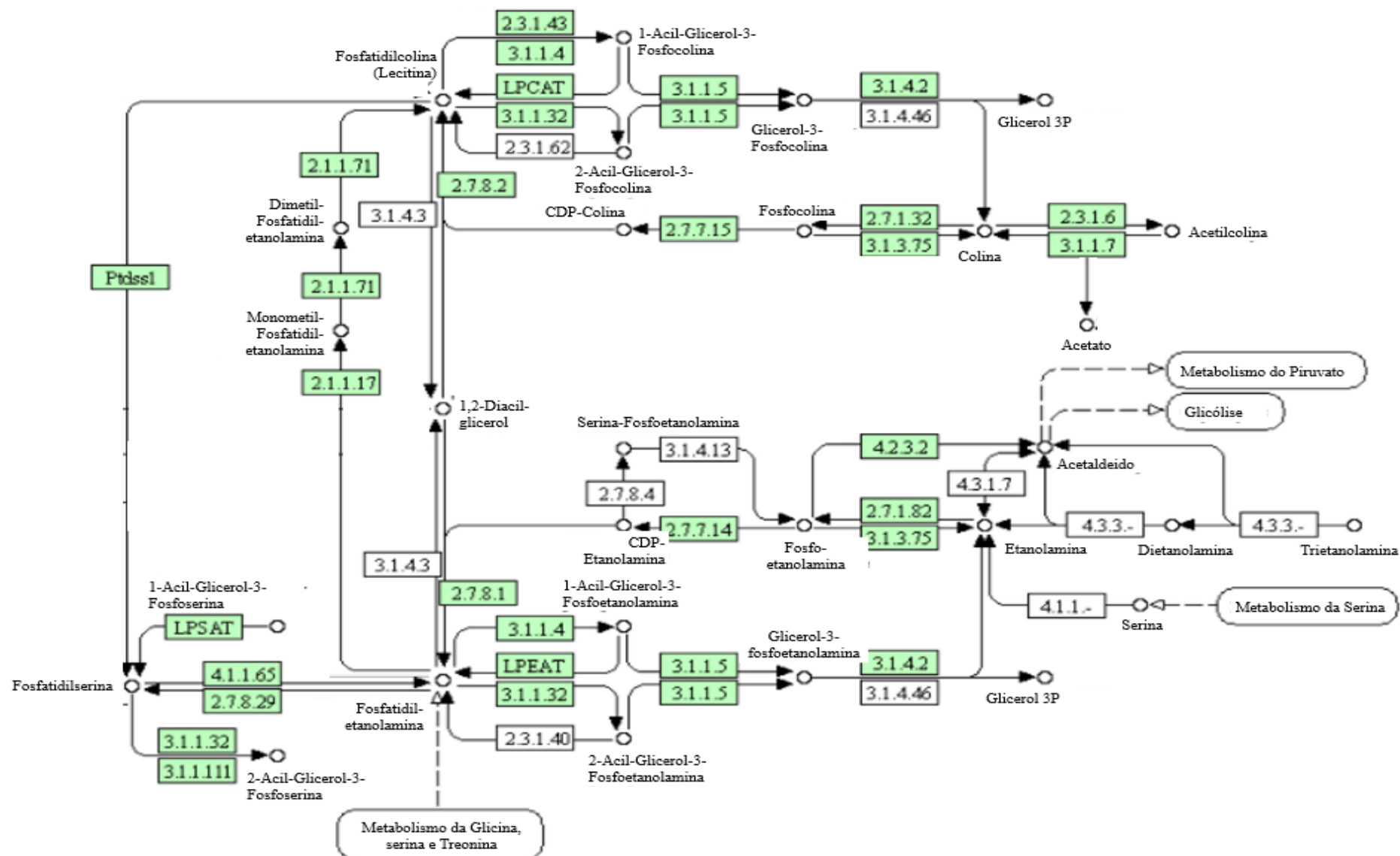
Glicólise e Gliconeogênese (Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/map00010>)



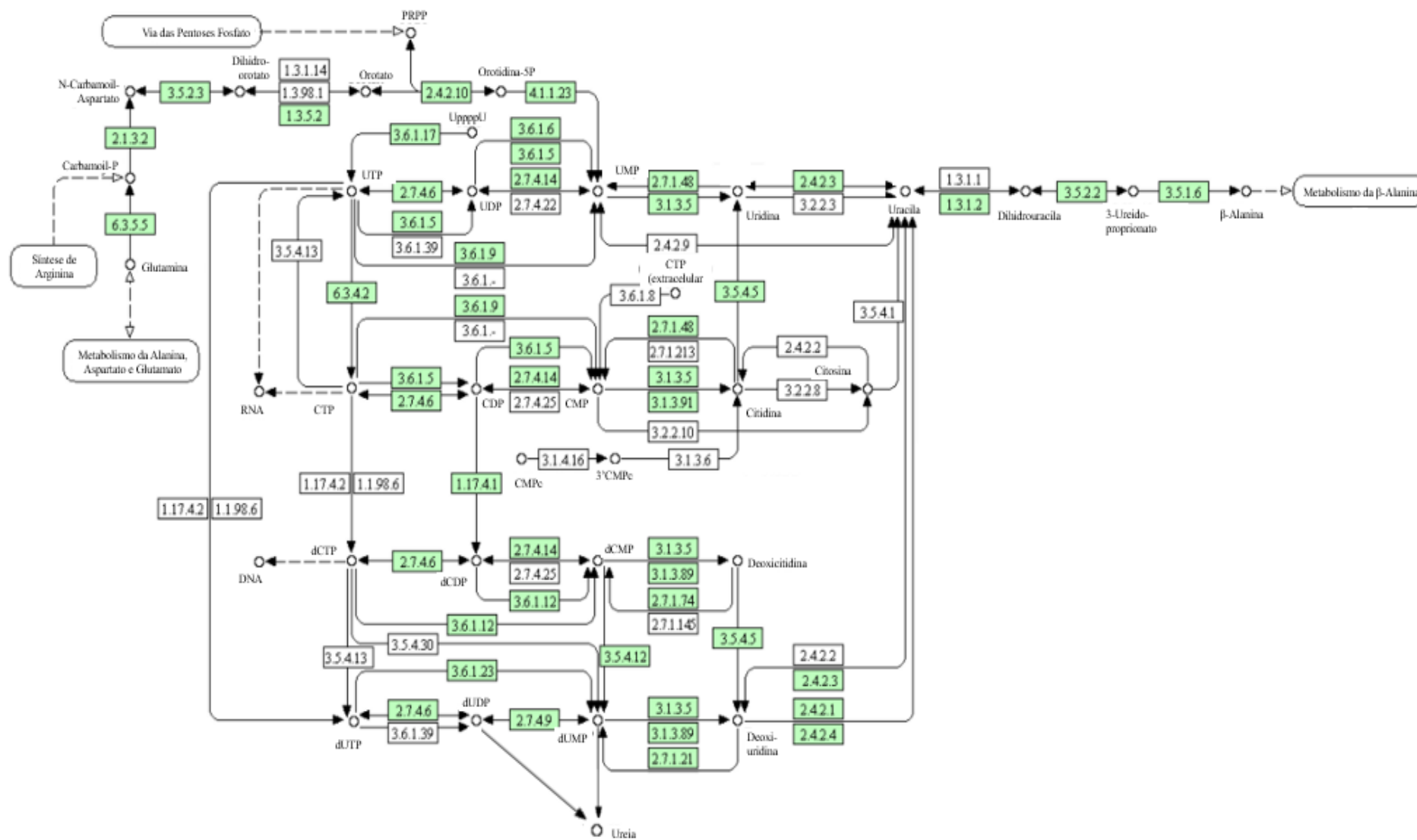
Ciclo do Ácido Cítrico (Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/map00020>)



