



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**CLIDIA EDUARDA MOREIRA PINTO**

**BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA *Mo*-CBP<sub>3</sub> DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lam: UMA CANDIDATA PARA O  
DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS**

FORTALEZA-CE

2014

CLIDIA EDUARDA MOREIRA PINTO

BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA *Mo*-CBP<sub>3</sub> DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lam.: UMA CANDIDATA PARA O  
DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Co-orientador: Dr. Davi Felipe Farias

FORTALEZA-CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

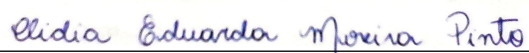
- 
- P727b Pinto, Clidia Eduarda Moreira.  
Biossegurança alimentar da proteína antifúngica Mo-CBP3 de sementes de *Moringa oleifera* Lam: uma candidata para o desenvolvimento de plantas transgênicas / Clidia Eduarda Moreira Pinto. – 2014.  
119 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.  
Orientação: Prof. Dr. Ilka Maria Vasconcelos.  
Coorientação: Dr. Davi Felipe Farias.
1. Biossegurança alimentar. 2. Ação antifúngica. 3. Proteínas. 4. Quitina. 5. Toxicidade. I. Título.

---

CDD 574.192

Esta dissertação de Mestrado foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.



Clidia Eduarda Moreira Pinto


Dissertação aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

### BANCA EXAMINADORA



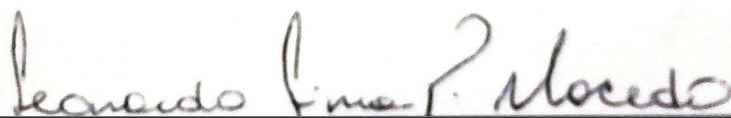
Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos - (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Davi Felipe Farias - (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA-CENARGEN)

Aos meus avós-pais (em memória) e aos meus pais, Maria Lidia e Francisco Eduardo, por todo amor dedicado.

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, minha fortaleza, sem o qual eu não ousaria viver. Obrigada pela vida maravilhosa, pela maneira como me proteges a cada dia, por minhas conquistas, pela minha família e pelas pessoas maravilhosas que tenho em minha volta. Sou grata pela oportunidade de vida material e espiritual.

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos**, por ter me acolhido tão gentilmente em seu laboratório e ter confiado no meu trabalho. Agradeço pelos valiosos ensinamentos, carinho, incentivo e pela agradável convivência. Por ser um exemplo de cientista ética e por sempre zelar pela formação criteriosa de seus estudantes. Obrigada pela paciência e dedicação em orientar-me com excelência. A senhora sempre terá um lugar especial em minha vida. Muito Obrigada.

Ao meu querido Co-orientador, **Dr. Davi Felipe Farias**, pela criteriosa orientação e por se comprometer de forma efetiva para a realização desse trabalho. Obrigada ainda pelo carinho, incentivo, convivência harmoniosa, momentos de descontração e pelos conselhos pessoais e profissionais. Você conquistou minha admiração e carinho.

À **Profa. Dra. Ana de Fátima**, pelo seu exemplo como profissional, por sempre me receber de forma alegre em seu laboratório e disponibilizá-lo para a realização de boa parte dos experimentos que compõem este trabalho. Agradeço também pela grande colaboração nas correções deste trabalho.

Ao **Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo**, inicialmente, por aceitar participar da minha banca examinadora e pelas contribuições na avaliação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Tadeu**, pelos ensinamentos e por se mostrar sempre solícito a esclarecer minhas dúvidas. Por ser, a meu ver, um verdadeiro cientista, acima de tudo, ético.

À **Profa. Dra. Daniele Sousa**, pelos momentos de descontração, apoio durante o mestrado e na execução deste trabalho e pela torcida a cada experimento realizado.

À família **Labtox**, Juliana Gifoni, Henrique Pinho, Helen Paula, Vanessa Duarte, Lucas Pinheiro, Tarcymara, Raquel Rocha, Mariana, Xavier, Tiago, Ana Paula, Bella, Isabelle, Nadine e Marina Gabriele pelos momentos de descontração, risadas e apoio direto ou indireto durante o mestrado. Em especial, queria agradecer à Mirella por todos os ensinamentos e pelo apoio incondicional desde o início do mestrado. E ao Paulo Carvalho, por sempre estar disposto a me ajudar nos experimentos, pelos momentos alegres no dia a dia do laboratório e pelas discussões científicas.

À **Dra. Janne Keila**, pelos ensinamentos durante o tempo que passava no laboratório quando vinha da Alemanha. Obrigada pelo apoio e sorriso cativante e sincero.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção: Martônio, Luís Carlos, Thiago, Lady Clarissa, Leonardo, Pedro, Naiana, Nathanna, Igor e Berenice que sempre se dispuseram a me ajudar durante a realização dos experimentos. Obrigada pela ótima convivência, por sempre me receberem com alegria e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, pelo apoio durante a realização deste trabalho: Thiago, Handerson, Fredy e Pedro.

Aos amigos que conquistei durante minha jornada no mestrado que foram imprescindíveis para essa conquista. Os levarei sempre comigo e sentirei muitas saudades: Rodolpho Guedes, Aline Cipriano, Anna Lídia, Ana Luíza Paiva e Iara Flávia.

Ao amigo **Rodolpho Guedes** pela amizade verdadeira e eterna, pelo carinho e apoio. Por tornar meus dias estressantes em dias mais alegres e me fazer enxergar soluções onde parecia não ter. Por ser uma luz em minha vida. Por contribuir de forma direta para realização desse trabalho.

À **Aline Cipriano**, minha companheira de estudos e diálogos. Por ser uma pessoa incrível, dedicada, responsável e acima de tudo humilde.

À **Anna Lídia Varela**, pelos momentos de alegria, conselhos, excelente convivência e apoio dentro e fora da Universidade. Por seu sorriso sincero que conquistou meu carinho.

À **Ana Luíza Paiva**, pelo carinho e motivação nas horas de desânimo. Por suas palavras sempre agradáveis e pelos conhecimentos trocados na disciplina de Bioquímica.

À **Iara Flávia**, pelo carinho e apoio sempre demonstrados. Por estar disposta a ajudar quando precisei e pelas palavras de incentivo.

Ao meu amigo, irmão, **Hudson Fernando**, pela amizade verdadeira, sincera e eterna baseada no respeito e no diálogo. Pelo apoio incondicional antes e durante o mestrado. Pela convivência harmoniosa, conselhos sábios e por tornar minha vida mais alegre.

À **Karina Nunes**, pelo amor, companheirismo, dedicação e cumplicidade. Por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando. Por tornar cada momento da minha vida, mágico.

Ao **Felipe Fernandes**, pelo apoio incondicional, pelos momentos agradáveis e felizes que me ajudaram a encarar com mais leveza todos os obstáculos.

À **Jasmine Castro**, pela ótima convivência em casa, pela amizade, por suas palavras de conforto e de incentivo e pelo apoio de sempre.

Ao **Lucas Pinheiro**, meu amigo de longas datas, pelo incentivo, torcida e apoio dentro e fora do laboratório.

À **Ana Karla Moreira** e **Juliana Ribeiro**, pelo carinho, incentivo e momentos de descontração.

Aos meus pais, **Maria Lídia** e **Francisco Eduardo**, que nutrem minha vida com amor infinito e que enchem meus dias com carinho. Meu porto seguro, meu exemplo e a grande razão do meu viver. Que me ensinam diariamente, apesar da distância, a enfrentar as dificuldades da vida e não medem esforços para que eu alcance meus objetivos. Pela atenção dedicada, por acreditarem em minha capacidade, torcerem pelo meu sucesso e por entenderem as muitas vezes que abdiquei de suas presenças em prol dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, **Kayque Eduardo** e **Francisco Filho**, provas vivas de que o amor simplesmente existe. Obrigada pela dedicação e companheirismo.

À minha princesa, sobrinha, **Anna Elise**, minha mais nova fonte de inspiração, amor, dedicação e felicidade.



À Minha tia **Socorro Brito** maior exemplo de determinação e companheirismo. Pelo apoio e esforços dedicados à realização dessa e de outras conquistas.