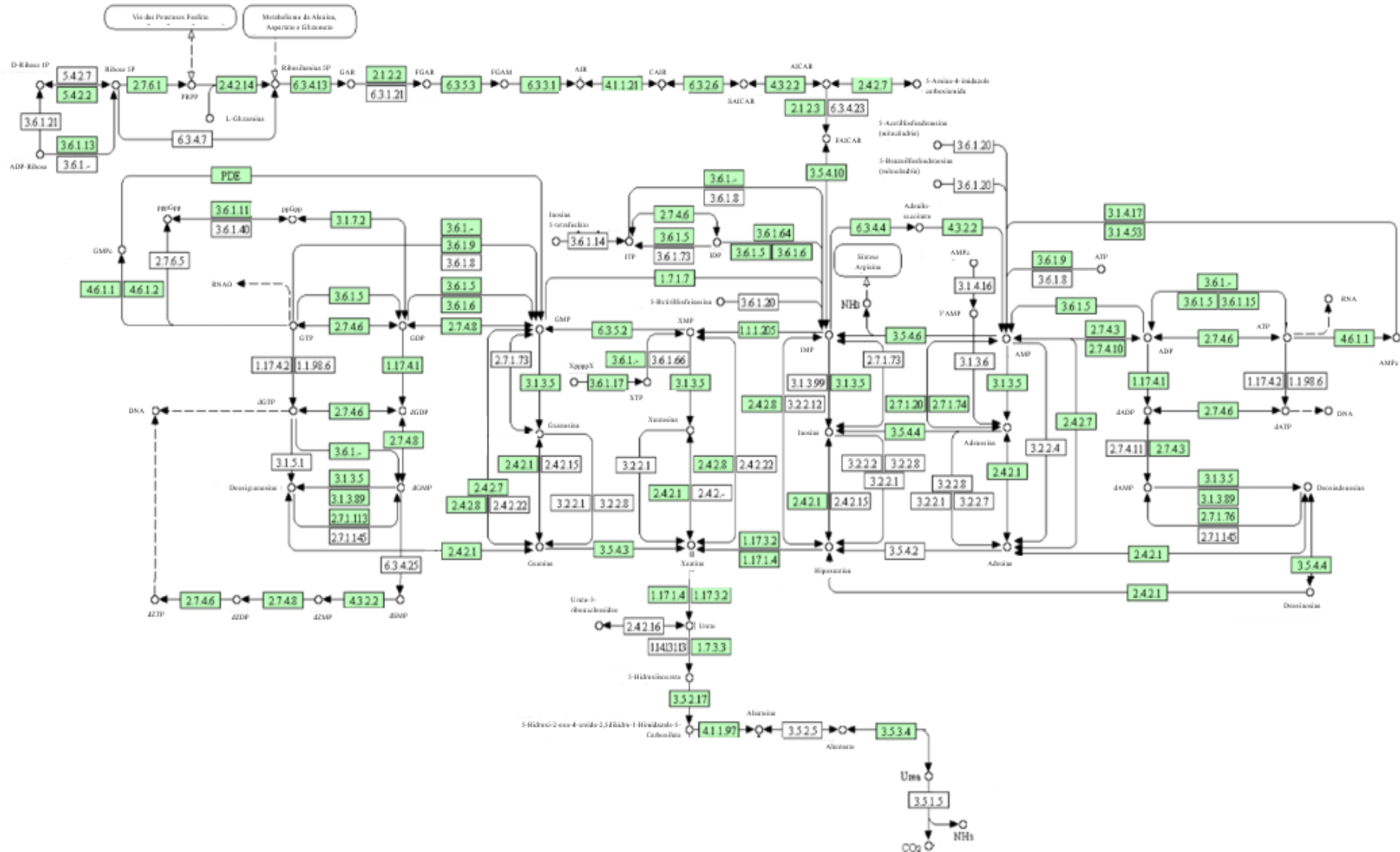
Metabolismo dos Glicerofosfolipídios (Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/map00564>)



Metabolismo das Pirimidinas (Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/map00240>)



Metabolismo das Purinas (Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/map00230>)



ANEXO B – Autorização Comitê de Ética e Pesquisa com Animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 10 de abril de 2019

Ofício nº 16/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Patricia Maria Guedes Paiva**

Departamento de Bioquímica

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0070/2018

Certificamos que a proposta intitulada “**Atividade Biológicas de preparações de folhas de Moringa oleifera,**” registrado com o nº 0070/2018 sob a responsabilidade de **Prof. Patricia Maria Guedes Paiva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/03/2019.

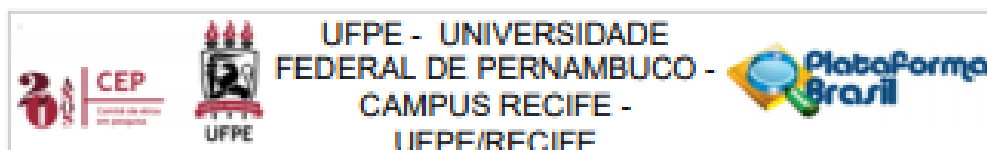
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Maio de 2019 a fevereiro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	152
Peso/Idade	50-60g
Sexo	Macho (59) fêmea (93)
Origem	Bioterio do Departamento de Antibioticos

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691



ANEXO C – Autorização Comitê de Ética e Pesquisa com Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADES CITOTÓXICA, HEMOLÍTICA E IMUNOMODULADORA DE PREPARAÇÕES VEGETAIS ENRIQUECIDAS DE PROTEÍNAS BIOATIVAS

Pesquisador: Patrícia Maria Guedes Paiva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33719520.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.127.083

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "ATIVIDADES CITOTÓXICA, HEMOLÍTICA E IMUNOMODULADORA DE PREPARAÇÕES VEGETAIS ENRIQUECIDAS DE PROTEÍNAS BIOATIVAS" foi apresentado pela Professora Patrícia Maria Guedes Paiva do Departamento de Bioquímica da UFPE. Este projeto tem a finalidade de preparar extratos vegetais da farinha das folhas de *M. oleifera*, coletadas na UFPE e investigar suas atividades na proliferação, na capacidade imunomoduladora e citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e eritrócitos humanos. Após as assinaturas dos TCLEs, 12 participantes doarão sangue, por punção venosa, coletados em tubos contendo heparina. As células mononucleares serão isoladas e coletadas após a centrifugação de 45 ml do sangue coletado de 06 doadores. Para o ensaio hemolítico, outros 6 doadores doarão entre 5 a 10 ml de sangue. Os ensaios de preparação das amostras e os testes serão realizados no Depto de Bioquímica da UFPE. O projeto será realizado no período de 12 meses. No projeto não constam a colaboração de outros pesquisadores e/ou estudantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar a citotoxicidade e imunomodulação de preparações vegetais obtidas de folhas de *M. oleifera*.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8586 **E-mail:** cepcca@ufpe.br

ANEXO D - Súmula Curricular

HISTÓRICO ACADÊMICO



SIGAA - Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas
UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROPG

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE

Histórico Escolar - Emitido em: 30/01/2022 às 17:07

Dados Pessoais

Nome: **ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES** Matrícula: **20183026354**
Data de Nascimento: **15/12/1991** Local de Nascimento: **NÃO INFORMADO/--**
Nome do Pai: **RONNIE RAION ALVES DE ANDRADE**
Nome da Mãe: **LENILDA LIRA DE VASCONCELOS ALVES**

Dados do Vínculo do Discente

Programa: **PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS BIOLOGICAS - CB** Índices Acadêmicos
Nível: **DOCTORADO** CR: **4.0**
Curso: **CIÊNCIAS BIOLÓGICAS** (Índice de Coeficiente de Rendimento: 0.0 - 4.0)
Currículo: **CBID09** Status: **ATIVO**
Área de Concentração: **BIOLOGIA QUÍMICA PARA A SAÚDE**
Linha de Pesquisa:
Orientador: **1133984 - PATRICIA MARIA GUEDES PAIVA**
Forma de Ingresso: **SELEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO**
Mês/Ano Inicial: **MAR/2018** Mês Atual: **47º**
Trancamentos: **0 meses** Prazo para Conclusão (Padrão / **MAR/2022**)
Prorrogações: **0 meses**
Tipo Saída:
Mês/Ano de Saída: Data da Defesa:

Disciplinas e Atividades Cursadas/Cursando

Início	Fim		Componente Curricular	Turma	CH	C	Freq %	Conceito	Situação
02/2018	07/2018	DCB910	CANCEROLOGIA EXPERIMENTAL <i>Dra. SILENE CARNEIRO DO NASCIMENTO (60h)</i>	CE	60	4	100,0	A	APROVADO
03/2020	--	DCB895	ATIVIDADE DE ORIENTAÇÃO INDIVIDUAL	--	0	0	--	--	CANCELAMENTO INSTITUCIONAL
07/2020	07/2020	DCB969	TÓPICOS EM NANOBIOTECNOLOGIA E BIOFOTÔNICA - ESSE COMPONENTE SERÁ MINISTRADO REMOTAMENTE <i>Dra. ADRIANA FONTES (45h)</i>	01	45	3	100,0	A	APROVADO
08/2020	08/2020	DCB987	CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICO <i>Dr. PAULO ANTONIO GALINDO SOARES (15h), Dra. MARIA DAS GRACAS CARNEIRO DA CUNHA (15h)</i>	01	30	2	100,0	A	APROVADO
11/2020	--	DCB895	ATIVIDADE DE ORIENTAÇÃO INDIVIDUAL	--	0	0	--	--	MATRICULADO
03/2021	07/2021	DCB897	ATIVIDADE DE QUALIFICAÇÃO/PRÉ-BANCA DE DOUTORADO	--	0	0	--	--	APROVADO
08/2021	--	DCB899	TESE DE DOUTORADO	--	0	0	--	--	MATRICULADO
--	--	DCB902	EVOLUÇÃO DO PENSAMENTO CIENTÍFICO	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO
--	--	DCB904	SEMINÁRIOS EM BIOTECNOLOGIA	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO
--	--	DCB921	ANÁLISE ESTRUTURAL E APLICAÇÕES DE LECTINAS	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO
--	--	DCB959	BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO
--	--	DCB960	SEMINÁRIOS EM BIOLOGIA QUÍMICA PARA A SAÚDE	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO
--	--	DCB967	PROTEÍNAS E SUAS APLICAÇÕES	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO
--	--	DCB980	PROTEÍNAS INSETICIDAS	--	45	3	100,0	A	DISPENSADO

Carga Horária Integralizada/Pendente

	Obrigatórias	Optativos	Total
Exigido	180 h	270 h	450 h
Integralizado	180 h	270 h	450 h
Pendente*	0 h	0 h	0 h

*Contabilizado com base no valor estabelecido no mínimo exigido da estrutura curricular.

Obs.: A coluna (C) indica os créditos dos componentes curriculares.

Componentes Curriculares Obrigatórios Pendentes:1

Código	Componente Curricular	CH
DCB899	TESE DE DOUTORADO	0 h

CURRÍCULO LATTES

Robson Raion de Vasconcelos Alves**Formação acadêmica/titulação**

- 2018 - 2022** Doutorado em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Moringa oleifera*
 Orientador: Patricia Maria Guedes Paiva
 Coorientador: Mariana Pinheiro Fernandes
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2016 - 2018** Mestrado em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE OVICIDA DE LECTINAS LIGADORAS DE QUITINA CONTRA *Aedes aegypti*, Ano de obtenção: 2018
 Orientador: Patrícia Maria Guedes Paiva
 Coorientador: Thiago Henrique Napoleão
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2020 - 2022** Especialização em Hematologia Clínica.
 Faculdade Sucesso, FACSU, Brasil
- 2010 - 2014** Graduação em Biomedicina.
 Faculdades Integradas de Patos, FIP, Patos, Brasil
 Título: PREVALÊNCIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA EM TRATAMENTO HEMODIALÍTICO
 Orientador: Angela Maria Sales Barros
 Bolsista do(a): Programa Universidade para Todos
- 2020** Ensino Profissional de nível técnico em Técnico em Qualidade.
 Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - SE, SENAC-SE, Aracaju, Brasil

Formação complementar

- 2020** Auxiliar de Laboratório de Microbiologia. (Carga horária: 162h).
 SENAI - Departamento Regional de Goiás, SENAI/DR/GO, Goiânia, Brasil
- 2020** Extensão universitária em Docência em Educação à Distância. (Carga horária: 240h). Escola Superior Aberta do Brasil, ESAB, Vila Velha, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Coronavírus (COVID-19): Manejo dos Casos Suspeitos. (Carga horária: 1h). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil
- 2020 - 2020** Extensão universitária em Excel Básico e Intermediário. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Pernambuco, IFPE, Recife, Brasil
- 2020 - 2020** Extensão universitária em Desenvolvendo as Habilidades Socioemocionais. (Carga horária: 24h). Instituto Federal de Pernambuco - Campus Igarassu, IFPE, Igarassu, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Prevenção de infecção. (Carga horária: 1h). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil

2020 - 2020	Curso de curta duração em Uso correto dos EPI's pela equipe assistencial. (Carga horária: 1h). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil
2019 - 2020	Extensão universitária em Metodologia da Pesquisa Científica 1ª oferta MOOC. (Carga horária: 30h). Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Ribeirao Preto, Brasil
2020 - 2020	Extensão universitária em Soluções biotecnológicas aplicadas às ações de enfrentamento à COVID-19. (Carga horária: 25h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2020 - 2020	Extensão universitária em Hemograma, Anemia e Linfadenopatia. (Carga horária: 30h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
2019 - 2019	Extensão universitária em VIII Curso de Extensão em Bioética e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 21h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2019 - 2019	Extensão universitária em Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos do metabolismo dos substratos energético. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2019 - 2019	Curso de curta duração em IN VITRO AND IN VIVO ANTICANCER ACTIVITY OF SYNTHETIC, BIOTECHNOLOGICAL, AN. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2018 - 2018	Citometria de Fluxo. . (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2018 - 2018	Extensão universitária em Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Prêmios e títulos

2021	Menção honrosa - Modalidade Oral, Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.
2021	Menção honrosa - Modalidade Oral, I Congresso Brasileiro de Nanobiotecnologia - COBIONTEC
2020	Menção Honrosa - 20 melhores trabalhos na modalidade pôster, I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer
2020	Menção Honrosa - 3º lugar Modalidade Oral, XXVI Semana de Biomedicina UFPE
2019	Menção Honrosa - 1º lugar modalidade pôster, Simpósio de Proteínas Bioativas - UFPE

Produção

Artigos completos publicados em periódicos

1. DA SILVA, ABDÊNIGO RODRIGUES; DE OLIVEIRA, WESLEY FELIX; DA SILVA, POLLYANNA MICHELLE; DE SIQUEIRA PATRIOTA, LEYDIANNE LEITE; **DE VASCONCELOS ALVES, ROBSON RAION**; DE OLIVEIRA, ANA PATRÍCIA SILVA; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA; PAIVA, PATRÍCIA MARIA GUEDES; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; FILHO, PAULO EUZÉBIO

CABRAL; FONTES, ADRIANA; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES. v.192, p.232 - 240, 2021.

2. SILVA, SUÉLLEN PEDROSA DA; COSTA, CLARICE BARBOSA LUCENA DA; SILVA, JOSÉ DAYVID FERREIRA DA; **ALVES, Robson Raion de Vasconcelos**; SILVA, GUILHERME ANTONIO DE SOUZA; FREITAS, ANDERSON FELIPE SOARES DE; GUEDES, CAIO CÉSAR DA SILVA; MARINHO, AMANDA DE OLIVEIRA; PAIVA, PATRÍCIA MARIA GUEDES; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE. Resistance mechanisms of *Cryptococcus* spp. and plant compounds as tools to combat them. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. v.10, p.e57810212819 - , 2021.

3. OLIVEIRA MARINHO, AMANDA; RODRIGUES DA SILVA, ABDÊNIGO; **RAION DE VASCONCELOS ALVES, ROBSON**; DO BOM PARTO LOPES VIEIRA LIMA, MAGALY; ALVES DE ALMEIDA JUNIOR, ANTÔNIO SÉRGIO. Tratamento de Hemofílicos A Grave Atendidos no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, com Inibidor de Fator VIII Através da Imunotolerância. ENSAIOS E CIÊNCIA (CAMPO GRANDE. IMPRESSO). v.25, p.252 - 258, 2021.

4. **ALVES, R.R.V.**; Prazeres, G. B.; SILVA, S. P.; SILVA, P. M.; COELHO, LUANA C.B.B.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. Antifungal activity of *Moringa oleifera* seed extract - ANNALS OF THE 1 ST BRAZIL-FRANCE SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY. BIOFAR: REVISTA DE BIOLOGIA E FARMÁCIA. v.16, p.34 - , 2020.

5. MOURA, M.C.; PROCÓPIO, T.F.; FERREIRA, G.R.S.; **ALVES, R.R.V.**; SÁ, R.A.; PAIVA, P.M.G.; INGMER, H.; COELHO, L.C.B.B.; NAPOLEÃO, T.H. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on non-resistant and multidrug resistant isolates. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY. v.XXX, p.JAM-2020-1275.R - , 2020.

6. **ALVES, R.R.V.**; DA SILVA, ABDÊNIGO RODRIGUES; SILVA, P. M.; NAVARRO, DANIELA MAF; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, PATRÍCIA MARIA GUEDES. ATIVIDADE OVICIDA DE FRAÇÕES PROTEICAS DE *Myracrodruon urundeuva*. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIENCIA. v.72, p.1 - 4, 2020.

7. MEDEIROS, MÁRIO L.S.; **ALVES, ROBSON R.V.**; OLIVEIRA, BENNY F.; NAPOLEÃO, THIAGO H.; PAIVA, PATRÍCIA M.G.; COELHO, LUANA C.B.B.; BEZERRA, ANA C.D.S.; SILVA, MICHELE D.C. In vitro effects of *Moringa oleifera* seed lectins on *Haemonchus contortus* in larval and adult stages. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY. v.218, p.108004, 2020.

8. **ALVES, ROBSON RV**; SOARES, TATIANA; BENTO, ELINALDO FL; ROLDAN'FILHO, RICARDO S; SOUZA, BÁRBARA SS; LIMA, MARCELE KN; NASCIMENTO, JÉSSICA S; COELHO, LUANA CBB; SÁ, ROBERTO A; LIMA, THÂMARAH A; GONÇALVES, GABRIEL GA; BRAYNER, FÁBIO A; ALVES, LUIZ C; NAVARRO, DANIELA MAF; NAPOLEÃO, THIAGO H; PAIVA, PATRÍCIA MG. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. PEST MANAGEMENT SCIENCE. v.76, p.730 - 736, 2020.

9. DE SOUZA SILVA, GUILHERME ANTONIO; DA SILVA, SUÉLLEN PEDROSA; DA COSTA, MARCOS AURÉLIO SANTOS; DA SILVA, ABDÊNIGO RODRIGUES; **DE VASCONCELOS ALVES, ROBSON RAION**; ÂNGELO MENDES TENÓRIO, FERNANDA DAS CHAGAS; DA SILVA MELO, ALANNE RAYSSA; DE FREITAS, ANTONIO CARLOS; LAGOS DE MELO, CRISTIANE MOUTINHO. SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 infections in pregnancy and fetal development. Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction., p.101846, 2020.

10. **ALVES, Robson R. V.**; MAIA NETO, Luiz da Silva; ALMEIDA, Maria Margareth Câmara; RODRIGUES, Priscila M. B. To observe changes of female sex hormones after chemical induction of Diabetes Mellitus. International Research Journal of Obstetrics and Gynecology. v.1, p.1 - 5, 2018.

11. MAIA NETO, Luiz da Silva; **ALVES, R. R. V.**; OLIVEIRA, E. P.; AMORIM, F. D.; ALMEIDA, Maria Margareth Câmara; RODRIGUES, Priscila M. B. PREVALENCE OF DYSLIPIDEMIAS IN SWISS MICE WITH DIABETES MELLITUS INDUCED BY ALLOXAN-MONOHYDRATE. Experimental

Pathology and Health Sciences. v.8, p.11 - 12, 2017.

12. LEITE, AHP.; SILVA, NQ; MORATO, CBA; **ALVES, Robson R. V.** Hpv como fator de risco para o câncer peniano. REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E SAÚDE. v.5, p.01 - 06, 2015.