Aos demais amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente para realização dessa conquista: Tia Zilda, Tio José Ribamar, Madrinha Solimar, Márcio Brito, Djane, Handerson, Nunes, Adrienny, Adriana, Maria Josélia, Francisco Neres, Marcos Régis, Valdileide, Ana Carolina Dias, Tatiana Barreto, Tia Leudimar, Tâmara, Maykon, Francisca Maria, Vó Cíllria, Tio José, Marta Leyanne, Virgínia. Obrigada a todos.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

**Universidade Federal do Ceará** - Laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos, e Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) do Departamento de Biologia, sob a coordenação da Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** - através da concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora do trabalho e, também, auxílio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

**Demais Instituições de Fomento e Apoio à Pesquisa** - CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

## RESUMO

*Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma proteína ligante à quitina, purificada de sementes de *Moringa oleifera*, com massa molecular aparente de 18,0 kDa, consistindo de múltiplas isoformas heterodiméricas. *Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma proteína altamente estável, que possui amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos e mantém sua estrutura secundária e atividade antifúngica em extremos de temperaturas e diferentes valores de pH. Dessa forma, a proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> se apresenta como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de fungos. Para tanto, *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi submetida a testes de biossegurança alimentar, visando garantir sua utilização através da expressão em plantas, minimizando, assim, os riscos para animais não alvo, incluindo o homem. A avaliação de biossegurança alimentar da proteína seguiu o teste de duas etapas, baseado em pesos de evidência, proposto pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI). A pesquisa evidenciou o longo histórico de uso seguro, fundamentado em dados científicos, da espécie *M. oleifera*, fonte da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>. Análises *in silico* mostraram que *Mo*-CBP<sub>3</sub> não possui qualquer identidade com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais. Adicionalmente, não foram encontrados na proteína epítomos potencialmente capazes de promover reação cruzada e desencadear uma resposta alergênica. Identidade com proteínas alergênicas (> 35%) foi encontrada apenas quando uma janela de 80 aminoácidos foi utilizada. Sítios potenciais de *N*-glicosilação não foram encontrados na proteína madura. A proteína mostrou resistência ao tratamento térmico e à digestibilidade por fluido gástrico simulado, mas foi completamente susceptível à digestão em fluido intestinal simulado. Em adição, *Mo*-CBP<sub>3</sub> não causou efeitos adversos relevantes em camundongos submetidos a doses elevadas de 5 a 2000 mg/kg, via oral, evidenciando seu caráter inócuo. A partir da avaliação de biossegurança alimentar proposta pelo ILSI não é esperado qualquer risco associado ao consumo da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> pelo homem e demais animais monogástricos.

**Palavras-chave:** Análise de risco; Proteína ligante à quitina; Atividade antifúngica; Bioinformática; Toxicidade.

## ABSTRACT

*Mo*-CBP<sub>3</sub> is a chitin binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds which has an apparent molecular mass of 18.0 kDa and consists of multiple heterodimeric isoforms. *Mo*-CBP<sub>3</sub> is a highly stable protein that has a broad spectrum of activity against phytopathogenic fungi and maintains its secondary structure and antifungal activity at extreme temperatures and different pH values. Thus, the *Mo*-CBP<sub>3</sub> protein presents itself as a promising tool for the development of transgenic plants resistant to fungi attack. For such purpose, the *Mo*-CBP<sub>3</sub> protein was subjected to food safety tests to ensure the safety of its expression in plants, minimizing the risk to non-target animals, which include human beings. The food safety assessment of the protein followed the two-tiered approach, based on weight of evidences, proposed by International Life Sciences Institute (ILSI). The research evidenced the long history of safe use, supported by scientific literature, of the *M. oleifera* species, source of *Mo*-CBP<sub>3</sub> protein. *In silico* analysis did not reveal any identity of *Mo*-CBP<sub>3</sub> with allergenic, toxic and/or antinutritional proteins. Additionally, were not found in the protein potential epitopes able to lead to cross reaction and unleash an allergic response. Identity with allergenic proteins was found only when a window of 80 amino acids was used. Potential sites of *N*-glycosylation were not found in the mature protein. The protein showed resistance to thermal treatment and digestibility by simulated gastric fluid, but was completely susceptible to digestion in simulated intestinal fluid. In addition, *Mo*-CBP<sub>3</sub> caused no relevant adverse effects to mice subjected to high oral doses from 5 to 2000 mg/kg, showing its innocuous nature. Based on the food safety approach proposed by ILSI is not expected any risk associated to use of *Mo*-CBP<sub>3</sub> protein for humans and other monogastric animals.

**Keywords:** Risk analysis; Chitin-binding protein; Antifungal activity; Bioinformatics; Toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1 - Culturas economicamente importantes atacadas por fungos fitopatogênicos   | 21     |
| Figura 2 - <i>Moringa oleifera</i> Lamarck   | 27     |
| Figura 3 - Países com culturas transgênicas em 2013  | 34     |
| Figura 4 - Abordagem em duas etapas baseada em pesos de evidência para avaliação de biossegurança alimentar de novas proteínas   | 38     |
| Figura 5 - Sequência primária das quatro isoformas da proteína <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>   | 43     |
| Figura 6 - Esquema geral de purificação de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> a partir de sementes de <i>M. oleifera</i>  | 47     |
| Figura 7 - Pesquisa de sítios potenciais de <i>N</i> -glicosilação na sequência primária da proteína <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>   | 68     |
| Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração albumina, obtida a partir do extrato total de sementes de <i>M. oleifera</i> , em matriz de quitina   | 72     |
| Figura 9 - Perfil cromatográfico da fração proteica retida em matriz de quitina (P <sub>AC</sub> ) em matriz de CM-Sepharose Fast Flow   | 73     |
| Figura 10 - Perfil eletroforético de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>   | 74     |
| Figura 11 - Digestibilidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> em fluido gástrico simulado - FGS. (A) PAGE-SDS; (B) "Western Blot"   | 76     |
| Figura 12 - Digestibilidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> em fluido intestinal simulado - FIS. (A) PAGE-SDS; (B) "Western Blot"   | 77     |
| Figura 13 - Estabilidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> submetida à temperatura de 100 °C por diferentes tempos  | 78     |
| Figura 14 - Ganho de peso corpóreo (g) de camundongos fêmeas administradas oralmente com a proteína <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> e água destilada como veículo (controle) durante 14 dias | 80     |

## LISTA DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabela 1 - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro da espécie <i>M. oleifera</i>   | 55     |
| Tabela 2 - Pesquisa de similaridade da sequência primária de aminoácidos das isoformas da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não especializados) de proteínas | 61     |
| Tabela 3 - Pesquisa de similaridade da sequência total de aminoácidos codificados, incluindo o peptídeo sinal, das quatro isoformas da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> em banco de dados de proteínas alergênicas                          | 65     |
| Tabela 4 - Pesquisa de similaridade da sequência primária de aminoácidos (cadeia A + “linker” + cadeia B) das quatro isoformas da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> em banco de dados de proteínas alergênicas                               | 66     |
| Tabela 5 - Etapas de purificação de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> , com os respectivos teores e rendimentos proteicos   | 71     |
| Tabela 6 - Verificação da mortalidade e de sinais de toxicidade, após 24 h e 14 dias, em camundongos submetidos ao teste de toxicidade aguda, via oral, da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>   | 79     |
| Tabela 7 - Peso úmido relativo (%) dos órgãos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> e com água destilada como veículo (controle)      | 81     |
| Tabela 8 - Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> e com água destilada como veículo (controle)                | 84     |
| Tabela 9 - Parâmetros séricos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> e com água destilada como veículo (controle)                      | 86     |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| ADFS            | “Allergen Database for Food Safety” (Base de Dados para Biossegurança Alimentar)   |
| ALT             | Alanina Aminotransferase   |
| AMP             | “Antimicrobial Peptides” (Peptídeos antimicrobianos)   |
| CM              | Carboximetil   |
| CAC             | “Codex Alimentarius Commission” (Comissão do Codex Alimentarius)   |
| cMoL            | “Coagulant <i>Moringa oleifera</i> lectin”   |
| ConA            | Concanavalina A  |
| ConBr           | “ <i>Canavalia brasiliensis</i> Lectin” (Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> )  |
| HOSU            | “History of Safe Use” (Histórico de Uso Seguro)  |
| HDL             | “High Density Lipoprotein” (Lipoproteína de Alta Densidade)  |
| IgE             | Imunoglobulina E   |
| ISAAA           | Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agrobiotecnológicas   |
| LDL             | “Low density Lipoprotein” (Lipoproteína de Alta Densidade)   |
| Mo-CBP          | “ <i>Moringa oleifera</i> - Chitin Binding Protein” ( <i>Moringa oleifera</i> - Proteína Ligante à Quitina)                        |
| NCBI            | “National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)                                     |
| OGM             | Organismo(s) Geneticamente Modificado(s)   |
| P <sub>AC</sub> | Pico eluído com ácido acético  |
| PAGE            | “Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)   |
| PHA             | “ <i>Phaseolus vulgaris</i> agglutinin” (aglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> )   |
| PR-proteins     | “Pathogenesis-related proteins” (Proteínas relacionadas à patogênese)  |
| RDW-CV          | “Red Cell Distribution Width - Coefficient Variation” (Amplitude de Distribuição das Hemácias medido como Coeficiente de Variação) |