13. **ALVES, Robson Raion de Vasconcelos**; MAIA NETO, Luiz da Silva; BARROS, Angela Maria Sales Hipertensão arterial como fator de desencadeamento da insuficiência renal crônica em usuários do Centro de Hemodiálise do Município de Patos-PB - VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP. REVISTA COOPEX. v.5, p.1 - 63, 2014.

Capítulos de livros publicados

1. SILVA, J. N. O.; GUEDES, CAIO CÉSAR DA SILVA; SILVA, S. P.; FREITAS, ANDERSON FELIPE SOARES DE; **ALVES, R.R.V.** Estudos antimicrobianos com Aloe vera: uma revisão In: Ciências Biológicas: os desafios da pesquisa na atualidade.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2021, v.1, p. 484-502.

2. GUEDES, CAIO CÉSAR DA SILVA; **ALVES, R.R.V.**; SILVA, J. N. O.; BARROS, M. C.; FREITAS, ANDERSON FELIPE SOARES DE. O potencial de lectinas no diagnóstico do câncer In: Ciências Biológicas: os desafios da pesquisa na atualidade.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2021, v.1, p. 78-97.

3. **ALVES, R.R.V.**; SILVA, S. P.; FREITAS, ANDERSON FELIPE SOARES DE; SILVA, J. N. O.; GUEDES, CAIO CÉSAR DA SILVA. Prevalência da hipertensão arterial em pacientes que realizam tratamento de hemodiálise em um Município da Paraíba In: Enfermagem: os desafios da pesquisa na atualidade.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2021, v.1, p. 551-569.

4. SILVA, N. R. G.; **ALVES, ROBSON RV**; SILVA, A. R.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. Adenantha pavonina e suas aplicações na saúde e biotecnologia: uma revisão In: Biotecnologia: tecnologia a serviço da saúde.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA, 2020, v.1, p. 56-73.

5. **ALVES, R.R.V.**; SILVA, A. R.; Prazeres, G. B.; Santos, E. M. G.; COELHO, LUANA C.B.B.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PREPARAÇÕES DE Moringa oleifera Lam: UMA REVISÃO In: Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica.1 ed.Recife: UFPE, 2020, p. 434-439.

6. **ALVES, R. R. V.**; PAIVA, Patricia M. G. Avaliação de atividade ovicida de lectinas contra Aedes aegypti In: Aqui se faz ciência!.1 ed.Goiânia: Editora Espaço Acadêmico, 2020, p. 38-40.

7. FREITAS, ANDERSON FELIPE SOARES DE; GUEDES, CAIO CÉSAR DA SILVA; SILVA, J. N. O.; **ALVES, R.R.V.** Avaliação fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de Calotropis procera In: Farmácia: os desafios da pesquisa na atualidade.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2020, v.1, p. 274-293.

8. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, N. R. G.; ARAUJO, C. A. S.; SILVA, J. N. O.; SILVA, C. E. S.; PAIVA, Patricia M. G. Citotoxicidade de sementes de Moringa oleifera frente à células de câncer de mama: uma revisão In: Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer.2 ed.João Pessoa: Desenvolva-se, 2020, p. 79-79.

9. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, N. R. G.; SILVA, A. R.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. Lectinas ovicidas no controle do mosquito Aedes aegypti In: Biotecnologia: tecnologia a serviço da saúde.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA, 2020, v.1, p. 124-142.

10. SILVA, S. P.; **ALVES, R.R.V.**; SILVA, J. N. O.; GUEDES, CAIO CÉSAR DA SILVA; FREITAS, ANDERSON FELIPE SOARES DE. Mecanismos de resistência de Candida spp. frente a antimicrobianos convencionais e uso de lectinas no controle desses patógenos In: Saúde: os desafios da pesquisa na atualidade.3 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada,

2020, v.03, p. 585-608.

11. BARROS, M. C.; **ALVES, R.R.V.**; SILVA, S. P.; SILVA, J. D.; AMORIM, Poliana K; COELHO, LUANA C.B.B.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. Moringa oleifera toxicology: an overview In: Moringa oleifera: properties, Applications and Health Effects.1 ed.New York: NOVA Science Publishers, 2020, v.1, p. 35-68.

12. SILVA, A. R.; **ALVES, R.R.V.**; NAPOLEÃO, T.H. NANOSISTEMAS QUANTUM DOTS-LECTINAS COMO ALTERNATIVA NA INVESTIGAÇÃO DE GLICANOS EM ESTRUTURAS DE CANDIDA In: Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica.1 ed.Recife: UFPE, 2020, p. 137-141.

13. **ALVES, R.R.V.**; ROLDAN FILHO, R. S.; BENKO-ISEPPON, A. M.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. PERFIL DESCRICIONAL DE LECTINAS DE RELEVANTE INTERESSE BIOLÓGICO A PARTIR DA ESPÉCIE Microgramma vacciniifolia In: Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica.1 ed.Recife: UFPE, 2020, p. 589-594.

14. SILVA, A. R.; **ALVES, ROBSON RV**; SILVA, N. R. G.; NAPOLEAO, T. H. Propriedades físico-químicas de biomateriais aplicados na regeneração tecidual guiada In: Odontologia: tecnologia a serviço da saúde II.1 ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA, 2020, v.1, p. 207-223.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SILVA, A. R.; **ALVES, R.R.V.**; SILVA, P. M.; MARINHO, A. O.; NAPOLEAO, T. H. MODELAGEM DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR ESPECTROCOPIA DE MASSA DA LECTINA DA SACOTESTA DA PUNICA GRANATUM (PGTEL) In: Semana de Biomedicina: Saúde, Ciência e Sociedade, 2020, Recife. **Anais da Semana de Biomedicina: Saúde, Ciência e Sociedade.** , 2021.

2. SILVA, A. R.; MARINHO, A. O.; **ALVES, R.R.V.**; NAPOLEAO, T. H. PERFIL PROTEICO DO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS DA SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS In: Semana de Biomedicina: Saúde, Ciência e Sociedade, 2020, Recife. **Anais da Semana de Biomedicina: Saúde, Ciência e Sociedade.** , 2021.