|        |  |
|--------|--|
| RDW-SD | “Red Cell Distribution Width - Standard Deviation” (Amplitude de Distribuição das Hemácias medido como Desvio Padrão)                          |
| SBA    | “Soybean Agglutinin” (Aglutinina de soja)  |
| SBL    | “Soybean Lectin” (Lectina de soja)   |
| SDS    | “Sodium dodecyl sulfate” (Dodecil sulfato de sódio)  |
| SDAP   | “Structural Database of Allergenic Proteins” (Base de Dados Estrutural para Proteínas Alergênicas)   |
| Tris   | Tris (hidroximetil) aminometano  |
| TFFBT  | “Intergovernmental Task Force on Food Derived from Biotechnology” (Força Tarefa Intergovernamental sobre Alimentos Derivados de Biotecnologia) |
| VLDL   | “Very Low Density Lipoproteins” (Lipoproteínas de densidade muito baixa)   |
| WGA    | “Wheat Germ Agglutinin” (aglutinina de germe de trigo)   |
| WSMol  | “Water Soluble <i>Moringa Oleifera</i> Lectin” (Lectina solúvel em água de <i>Moringa oleifera</i> )   |



## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | 17     |
| <b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>   | 20     |
| 2.1 Fungos fitopatogênicos e perdas agrícolas  | 20     |
| 2.2 Proteínas antifúngicas no contexto da biotecnologia agrícola.  | 23     |
| 2.3 <i>Moringa oleifera</i> Lamarck  | 26     |
| 2.3.1 Considerações gerais   | 26     |
| 2.3.2 Usos e aplicações de <i>M. oleifera</i>  | 28     |
| 2.4 <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> : Proteína ligante à quitina obtida das sementes de <i>M. oleifera</i>   | 31     |
| 2.5 Plantas geneticamente modificadas e biossegurança alimentar  | 33     |
| <b>3 HIPÓTESE E OBJETIVOS</b>  | 39     |
| 3.1 Hipótese   | 39     |
| 3.2 Objetivo geral   | 39     |
| 3.3 Objetivos específicos  | 39     |
| <b>4 MATERIAIS</b>   | 40     |
| 4.1 Sementes   | 40     |
| 4.2 Animais de laboratório e alojamento  | 40     |
| 4.3 Reagentes químicos e outros materiais  | 40     |
| <b>5 MÉTODOS</b>   | 42     |
| 5.1 Levantamento do histórico de uso seguro da espécie <i>M. oleifera</i>  | 42     |
| 5.2 Similaridade da sequência de aminoácidos e busca por sítios potenciais de <i>N</i> -glicosilação   | 42     |
| 5.2.1 Sequência primária das isoformas de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>  | 42     |
| 5.2.2 Análise de similaridade entre as sequências de aminoácidos de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais | 44     |

|   |     |
|---|-----|
| <b>5.2.3 Pesquisa por sítios potenciais de <i>N</i>-glicosilação</b>  | 45  |
| <b>5.3 Obtenção e caracterização da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub></b>  | 45  |
| <b>5.3.1 Purificação da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub></b>  | 45  |
| <b>5.3.2 Determinação de proteínas</b>  | 48  |
| <b>5.3.3 Análise da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub> em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (PAGE-SDS)</b> | 48  |
| <b>5.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-PAGE-SDS)</b>                            | 49  |
| <b>5.3.5 Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i> da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub></b>                      | 49  |
| <b>5.3.6 Determinação da estabilidade à temperatura da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub></b>                           | 50  |
| <b>5.4 Ensaio de toxicidade aguda (dose única) via oral da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub> em camundongos</b>        | 51  |
| <b>5.4.1 Determinação de parâmetros hematológicos</b>   | 52  |
| <b>5.4.2 Determinação de parâmetros bioquímicos</b>   | 52  |
| <b>5.4.3 Determinação do peso úmido relativo de órgãos internos e histopatologia</b>                                    | 53  |
| <b>5.4.4 Análise estatística</b>  | 53  |
| <b>6 Resultados</b>   | 54  |
| <b>6.1 Histórico de uso seguro da espécie <i>M. oleífera</i></b>  | 54  |
| <b>6.2 Análises <i>in silico</i></b>  | 60  |
| <b>6.3 Obtenção e caracterização da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub></b>  | 70  |
| <b>6.3.1 Digestibilidade <i>in vitro</i> e estabilidade à temperatura</b>   | 75  |
| <b>6.4 Ensaio de toxicidade aguda (dose única) via oral da proteína <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub> em camundongos</b>        | 79  |
| <b>7 DISCUSSÃO</b>  | 88  |
| <b>8 CONCLUSÃO</b>  | 101 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | 102 |

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios da agricultura moderna é conseguir um controle eficaz e duradouro para fungos patogênicos (COLLINGE *et al.*, 2010). Os fungos são responsáveis por grandes perdas na agricultura. Um valor estimado de 10-12% do rendimento das colheitas é perdido devido a doenças fúngicas (STRANGE; SCOTT, 2005). Doenças provocadas por fungos são muitas vezes catastróficas, resultando em enorme destruição de colheitas e escassez de alimentos (BOYD *et al.*, 2013). Normalmente, os fungos fitopatogênicos são controlados através do uso de fungicidas sintéticos. No entanto, o uso desses produtos químicos é acompanhado por uma série de problemas, tais como a diminuição de sua eficácia devido ao surgimento de resistência e efeitos indesejados para o ambiente e à saúde humana (HARRIS; RENFREW; WOOLRIDGE, 2001; PRETTY, 2008).

Considerando que a homeostase vegetal é afetada por interações complexas entre planta, patógeno e ambiente, métodos mais eficazes de controle de fungos fitopatogênicos são necessários, tendo em vista que o controle químico muitas vezes não é eficiente. Dentre as principais alternativas aos fungicidas químicos, as proteínas antifúngicas de origem vegetal têm recebido atenção especial devido ao seu potencial de aplicação na agricultura e por se tratarem de compostos com baixo ou mesmo nenhum impacto sobre o ambiente (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; BORAD; SRIRAM, 2008; YADAV *et al.*, 2013). A utilização de moléculas de natureza proteica no combate a pragas da agricultura ganhou impulso com o advento da tecnologia do DNA recombinante. Vários estudos descrevem a eficácia de proteínas antifúngicas expressas em plantas modelo ou de interesse econômico (GAO *et al.*, 2000; JHA; CHATTOO, 2010; KIBA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2014).

Neste contexto, a espécie *Moringa oleifera* Lamarck apresenta-se como uma planta candidata à busca de compostos bioativos, uma vez que é bastante resistente a doenças, sendo afetada por poucas espécies de insetos e capaz de inibir o crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; GIFONI *et al.*, 2012). Nessa perspectiva, nosso grupo de pesquisa, há cerca de uma década atrás, iniciou uma série de estudos com a *M. oleifera*. A partir de então, foi demonstrado, inicialmente, o potencial antifúngico de

extratos aquosos de suas sementes e, posteriormente, de proteínas ligantes à quitina detectadas nesse material (GOMES, 2002; GIFONI, 2005).

Recentemente, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, denominada de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, foi purificada e caracterizada bioquimicamente. *Mo-CBP<sub>3</sub>* apresenta massa molecular em torno de 12,4 kDa e ponto isoelétrico de 10,8. É uma glicoproteína com 2,5% de carboidratos e consiste de múltiplas isoformas heterodiméricas, composta por duas cadeias polipeptídicas distintas, unidas por pontes dissulfeto, uma cadeia menor ou A (4,1 kDa) e uma cadeia maior ou B (8,3 kDa). Além disso, foi mostrado que *Mo-CBP<sub>3</sub>* possui amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos. *Mo-CBP<sub>3</sub>* é altamente estável, mantendo sua estrutura secundária e atividade antifúngica em extremos de temperatura e diferentes valores de pH (GIFONI, 2009; GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013; FREIRE, 2013).