3. **ALVES, Robson R. V.**; COSTA, J. A.; SILVA, P. M.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE, INIBIDORA DE TRIPSINA E ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE Moringa oleifera In: VII Encontro Nacional de Moringa, 2018, Salvador. **Anais do VII Encontro Nacional de Moringa - ENAM 2018.** , 2018. p.410 - 415

4. SILVA, L. L. S.; **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. EFEITOS DE FORMULAÇÃO SÓLIDA CONTENDO LECTINA DE SEMENTES DE Moringa oleifera NA ECLOSÃO DE OVOS E DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE Aedes aegypti In: VII Encontro Nacional de Moringa, 2018, Salvador. **Anais do VII Encontro Nacional de Moringa.** , 2018. p.443 - 447

5. **ALVES, Robson R. V.**; LIMA, M. K. N.; SILVA, W. S. F. L.; COSTA, J. A.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. INFLUÊNCIA DO pH E DA PRESENÇA DE ÍONS NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE Moringa oleifera In: VII Encontro Nacional de Moringa, 2018, Salvador. **Anais do VII Encontro Nacional de Moringa.** , 2018. p.472 - 475

6. **ALVES, Robson R. V.**; ROLDAN FILHO, R. S.; COSTA, J. A.; AMORIM, Poliana K; SILVA, L. L. S.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. USO DE CROMATOGRAFIA PARA PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINA PRESENTE EM EXTRATOS DE FOLHAS DE Moringa oleifera In: VII Encontro Nacional de Moringa, 2018, Salvador. **Anais do VII Encontro Nacional de Moringa.** , 2018. p.426 - 430

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, J. N. O.; **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H. Atividade antitumoral da casca da

romã: uma pesquisa bibliográfica In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.37 - 37

2. SILVA, J. N. O.; **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, S. P. Avaliação da atividade citotóxica da lectina de raiz de *Portulaca elatior* In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.53 - 53

3. SILVA, N. R. G.; MARINHO, A. O.; **ALVES, Robson R. V.**; PAIVA, Patricia M. G. Avaliação do potencial antitumoral de *Adenantha pavonina* In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.57 - 57

4. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, N. R. G.; ARAUJO, C. A. S.; SILVA, J. N. O.; SILVA, C. E. S.; PAIVA, Patricia M. G. Citotoxicidade de sementes de *Moringa oleifera* frente à células de câncer de mama: uma revisão In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.79 - 79

5. SILVA, N. R. G.; MARINHO, A. O.; **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H. Efeitos de lectinas no potencial de membrana mitocondrial de células tumorais como mecanismo antiproliferativo In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.101 - 101

6. SILVA, C. E. S.; **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, A. R. Terapia do receptor de antígeno quimérico de células T (Car T-Cells) em neoplasias hematológicas In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.192 - 192

7. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, N. R. G.; ARAUJO, C. A. S.; SILVA, J. N. O.; SILVA, C. E. S.; PAIVA, Patricia M. G. Uso das folhas de *Arrabidaea chica* frente à leucemia e carcinoma de Ehrlich-Lette: uma revisão In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.198 - 198

8. ARAUJO, C. A. S.; **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, C. E. S.; ALMEIDA, Maria Margareth Câmara. Uso das folhas de *Punica granatum* como alternativa ao tratamento de câncer pulmonar In: I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer, 2020, João Pessoa. **Anais do I Congresso Norte-Nordeste Multidisciplinar Sobre O Câncer**. João Pessoa: Desenvolva-se, 2020. v.2. p.199 - 199

9. AMORIM, F. D.; MAIA NETO, Luiz da Silva; **ALVES, R. R. V.**; RODRIGUES, Priscila M. B. Correlação do câncer de cabeça e pescoço com HPV In: VI Congresso Luso Brasileiro de Patologia Experimental, 2016, Garanhuns. **Anais do VI Congresso Luso Brasileiro de Patologia Experimental**. , 2016.

10. ARAÚJO, AB.; LUCENA, JUF.; ARAÚJO, Patrícia Pereira de; **ALVES, Robson R. V.**; OLIVEIRA, JB.; ARAÚJO, E. ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE ÁGUA DISTRIBUIDA DA CIDADE DE ITAPORANGA – PB In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAIS DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.32 - 33

11. ARAUJO, C. A. S.; SILVA, JB.; FÉLIX, TS.; **ALVES, Robson R. V.**; PINHEIRO, LB.; ARAÚJO, E. ANÁLISE FÍSICA E BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE SÃO BENTO – PB In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAIS DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.35 - 36

12. GONÇALVES, Jheison de Souza; **ALVES, Robson R. V.**; PORTO, MLS. AVALIAÇÃO DAS PERSPECTIVAS E DESAFIOS DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE BRASILEIRO AO LONGO DE SEUS 25 ANOS In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAI DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.40 - 41

13. ARAUJO, C. A. S.; ALMEIDA, MLC.; ARAÚJO, Patrícia Pereira de; **ALVES, Robson R. V.**; MASCENA, TCF.; ALMEIDA, Maria Margareth Câmara BENZENO E APLASIA MEDULAR: UMA REVISÃO DE LITERATURA In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAI DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.36 - 36

14. MAIA NETO, Luiz da Silva; **ALVES, Robson R. V.**; ALMEIDA, VS.; NUNES, VVL.; ROLIM, LADMM. GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE NO RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES CAUSADAS PELO CONSUMO EXCESSIVO DE ÁLCOOL In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAI DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.44 - 45

15. **ALVES, Robson R. V.**; GONÇALVES, Jheison de Souza; MAIA NETO, Luiz da Silva; ARAÚJO, Patrícia Pereira de; ALMEIDA, Wagner Rodrigues; BARROS, Angela Maria Sales. HIPERTEMNSÃO ARTERIAL COMO FATOR DE DESENCADEAMENTO DA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA EM USUÁRIOS DO CENTRO DE HEMODIÁLISE DE MONICÍPIO DE PATOS – PB In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAI DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.49 - 50

16. LUCENA, GTS.; MAIA NETO, Luiz da Silva; **ALVES, Robson R. V.**; ALMEIDA, Wagner Rodrigues; LEITE, AHP.; PINHEIRO, LB.; ALMEIDA, Maria Margareth Câmara. LEUCOSPERMIA E ERITROSPERMIA: ACHADOS PRECOCES DA AZOOSPERMIA In: VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP, 2014, PATOS. **ANAI DO VII ENCONTRO PARAIBANO DE BIOMEDICINA (EPB) DAS FIP**. PATOS: COOPEX - FIP, 2014. v.5. p.51 - 52

Apresentação de trabalho e palestra

1. SILVA, J. N. O.; **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H.
Atividade antitumoral da casca da romã: uma pesquisa bibliográfica, 2020.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. SILVA, J. N. O.; **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, S. P.
Avaliação da atividade citotóxica da lectina de raiz de Portulaca elatior, 2020.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. SILVA, N. R. G.; MARINHO, A. O.; **ALVES, Robson R. V.**; PAIVA, Patricia M. G.
Avaliação do potencial antitumoral de Adenantha pavonina, 2020. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, N. R. G.; ARAUJO, C. A. S.; SILVA, J. N. O.; SILVA, C. E. S.; PAIVA, Patricia M. G.
Citotoxicidade de sementes de Moringa oleifera frente à células de câncer de mama: uma revisão, 2020. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. SILVA, N. R. G.; MARINHO, A. O.; **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H.
Efeitos de lectinas no potencial de membrana mitocondrial de células tumorais como mecanismo antiproliferativo, 2020. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. SILVA, C. E. S.; **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, A. R.
Terapia do receptor de antígeno quimérico de células T (car T-cells) em neoplasias hematológicas, 2020. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

7. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, N. R. G.; ARAUJO, C. A. S.; SILVA, J. N. O.; SILVA, C. E. S.;

PAIVA, Patricia M. G.