Nesse contexto, a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* apresenta-se como uma ferramenta promissora a ser inserida no contexto da biotecnologia agrícola para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de fungos, tendo em vista os desafios enfrentados pela produção de alimento, a exemplo da diminuição de áreas agriculturáveis, mudanças climáticas e redução do rendimento das culturas devido a ataques de fungos patogênicos. Além disso, o crescimento acelerado da população mundial tem resultado em um conseqüente aumento da demanda por alimentos. Entretanto, para que qualquer proteína exógena seja introduzida em culturas agrícolas através da tecnologia do DNA recombinante, a mesma deve ser submetida a testes de biossegurança alimentar para garantir a segurança de sua expressão, minimizando, assim, os riscos decorrentes de seu consumo por animais não alvo, o que inclui o homem. Nesse âmbito, o Instituto Internacional de Ciências da Vida desenvolveu uma abordagem amplamente aceita pela comunidade científica, e mais flexível que aquela proposta pela FAO/WHO, para avaliação de novas proteínas (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Essa abordagem recomenda a avaliação da biossegurança alimentar em duas etapas, ambas contemplando diferentes análises, e sugere que o valor preditivo dado a cada evidência obtida seja bem compreendido, a fim de atribuir maior relevância a certos dados, acrescentando uma maior confiança à avaliação completa (DELANEY *et al.*, 2008). Nesse sentido, esta dissertação se propõe a responder o seguinte questionamento:

- Tendo em vista a perspectiva de utilização da *Mo*-CBP<sub>3</sub> como alternativa na transformação de plantas, tornando-as resistentes ao ataque de fungos fitopatogênicos, esta proteína seria segura para o consumo humano e de animais?

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Fungos fitopatogênicos e perdas agrícolas

Os fungos são um grupo extremamente diversificado de organismos, com cerca de 1,5 - 5,1 milhões de espécies distribuídas em todos os ecossistemas da Terra. Esses organismos são capazes de colonizar plantas, seres humanos e animais, utilizando-os como substratos (BORAD; SRIRAM, 2008; BLACKWELL, 2011).

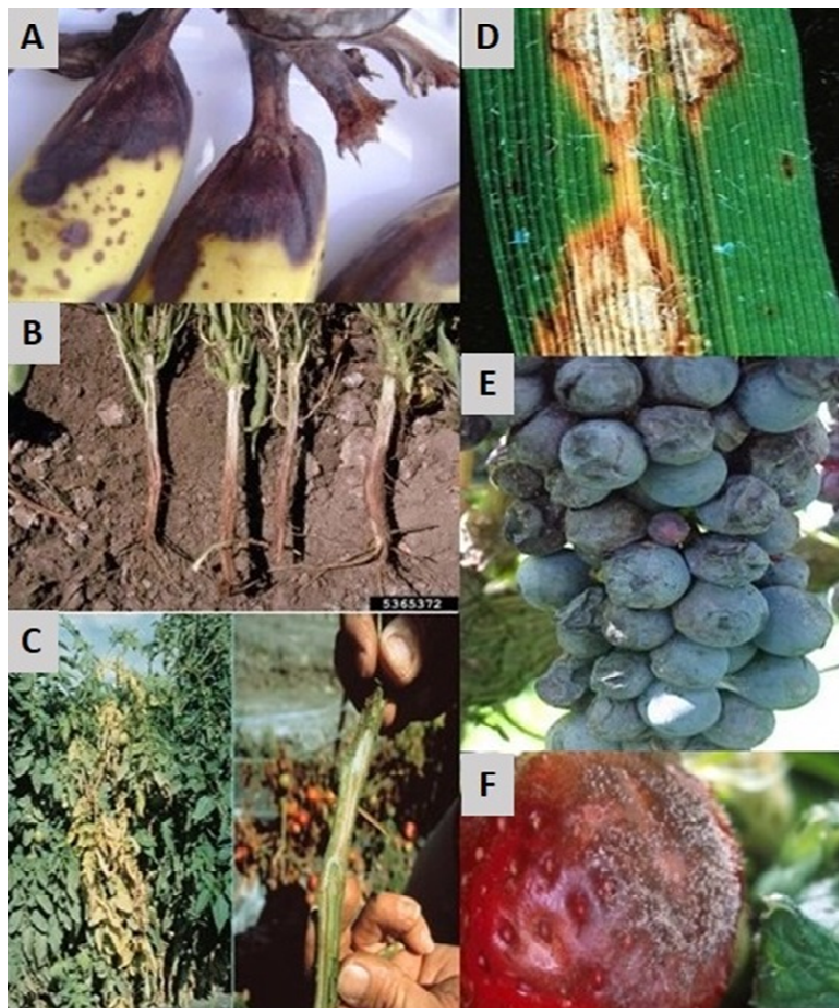
Os fungos são responsáveis pela grande maioria das doenças que acometem as plantas, causando danos em várias culturas e diminuindo sua produtividade (MANDAL *et al.*, 2013; LABANDEIRA; PREVEC, 2014). Perdas devido a doenças ocasionadas por esses organismos foram estimadas em torno de 12% da produção potencial das culturas (LEE *et al.*, 2003). As perdas podem ocorrer durante a pré- ou pós-colheita, no armazenamento, transporte e na industrialização.

As várias espécies de fungos que atacam as plantas e ocasionam grandes perdas na agricultura afetam consequentemente a economia mundial. Espécies de fungos como *Aspergillus niger*, *Blumeria graminis*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Magnaporthe oryzae*, *Puccinia graminis*, *Rhizopus stolonifer*, *Thanatephorus cucumeris*, são algumas, entre centenas delas, que promovem doenças e podridões durante a produção e o armazenamento de grãos, como arroz, feijão, milho, soja, trigo, dentre outros (UTKHEDE; BOGDANOFF, 2003; DEAN *et al.*, 2012) (Figura 1). De fato, as doenças fúngicas têm sido um dos principais entraves na produção agrícola, causando, além de perdas severas, alterações durante as fases de desenvolvimento e problemas de qualidade relacionados aos aspectos nutricionais e características organolépticas (AGRIOS, 2005; AMMAR; NENAAH; MOHAMED, 2013).

O gênero *Colletotrichum*, que engloba várias espécies, incluindo *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum* e *C. musae*, é um dos gêneros mais comuns e importantes de fungos patogênicos de plantas. Praticamente, todas as plantas cultivadas no mundo são suscetíveis a uma ou mais espécies de *Colletotrichum*. Estes fungos são conhecidos por causarem a doença

denominada de antracnose, resultando em grandes prejuízos às culturas de importância econômica, especialmente frutas, legumes e plantas ornamentais (SILVA, 2011; DEAN *et al.*, 2012; SIDDIQUI; ALI, 2014).

Figura 1 - Culturas economicamente importantes atacadas por fungos fitopatogênicos



Fonte: <http://agrolink.com.br/agricultura/problemas>. A - Banana com sintomas de antracnose (*C. musae*); B - Podridão nas raízes de feijão (*F. solani*); C - Tomate com sintomas da murcho de *Fusarium* (*F. oxysporum*); D - Brusone em arroz (*M. oryzae*); E - Antracnose em uvas (*C. gloeosporioides*); F - Mofo cinzento em morango (*B. cinerea*).

As espécies do gênero *Fusarium*, por exemplo, também são responsáveis por grandes perdas na agricultura. *F. oxysporum* é um patógeno do solo que provoca murcha vascular em uma grande variedade de plantas. Os sintomas característicos da doença incluem escurecimento vascular, epinastia foliar, nanismo, murcha progressiva, desfolha e morte da planta. As espécies de *F. oxysporum* em todas as suas formas *speciales* (*f. sp.*) coletivamente infectam mais de 100 hospedeiros diferentes, provocando graves prejuízos em culturas como melão, tomate, algodão, banana, batata, cana de açúcar, feijão, dentre outras (AGRIOS, 2005; MICHIELSE; REP, 2009; KANT *et al.*, 2011; DEAN *et al.*, 2012). A espécie *F. solani* é conhecida por ocasionar a podridão vermelha da raiz que acomete culturas importantes como ervilha, batata, feijão, maracujá, soja, dentre outras. Essa doença resulta em manchas avermelhadas na raiz principal com expansão da necrose para as raízes secundárias, resultando em apodrecimento das mesmas. Na parte aérea da planta, os sintomas apresentam-se como manchas cloróticas e necróticas internervais (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM, 1995; AGRIOS, 2005; GUIMARÃES, 2011).

Para combater as doenças causadas por fungos fitopatogênicos, a aplicação de antifúngicos sintéticos tem sido uma das estratégias utilizadas pelos agricultores (KUTCHER *et al.*, 2011; VOGT *et al.*, 2013). Entretanto, o controle químico está associado a uma série de desvantagens. Fungicidas ou químicos sintéticos são geralmente considerados tóxicos e perigosos para os seres humanos, plantas e animais. Além disso, o número de fungos resistentes a esses compostos, mediante as aplicações prolongadas, só aumenta (MENG *et al.*, 2010; MAREI; RASOUL; ABDELGALEIL, 2012; YADAV *et al.*, 2013). Adicionalmente, os químicos sintéticos são responsáveis por deixar resíduos indesejáveis no ambiente e nos alimentos, além de serem intitulados como pouco eficientes, ocasionando apenas baixas reduções nas perdas agrícolas, em torno de 7% (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; DAOUBI *et al.*, 2005; DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010; VOGT *et al.*, 2013). Portanto, a procura por novas estratégias de biocontrole de microrganismos fitopatogênicos tem sido um desafio para a agricultura moderna.



## 2.2 Proteínas antifúngicas no contexto da biotecnologia agrícola

As plantas são constantemente atacadas por uma vasta gama de fungos fitopatogênicos que as procuram como fonte de alimentação. Em resposta a esses ataques, elas usam uma variedade de estratégias, classificadas como defesas pré-formadas ou constitutivas e defesas pós-formadas ou induzidas. Essas barreiras de defesa incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (“ROS - Reactive Oxygen Species”) e espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (“NO - Nitric Oxide”), reforço na parede celular, indução de compostos antimicrobianos e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (“PR-proteins”) (NEWMAN *et al.*, 2013). Entre as moléculas que participam desse sistema de defesa estão peptídeos e proteínas, com potencial de conferir proteção efetiva contra o ataque de patógenos (CARVALHO; GOMES, 2009; HEGEDUS; MARX, 2013; MARMIROLI; MAESTRI, 2014; LACERDA *et al.*, 2014).

Um dos grupos mais notáveis de proteínas envolvidas na defesa vegetal é o das proteínas relacionadas à patogênese, a exemplo das quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, defensinas, proteínas transferidoras de lipídeos (“LTP - Lipid Transfer Protein”) e inibidores de proteases (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Outras proteínas como lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (“RIP - Ribosome Inactivating Protein”), proteínas ligantes à quitina (“Chitin-Binding Protein”) e toxinas vegetais também estão envolvidas na defesa das plantas contra patógenos. Muitas dessas moléculas são conhecidas por sua potente atividade contra fungos (SELITRENNIKOFF, 2001; CARVALHO; GOMES, 2011).

Apesar das várias moléculas envolvidas na linha de frente da defesa contra patógenos, as proteínas têm recebido atenção especial em virtude do seu potencial para aplicação na agricultura. A utilização de proteínas antifúngicas como estratégia de biocontrole de fungos fitopatogênicos baseia-se na sua identificação e análise de atividade antifúngica *in vitro*. De maneira geral, uma proteína é dita antifúngica quando é capaz de interferir no crescimento ou reprodução de determinadas espécies de fungos. Como mecanismo geral de ação, várias dessas proteínas compartilham a capacidade de hidrolisar polímeros que constituem a parede celular, como quitinas e glucanos, ou de ativar respostas celulares que interferem na formação direta da parede celular (NG, 2004).

Proteínas antifúngicas apresentam-se como possíveis candidatas para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a fungos, podendo atuar através de efeitos tóxicos diretos aos fungos ou interferindo em seu crescimento. Embora ainda não exista no mercado uma planta transgênica contendo genes que codifiquem para proteínas que confirmam resistência contra fungos fitopatogênicos, vários estudos descrevem a eficácia de proteínas antifúngicas expressas em diferentes plantas hospedeiras (LACERDA *et al.*, 2014). PR-proteínas como glucanases, quitinases, proteínas tipo taumatina, tioninas, defensinas, LTP e outras proteínas como as RIP são alguns dos exemplos de proteínas candidatas à transgenia (FERREIRA *et al.*, 2007). Nesse sentido, esforços significativos têm sido direcionados na detecção de novas proteínas antifúngicas, visando uma possível utilização na engenharia genética no desenvolvimento de culturas transgênicas de importância econômica.

Um grupo bastante estudado de proteínas antifúngicas é o das quitinases. Plantas economicamente importantes, como arroz, trigo, cana-de-açúcar, algodão e amendoim, engenheiradas com genes de quitinases mostraram maior resistência a fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani*, *B. cinerea*, *Cercospora arachidicola*, *Alternaria solani*, dentre outros (GANESAN; JAYABALAN, 2006). Outra classe de proteínas que merece destaque é a das glucanases. Plantas de banana expressando uma  $\beta$ -1,3-endoglucanase isolada de soja exibiram maior resistência ao fungo *F. oxysporum* (MAZIAH; SARIAH; SREERAMANAN, 2007).

A expressão de peptídeos antimicrobianos (“AMP - Antimicrobial Peptides”) em plantas aumenta a resistência a fungos patogênicos devido ao seu largo espectro de atividade antimicrobiana. Plantas transgênicas de *Brassica napus* (colza), *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) e *Nicotiana tabacum* (tabaco), superexpressando genes de proteínas semelhantes à proteína transferidora de lipídeos não específica (*LJAMP1* e *LJAMP2*) de *Leonurus japonicus*, mostraram maior resistência aos fungos *A. alternata*, *A. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae* em experimentos *in vitro* e *in vivo* (XIANBI *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2013). O peptídeo antimicrobiano Ace-AMP1, isolado de sementes de *Allium cepa* (cebola), conferiu resistência à banana e ao trigo aos fungos *Blumeria graminis*, *F. oxysporum* e *Neovossia indica*. No último caso, Ace-AMP1 intensificou a expressão de genes relacionados à defesa em trigo inoculado com *Neovossia indica* (ROY-BARMAN; SAUTTER; CHATTOO, 2006; MOHANDAS

*et al.*, 2013). A superexpressão de GtLTP1, uma LTP isolada de folhas de *Gentiana triflora*, em plantas de tabaco melhorou a tolerância ao fungo *B. cinerea* (KIBA *et al.*, 2012).

Adicionalmente, defensinas, um grupo de peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína, mostram potente inibição do crescimento de fungos filamentosos, tendo também sido utilizadas como ferramentas biotecnológicas para melhorar a produção agrícola, através da geração de resistência a fungos em organismos geneticamente modificados (OGM) (MURAD *et al.*, 2007). Plantas de tomate expressando constitutivamente uma defensina de rabanete, denominada *Rs-AFP2*, mostraram níveis significativamente mais elevados de resistência à infecção com *F. oxysporum* e *B. cinerea* em bioensaios com folhas destacadas (KOSTOV *et al.*, 2009). A expressão constitutiva dessa mesma defensina, *Rs-AFP2*, em arroz (*Oriza sativa* L.) suprimiu o crescimento dos fungos *M. oryzae* e *R. solani*. A expressão de *Rs-PAF2* não foi acompanhada por indução de genes de PR-proteínas, sugerindo que essa defensina apresenta ação direta na inibição dos patógenos (JHA; CHATTOO, 2010). Pesquisas recentes também demonstraram que os genes *PhDef1* e *PhDef2*, que codificam para duas defensinas de *Petunia*, expressos em banana conferiram resistência ao fungo *F. oxysporum* (GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de batata engenheiradas com a defensina alfAFP, isolada das sementes de alfafa (*Medicago sativa*), que se mostraram resistentes ao fungo *V. dahliae* (GAO *et al.*, 2000).

Estudos recentes apontam para um crescente interesse no uso potencial das lectinas no controle de patógenos por meio de plantas transgênicas. A maioria das lectinas de plantas é sintetizada como precursores inativos armazenados dentro de vacúolos ou corpos proteicos, que se tornam ativos somente após sequestro em organelas especializadas frente ao ataque de patógenos. A expressão de uma lectina de soja ("SBL - Soybean Lectin") em tabaco conferiu maior resistência ao fungo *Phytophthora nicotianae*, reduzindo significativamente os sintomas da doença (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011; GUO *et al.*, 2013).

O aumento da resistência de plantas a doenças causadas por fungos pode, também, ser obtido com a combinação de proteínas antifúngicas de diferentes classes, resultante do sinergismo de ações. Plantas de arroz expressando simultaneamente genes de quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases demonstraram níveis

elevados de resistência à queima da bainha provocada pelo fungo *R. solani*, quando comparadas com aquelas expressando apenas o gene para quitinase (SRIDEVI *et al.*, 2008). O extrato bruto de ervilhas (*Pisum sativum* L.) expressando quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases mostrou efeito inibitório na germinação dos esporos de *Trichoderma harzianum* (AMIAN *et al.*, 2011).