Uso das folhas de Arrabidaea chica frente à leucemia e carcinoma de Ehrlich-Lette: uma revisão, 2020. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

8. ARAUJO, C. A. S.; **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, C. E. S.; ALMEIDA, Maria Margareth Câmara **Uso das folhas de Punica granatum como alternativa ao tratamento de câncer pulmonar**, 2020. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

9. SILVA, N. R. G.; **ALVES, R. R. V.**; SILVA, A. R.; NAPOLEÃO, THIAGO H; PAIVA, PATRÍCIA MG **Adenantha pavonina e suas aplicações na saúde e biotecnologia: uma revisão**, 2019. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

10. **ALVES, RRV**; Santos, E. M. G.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. **Antibacterial activity of Arrabidaia chica leaf extract against isolates of Salmonella enteritidis and Escherichia coli**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

11. SILVA, B. R.; SILVA, P. M.; **ALVES, R. R. V.**; PAIVA, PATRÍCIA MG; NAPOLEAO, T. H. **Antibacterial activity of extract and protein fraction from Punica granatum fruit against human pathogens**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

12. **ALVES, R. R. V.**; Santos, E. M. G.; Prazeres, G. B.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. **Antibacterial activity of Moringa oleifera seed extracts**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

13. SILVA, S. P.; SILVA, J. D.; **ALVES, R. R. V.**; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, PATRÍCIA MG **Anti-Candida activity of Portulaca elatior root lectin**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

14. SILVA, J. N. O.; SILVA, B. R.; SILVA, P. M.; **ALVES, R. R. V.**; PAIVA, PATRÍCIA MG; NAPOLEÃO, THIAGO H **Antifungal activity of extract and its lectin-rich fraction from pomegranate against Candida and Cryptococcus**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

15. **ALVES, R. R. V.**; Prazeres, G. B.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, PATRÍCIA MG **Antifungal activity of Moringa oleifera seed extract**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

16. **ALVES, R. R. V.** **Aplicações de proteínas bioativas na Nanotecnologia**, 2019. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

17. **ALVES, R. R. V.**; Santos, E. M. G.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G. **Atividade hemaglutinante e antibacteriana de extratos de folhas de Morinda citrifolia**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

18. BENTO, ELINALDO FL; **ALVES, R. R. V.**; PAIVA, Patricia M. G.; NAPOLEAO, T. H. **Avaliação de atividade antioxidante e fator de proteção solar do extrato salino de folhas de Portulaca elatior**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

19. SILVA, J. D.; **ALVES, R. R. V.**; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, PATRÍCIA MG **Evaluation of antibacterial activity of ethanolic extracts from Portulaca elatior leaves and stem**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

20. SILVA, J. D.; SILVA, S. P.; **ALVES, R. R. V.**; SILVA, P. M.; PAIVA, PATRÍCIA MG **Evaluation of antibacterial activity of Portulaca elatior root lectin**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

21. AMORIM, Poliana K; **ALVES, R. R. V.**; SILVA, S. P.; SILVA, J. D.; MOURA, Maiara C.; PAIVA, PATRÍCIA MG **Evaluation of antibacterial antibiofilm activities of Bixa orellana leaf lectin**, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

22. **ALVES, R. R. V.**; SILVA, N. R. G.; SILVA, A. R.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, PATRÍCIA MG
Lectinas ovicidas no controle do mosquito *Aedes aegypti*, 2019. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
23. SILVA, A. R.; **ALVES, R. R. V.**; SILVA, N. R. G.; NAPOLEÃO, THIAGO H
Propriedades físico químicas de biomateriais aplicados na regeneração tecidual guiada, 2019. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
24. **ALVES, R. R. V.**; Prazeres, G. B.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Purificação parcial de uma lectina das folhas de *Arrabidaea chica*, 2019. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
25. AMORIM, Poliana K; **ALVES, Robson R. V.**; COSTA, J. A.; SILVA, P. M.; MOURA, Maiara C.; PAIVA, Patricia M. G.; NAPOLEAO, T. H.
Antibacterial Lectin from *Bixa orellana* Leaves, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
26. COSTA, J. A.; **ALVES, Robson R. V.**; AMORIM, Poliana K; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Antimicrobial Activity of Lectin Preparation Leaf from *Chamaesyce hirta*, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
27. **ALVES, Robson R. V.**; COSTA, J. A.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Atividade hemaglutinante, inibidora de tripsina e antibacteriana de extratos de folhas de *Moringa oleifera*, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
28. SILVA, L. L. S.; **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Efeitos de formulação sólida contendo lectina de sementes de *Moringa oleifera* na eclosão de ovos e desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
29. SILVA, P. M.; **ALVES, Robson R. V.**; PAIVA, Patricia M. G.; NAPOLEAO, T. H.
Effects of *Punica granatum* lectin on growth, viability, and aggregation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
30. **ALVES, Robson R. V.**; SILVA, W. S. F. L.; COSTA, J. A.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Influência do pH e da presença de íons na atividade hemaglutinante de extratos de folhas de *Moringa oleifera*, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
31. **ALVES, Robson R. V.**; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Ovicidal activity of lectins against *Aedes aegypti*, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
32. **ALVES, R. R. V.**
Proteínas Inseticidas contra *Aedes aegypti*, 2018. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
33. **ALVES, Robson R. V.**; COSTA, J. A.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, Patricia M. G.
Uso de cromatografia para purificação parcial de lectina presente em extratos de folhas de *Moringa oleifera*, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Demais produções técnicas

1. SILVA, C. E. S.; **ALVES, Robson R. V.** **Lectinas: purificação, caracterização e aplicações biológicas**, 2017. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
2. SILVA, J. D.; **ALVES, R. R. V.** **Produção de Cerveja**, 2017. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. ALINE RODRIGUES DA SILVA SANTOS. **DETERMINAÇÃO DE PERFIL PROTEICO DA INFUSÃO DE SEMENTE DE Moringa oleifera E ATIVIDADE HEMOLÍTICA (Coorientador)**. 2021. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
2. Marcelle Kaliane Nunes de Lima. **INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE Moringa oleifera CONTENDO LECTINA, INIBIDOR DE TRIPSINA E PROTEASES (Coorientador)**. 2021. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
3. Gabryella Borges dos Prazeres. **Toxicidade subaguda de fração proteica de folhas de Moringa oleifera (Coorientador)**. 2021. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
4. Luiz da Silva Maia Neto. **Prevalência de Dislipidemias em Camundongos Swiss com Diabetes Mellitus induzido por Aloxana-monohidratada (Coorientador)**. 2015. Curso (Biomedicina) - Faculdades Integradas de Patos

Iniciação científica

1. Gabryella Borges dos Prazeres. **Tutor PIBIC - UFPE - CNPq**. 2019. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
2. Amanda Luiza Tomaz Soares da Silva. **Tutor PIBIC - FACEPE**. 2018. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
3. Marcelle Kaliane Nunes Lima. **Tutor PIBIC - UFPE - CNPq**. 2018. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
4. Gabryella Borges dos Prazeres. **Tutor PIBIC - UFPE - CNPq**. 2018. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
5. Bárbara Stefany da Silva Souza. **Tutor PIBIC - FACEPE**. 2017. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
6. Ricardo Sales Roldan Filho. **Tutor PIBIC - UFPE - CNPq**. 2017. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **1st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry – Drugs for Infectious Diseases and Cancer**, 2019. (Simpósio)
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF Moringa oleifera SEED EXTRACTS.
2. **CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE**, 2019. (Congresso)
LECTINAS OVICIDAS NO CONTROLE DO MOSQUITO Aedes aegypti.