Apesar dos elevados custos para obtenção de uma planta geneticamente modificada (GM), especialmente quando comparados ao melhoramento genético convencional, a adoção de cultivares transgênicas na agricultura tem se mostrado como uma alternativa bastante vantajosa. Como relatado acima, os peptídeos e proteínas recombinantes aumentam as respostas de defesa da planta contra patógenos, o que, conseqüentemente, reduz substancialmente a utilização dos fungicidas sintéticos, colaborando para a diminuição dos efeitos indesejáveis para os organismos não alvo e, também, para os ecossistemas.

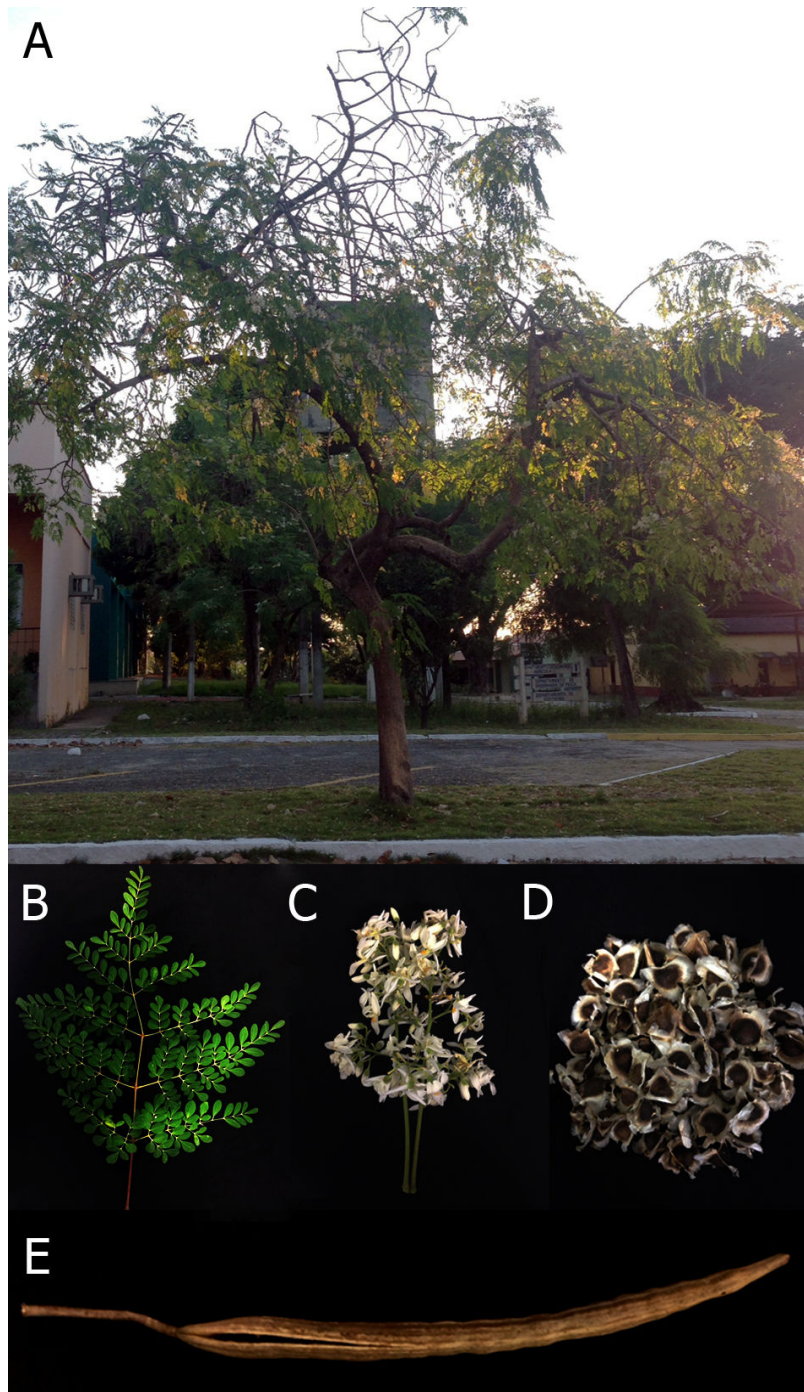
## **2.3 *Moringa oleifera* Lamarck**

### **2.3.1 Considerações gerais**

A espécie *M. oleifera*, também conhecida como *Moringa pterygosperma* Gaertn, é uma planta originária do noroeste da Índia, onde é popularmente chamada de “drumstick tree” ou bastão de tambor, com distribuição em várias partes do mundo. É uma espécie de regiões tropicais e subtropicais, membro da família monogenérica Moringaceae, que é constituída por 14 espécies arbóreas ou arbustivas, sendo ela a mais cultivada (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; BEN SALEM; MAKKAR, 2009). No Brasil, a espécie foi introduzida por volta de 1950 e, na região Nordeste, encontra-se principalmente nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí, onde é conhecida como lírio-branco, quiabo de quina ou, simplesmente, moringa (LORENZI; MATOS, 2002; CYSNE, 2006). Trata-se de uma árvore decídua com 10 a 12 m de altura. Na América tropical, onde foi introduzida como planta ornamental, é uma planta de porte arbóreo e de tronco único. No Brasil, a moringa apresenta um caule delgado, muitas vezes único e copa aberta em forma de guarda-chuva. Possui casca grossa e cinza, flores brancas perfumadas, folhas bipinadas ou tripinadas, frutos compridos com sementes

trialadas em seu interior (Figura 2) (SILVA; KERR, 1999; LORENZI; MATOS, 2002; CYSNE, 2006; ROLOFF *et al.*, 2009).

Figura 2 - *Moringa oleifera* Lamarck



Fonte: Própria autora e Rodolpho Guedes. (A) Árvore *M. oleifera*; (B) Folhas; (C) Flor (D) Sementes aladas; (E) Fruto maduro.

A classificação taxonômica da *M. oleifera* está descrita a seguir:

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- Superdivisão: Spermatophyta
- Divisão: Magnoliophyta (Angiosperma)
- Classe: Magnoliopsida (Dicotiledônea)
- Ordem: Brassicales
- Família: Moringaceae
- Gênero: *Moringa*
- Epíteto Específico: *oleifera*
- Espécie: *Moringa oleifera*

### **2.3.2 Usos e aplicações de *M. oleifera***

A *M. oleifera* é uma planta multifuncional que tem sido bastante utilizada na medicina tradicional e indústria. A espécie é utilizada na produção de biomassa, forragem para animais (folhas e sementes), biogás (a partir de folhas), agente de limpeza doméstica (folhas trituradas), corante (madeira), barreira (árvores vivas), fertilizante (semente), nutriente foliar (suco processado das folhas), adubo verde (de folhas), goma (a partir de troncos de árvores), clarificador de mel e de caldo de cana-de-açúcar (sementes em pó) e de mel (flor néctar). Somando a isso, incluem o seu uso medicinal (todas as partes da planta), nas plantações ornamentais, como biopesticida (incorporação ao solo de folhas para evitar tombamento de plântulas), fonte de celulose (madeira), corda (casca) e tanino para tratamento de peles e bronzeamento (casca e goma) e, também, na purificação de água (sementes em pó). O óleo de suas sementes é geralmente usado em saladas, lubrificação de máquinas e na fabricação de perfumes e produtos para os cabelos (FOIDL; MAKKAR; BECKER, 2001). O principal constituinte do óleo da *M. oleifera* é o ácido

oleico (78,6%), o que lhe confere características semelhantes à do azeite de oliva (ANWAR; BHANGER, 2003).

A *M. oleifera* também se destaca por sua importância na alimentação e na medicina popular. Uma grande variedade de benefícios nutricionais e medicinais tem sido atribuída às suas raízes, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; ANWAR *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2010). Análises fitoquímicas mostraram que suas folhas são particularmente ricas em potássio, cálcio, fósforo, ferro, vitaminas A e D e aminoácidos essenciais, bem como em antioxidantes, incluindo  $\beta$ -caroteno, vitamina C e flavonoides (BENNET *et al.*, 2003; ASLAM *et al.*, 2005; MANGURO; LEMMEN, 2007; AMAGLO *et al.*, 2010; GOWRISHANKAR *et al.*, 2010). Além disso, a árvore é uma excelente fonte de proteína de alta digestibilidade. Devido a essas virtudes nutricionais, a *M. oleifera* tem sido mais difundida nos últimos anos e utilizadas nos países em desenvolvimento no combate à desnutrição (WADHWA *et al.*, 2013).

Apesar dos esforços para expandir o uso e o cultivo de *M. oleifera* com finalidade nutricional (tendo em conta o alto teor de proteínas, vitaminas, sais minerais e a baixa toxicidade das sementes e folhas), a principal utilização dessa planta no Brasil deriva principalmente da sua propriedade purificadora de água, sendo bastante utilizada para essa finalidade em todo o semiárido nordestino (GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). A atividade purificadora de água é resultado das propriedades coagulantes encontradas nas suas sementes. Devido a essas características, o pó das sementes dessa espécie é utilizado na purificação de água como um método natural, econômico e eficiente (KATAYON *et al.*, 2006; BHUPTAWAT; FOLKARD; CHAUDHARI, 2007; BELTRÁN-HEREDIA *et al.*, 2012). A purificação da água é atribuída à presença de peptídeos catiônicos de massa molecular variando de 6,0 a 16,0 kDa, com ponto isoelétrico em torno de 10,0 (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995).

O uso terapêutico de várias partes da *M. oleifera* remonta à Antiguidade. Seus numerosos usos farmacológicos são reconhecidos por sistemas milenares de medicina como a Ayurvédica e Unani, tendo sido corroborados pela comunidade científica (MUGHAL; SRIVASTAVA; IQBAL, 1999; GOYAL *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008). Às várias partes da planta têm sido atribuídas muitas propriedades farmacológicas, tais como atividades antitumoral, antipirética, antiepiléptica, anti-

inflamatória, antinociceptiva, antiulcerativa, hipotensiva e hipoglicemiante (CÁCERES *et al.*, 1992; GOYAL *et al.*, 2007; JAISWAL *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011; DE PAULA, 2012; PEREIRA, 2013). A *M. oleifera* é ainda utilizada no tratamento de doenças cardíacas, reumatismos, picadas de insetos (ANWAR; BHANGER, 2003; CHUMARK *et al.*, 2008) e, também, de doenças dos tratos digestório e respiratório e de doenças infecciosas da pele e mucosas (CÁCERES *et al.*, 1991; ANWAR *et al.*, 2007; CHUANG *et al.*, 2007).

*M. oleifera* é bastante resistente a doenças, uma vez que é afetada por poucas espécies de insetos e fungos fitopatogênicos (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). Diante dessa observação, é possível que componentes presentes nas sementes possam atuar como agentes antimicrobianos e inseticidas (CHEN, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Extratos etanólicos e aquosos das sementes de *M. oleifera* foram capazes de inibir o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pasturella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* (CÁCERES *et al.*, 1991; JABEEN *et al.*, 2008). Efeitos antifúngicos foram também relatados contra *Basidiobolus haptosporus*, *B. ranarum*, *Candida albicans*, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Microsporium canis*, *Rhizopus solani*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*, alguns desses representando fungos fitopatogênicos (JABEEN *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013). Além dos efeitos antimicrobianos, o extrato bruto e a lectina WSMoL (“Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin”) de sementes de *M. oleifera* apresentaram efeitos ovicida, larvicida e inseticida contra o mosquito *Aedes aegypti* (FERREIRA *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Efeito inseticida foi também demonstrado pela lectina de sementes denominada de cMoL (“Coagulante *Moringa oleifera* Lectin”), que interferiu no desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em adição, efeito nematicida contra *Meloidogyne incognita* também foi observado quando testado um exsudato de sementes de *M. oleifera* (SOUSA, 2013).

As propriedades de *M. oleifera* mencionadas acima embasam o uso milenar dessa espécie nas mais variadas áreas. Dessa forma, é notório o potencial dessa espécie para diversas aplicações biotecnológicas, compreendendo a indústria de cosméticos, de alimentos ou farmacêutica, purificação de água para consumo,



aquacultura e como estratégia de biocontrole de herbívoros e patógenos capazes de atacar plantas.

#### **2.4 Mo-CBP<sub>3</sub>: Proteína ligante à quitina obtida das sementes de *M. oleifera***

Diante do grande potencial biotecnológico apresentado pela *M. oleifera*, estudos com essa espécie foram iniciados por nosso grupo de pesquisa. Em 2002, Gomes verificou a presença de proteínas ligantes à quitina em extratos aquosos das sementes de *M. oleifera*. Posteriormente, Gifoni (2005) observou que frações contendo tais proteínas foram capazes de inibir a germinação de conídios de várias espécies de fungos fitopatogênicos, incluindo *F. solani*, *R. solani*, *A. niger*, *C. lindemuthianum* e *C. gloesporioides*, bem como de retardar o tempo médio de desenvolvimento do inseto *Callosobruchus maculatus*. Dando continuidade a esses estudos, uma proteína com atividade antifúngica foi isolada a partir da fração contendo as proteínas ligantes à quitina. Essa proteína foi denominada de Mo-CBP<sub>3</sub> ("*Moringa oleifera* chitin-binding protein") (GIFONI, 2009; GIFONI *et al.*, 2012).

Mo-CBP<sub>3</sub> apresenta massa molecular de 12,4 kDa e ponto isoelétrico de 10,8, revelando se tratar de uma proteína básica. Trata-se de uma glicoproteína com 2,5% de carboidratos, que apresenta atividade coagulante e não apresenta atividades hemaglutinante, quitinásica e  $\beta$ -1,3-glucanásica (GIFONI, 2009; GIFONI *et al.*, 2012). Mo-CBP<sub>3</sub>, consiste de múltiplas isoformas heterodiméricas, composta por duas cadeias polipeptídicas distintas, unidas por pontes dissulfeto. A cadeia menor ou A (4,1 kDa) tem o resíduo NH<sub>2</sub>-terminal bloqueado, enquanto a cadeia maior ou B (8,3 kDa) contém uma sequência NH<sub>2</sub>-terminal rica em resíduos de cisteína e glutamina (CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ), guardando similaridades com albuminas 2S. Trata-se de uma proteína alfa-beta, contendo 30,3% de  $\alpha$ -hélice, 16,3% de folha- $\beta$ , 22,3% de volta- $\beta$  e 30,4% de estrutura não ordenada. É uma proteína altamente estável, mantendo sua estrutura secundária em extremos de temperaturas e diferentes valores de pH (GIFONI, 2009; GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013).

Mo-CBP<sub>3</sub> mostrou-se capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios dos fungos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *C. musae* e *C. gloesporioides* na concentração de 0,1 mgP/mL, tendo mantido sua atividade antifúngica mesmo

quando aquecida a 100 °C, por 1 h e, também, quando pré-incubada com o açúcar *N*-acetil-D-glucosamina. Quando solubilizada em tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M, em diferentes valores de pH (2,0-12,0), *Mo*-CBP<sub>3</sub> inibiu a germinação dos conídios em praticamente todos os valores de pH testados. Similarmente, *Mo*-CBP<sub>3</sub> se mostrou capaz de inibir o crescimento micelial do fungo *F. solani*. Essa proteína se comportou como agente fungistático (0,05, 0,1 e 0,5 mg/mL) ou fungicida (1 mg/mL), dependendo da concentração utilizada (GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013). Adicionalmente, foi detectada sua falta de atividade frente ao oomiceto *Pythium oligandrum*, que apresenta celulose na parede celular, ao invés de quitina, evidenciando a especificidade dessa proteína por quitina (GIFONI *et al.*, 2012). Além disso, foi verificado que *Mo*-CBP<sub>3</sub> para manter sua atividade antifúngica precisa das cadeias A e B unidas por pontes dissulfeto, já que essa proteína perdeu a capacidade de inibir a germinação dos conídios de *F. solani* quando reduzida e alquilada, mostrando a importância da manutenção de sua estrutura para ação contra fungos (BATISTA, 2013).

Apesar dessa proteína se ligar à quitina, um componente da parede celular de fungos, os resultados sugerem que ela também tem ação sobre a membrana celular. *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi capaz de inibir em 89% a acidificação do meio, induzida por glucose, em conídios de *F. solani*, o que sugere sua influência sobre as bombas de prótons (H<sup>+</sup> ATPases) presentes na membrana celular do fungo. Além disso, *Mo*-CBP<sub>3</sub> mostrou-se capaz de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos conídios de *F. solani*. Foram evidenciadas, também, alterações causadas por *Mo*-CBP<sub>3</sub> na morfologia e ultraestrutura de células de *F. solani*, consistindo em deformação da parede celular, desorganização do sistema de endomembranas e interrupções na membrana plasmática, como exemplos (GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013).