3. **I ENCONTRO PERNAMBUCANO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA: CONHECENDO PERNAMBUCO**, 2019. (Encontro)

4. **VII Encontro Nacional de Moringa**, 2018. (Encontro)
ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE, INIBIDORA DE TRIPSINA E ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera*.

5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIV Reunião Regional SBBq**, 2018. (Congresso)
Effects of *Punica granatum* lectin on growth, viability, and aggregation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates.

6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **2 Fórum Pernambucano de Avaliações de Tecnologias em Saúde**, 2017. (Congresso)
Prevalência de Hipertensão Arterial em Pacientes com Insuficiência Renal Crônica em Tratamento Hemodialítico.

7. **Seminário Técnico de Cromatografia**, 2017. (Seminário)

8. **Fundamentos de Microscopia**, 2016. (Outra)

Organização de evento

1. **ALVES, R. R. V.**; NAPOLEAO, T. H.
SIMPROT - Simpósio de Bioquímica de Proteínas, 2019. (Congresso, Organização de evento)

2. **ALVES, Robson R. V.**
I Congresso Pernambucano de Fisiologia e Cognição, 2018. (Congresso, Organização de evento)

3. **ALVES, Robson Raion de Vasconcelos**; PAIVA, Patricia M. G.; NAPOLEAO, T. H.
VI Encontro Nacional da Moringa, 2016. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **ALVES, Robson R. V.**; NEVES, M. L. C.; FONSECA, R. A. S. Participação em banca de Gabrielli Maria Ferreira de Oliveira. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato salino da folha de *Morinda citrifolia***, 2018. (Microbiologia Clínica) Universidade de Pernambuco

Graduação

1. NAPOLEAO, T. H.; BUONAFINA, M. D.; **ALVES, R.R.V.** Participação em banca de Thaiany Myllena Domingues Matoso. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos de folha de *Bixa orellana* L. em espécies de *Tricophyton***, 2021. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

2. ARAUJO, L. C. C.; PAIVA, Patricia M. G.; **ALVES, R.R.V.** Participação em banca de Ana Gabrielle Barros Silva. **Avaliação da toxicidade em doses repetidas e genotoxicidade da infusão das folhas de *Moringa oleifera* Lam**, 2021. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

3. NAPOLEAO, T. H.; AMORIM, Poliana K; **ALVES, R.R.V.** Participação em banca de Clarice Barbosa Lucena da Costa. **Avaliação de atividades antioxidante e fotoprotetora e da toxicidade aguda in vivo de extratos salinos de *Portulaca elatior***, 2021. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

4. GOMES, B. S.; SANTANA, F. C.; **ALVES, R.R.V.** Participação em banca de MARIA CLARA BEZERRA ALÍPIO. **PROPAGAÇÃO DE FAKE NEWS SOBRE A EFICÁCIA DO KIT COVID: EFEITOS E CONSEQUÊNCIAS SOBRE O USO DE MEDICAMENTOS SEM COMPROVAÇÃO CIENTÍFICA CONTRA A COVID-19.**, 2021. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
5. **ALVES, R.R.V.**; FERREIRA, G. R. S.; NAPOLEAO, T. H. Participação em banca de Beatriz Rodrigues da Silva. **AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA LECTINA DA SARCOTESTA DE Punica granatum (PgTeL) CONTRA CEPAS DE Escherichia coli PRODUTORAS DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs).**, 2020. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
6. **ALVES, R. R. V.**; PAIVA, Patricia M. G. Participação em banca de Stella Cristina Cabral da Silva. **EFICIÊNCIA LARVICIDA E OVICIDA DE COMPRIMIDOS CONTENDO FRAÇÃO DE SEMENTE DE Moringa oleifera NO CONTROLE DE Aedes aegypti**, 2019. (Farmácia) Universidade Federal de Pernambuco
7. PAIVA, Patricia M. G.; VILELA, L. M.; **ALVES, Robson R. V.** Participação em banca de Ricardo Salas Roldan-Filho. **Prospecção e potencial antimicrobiano de biomoléculas ativas de Croton heliotropiifolius Kunth e Euphorbia tirucalli Linn (Euphorbiaceae).**, 2019. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
8. **ALVES, Robson R. V.**; PAIVA, Patricia M. G.; MOURA, Maiara C. Participação em banca de Juliane Nancy de Oliveira Silva. **Atividade antibacteriana da lectina isolada da sarcotesta de Punica granatum (PgTeL) contra Listeria monocytogenes**, 2018. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
9. PAIVA, Patricia M. G.; **ALVES, Robson R. V.** Participação em banca de Matheus Cavalcanti de Barros. **Investigação das atividades citotóxicas e genotóxicas do extrato aquoso e lectinas das sementes de Moringa oleifera**, 2018. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **Comissão de Avaliação dos Trabalhos Desenvolvidos no Centro de Iniciação Científica do Colégio Santa Maria**, 2019. Colégio Santa Maria
2. **I Simpósio de Proteínas Bioativas da UFPE**, 2019. Universidade Federal de Pernambuco
3. **III Jornada de Inovação e Pesquisa da UNISÃO MIGUEL e FOCCA**, 2019. UNISÃO MIGUEL
4. **A ESTRATÉGIA DE SAÚDE DA FAMÍLIA COMO CENÁRIO PRIVILEGIADO PARA AS PRÁTICAS DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA - Avaliador online**, 2018. Instituto Federal de Pernambuco
5. **AS INFLUÊNCIAS DA VITAMINA D NA SAÚDE DOS PACIENTES PORTADORES DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) - Avaliador online**, 2018. Instituto Federal de Pernambuco
6. **AS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES MOLECULARES NA MICROBIOTA E NOS LINFÓCITOS T CD4 DECORRENTES DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) - Avaliador online**, 2018. Instituto Federal de Pernambuco
7. **Comissão de Avaliação dos Trabalhos Desenvolvidos no Centro de Iniciação Científica do Colégio Santa Maria**, 2018. Colégio Santa Maria
8. **I Congresso Pernambucano de Fisiologia e Cognição**, 2018. Universidade Federal de Pernambuco

9. **II Jornada de Inovação e Pesquisa da UNISÃOMIGUEL e FOCCA**, 2018. UNISÃOMIGUEL
10. **II Simpósio Pernambucano de Biociências - Apresentações orais de resumos expandidos**, 2018. Universidade Federal de Pernambuco
11. **II Simpósio Pernambucano de Biociências - Apresentações orais de resumos simples**, 2018. Universidade Federal de Pernambuco
12. **II Simpósio Pernambucano de Biociências - Avaliador online**, 2018. Universidade Federal de Pernambuco
13. **XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE - JEPEX 2018**, 2018. Universidade Federal Rural de Pernambuco
14. **XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE - JEPEX 2018 (Online)**, 2018. Universidade Federal Rural de Pernambuco