A avaliação do efeito citotóxico de peptídeos e proteínas antifúngicos geralmente é realizada numa perspectiva de análise de risco para organismos não alvo, visando, assim, uma aplicação biotecnológica segura dessa(s) nova(s) molécula(s) (QI *et al.*, 2010). Em consonância com isso foi feita uma avaliação preliminar da citotoxicidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, tendo revelado que na concentração de 280 µM essa proteína não é capaz de causar hemólise de eritrócitos humanos. A ausência de efeito citotóxico de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi reforçada pela manutenção da

viabilidade celular das linhagens de células humanas MCF-7 e Caco-2 nas concentrações de 30,6 a 244,5 µg/mL, fato este melhor verificado quando comparado com resultados mostrados pelas lectinas ConA (“Concanavalin A”) e PHA (“*Phaseolus vulgaris Agglutinin*”), reconhecidamente citotóxicas em concentrações mais baixas (BATISTA, 2013).

Em busca de uma maior compreensão do papel fisiológico de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, a sequência nucleotídica codificadora para essa proteína foi obtida e submetida à análise preliminar *in silico* (FREIRE, 2013). Os dados obtidos sugerem a existência de, pelo menos, quatro pré-pro-proteínas de aproximadamente 14,7 kDa. Todavia, é possível que os trinta primeiros aminoácidos deduzidos correspondam ao peptídeo sinal, sendo o 30º resíduo de aminoácido (Asp<sup>30</sup>) um putativo sítio de clivagem da proteína madura (12,4 kDa). Em relação à localização tecidual dessa proteína, a predição feita é que *Mo*-CBP<sub>3</sub> está localizada tanto no retículo endoplasmático, como na superfície externa da membrana celular, suposição essa respaldada pela identificação de uma pequena sequência na região C-terminal da proteína, que parece funcionar como sítio de ancoragem.

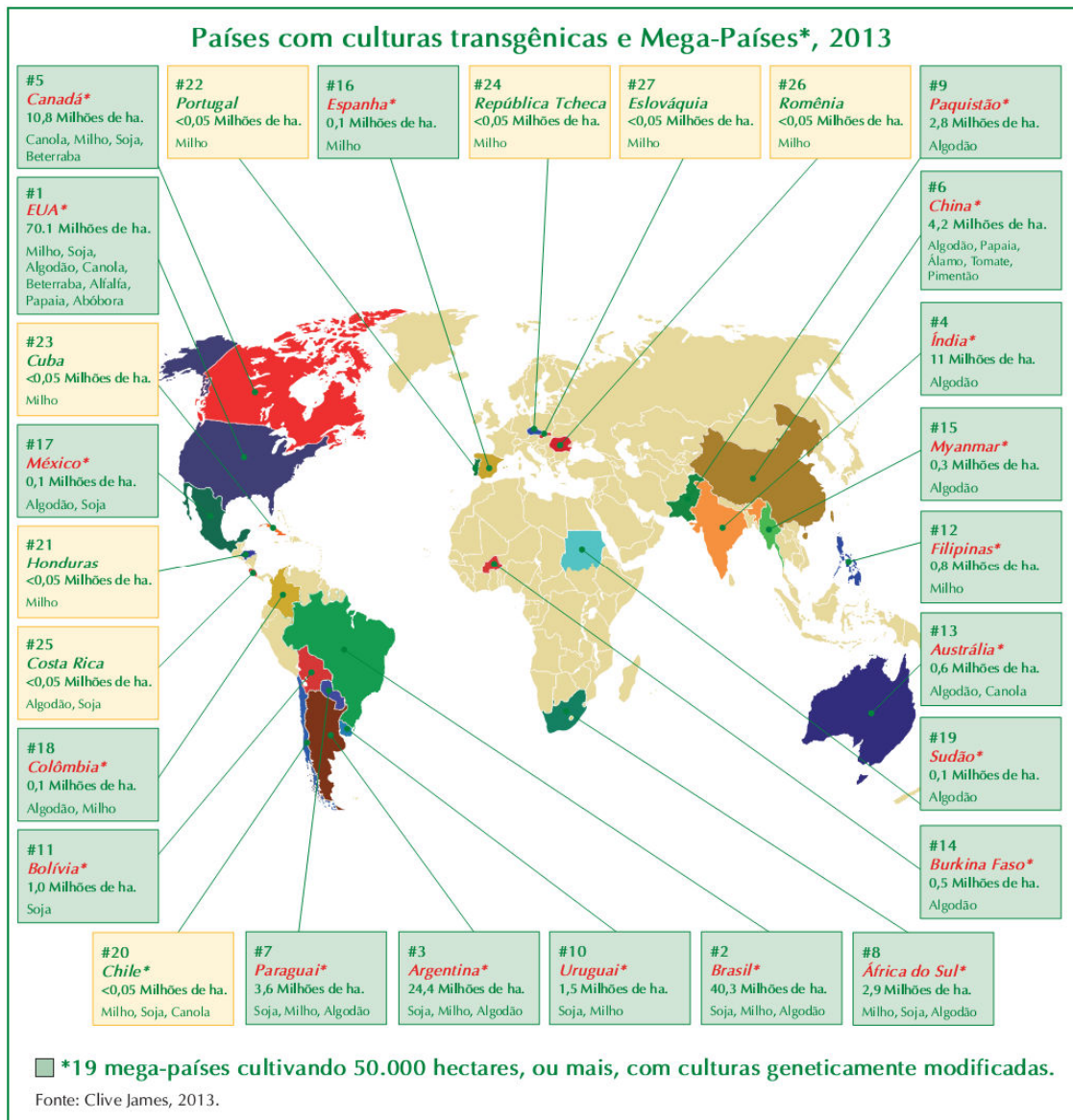
## 2.5 Plantas geneticamente modificadas e biossegurança alimentar

A produção de alimentos enfrenta novos desafios, tais como a diminuição de áreas agriculturáveis, produtividade estagnada, aumento da demanda de biocombustíveis, inundações, além de patógenos emergentes devido às alterações climáticas. Essa situação se agrava ainda mais devido ao crescimento contínuo da população, com o conseqüente aumento da demanda por alimentos. Estatísticas mostram que a população humana mais do que duplicou nos últimos 50 anos, bem como é projetado um aumento para mais de 9 bilhões até 2050, o que demandará um acréscimo de aproximadamente 70% na produção agrícola (GODFRAY *et al.*, 2010; DIOUF, 2011; FAO, 2013).

Os avanços na engenharia genética e a adoção de culturas GM têm adicionado novas e promissoras características à agricultura moderna, na tentativa de solucionar ou amenizar os efeitos prejudiciais causados por fatores bióticos e abióticos às culturas de interesse agrônômico (TOENNIESSEN; O'TOOLE; DEVRIES, 2003; ISAAA, 2014). O cultivo de OGMs continua a aumentar

consideravelmente em todo o mundo. Um recorde mundial de 175,2 milhões de hectares de variedades transgênicas cultivadas foi alcançado em 2013, correspondendo a um aumento de aproximadamente 100 vezes comparado ao ano de 1996 (1,7 milhões de hectares), que marcou o início do cultivo de OGMs. O Brasil é o segundo maior produtor de OGMs, com 40,6 milhões de hectares de culturas transgênicas, sendo a soja, o algodão e o milho os únicos organismos cultivados (Figura 3) (JAMES, 2013).

Figura 3 - Países com culturas transgênicas em 2013



Fonte: Clive James, 2013.

Esse aumento na área de cultivo de OGMs deve-se tanto aos benefícios por eles trazidos, como pela certificação de biossegurança que essas lavouras e produtos derivados vêm recebendo por diferentes órgãos de regulamentação em todo o mundo (OECD, 2006; 2007; 2010; CHEN; LIN, 2013; JAMES, 2013; NICOLIA *et al.*, 2013). As análises de risco de transgênicos seguem padrões internacionais definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2001).

A criação de abordagens que permitam investigar a biossegurança alimentar de novas proteínas a serem introduzidas em plantas agrícolas garante que as pesquisas sejam focadas e comprometidas com os interesses da sociedade, desde o início do seu desenvolvimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). As medidas de segurança adotadas para avaliação de OGMs visam minimizar ou até mesmo anular a possibilidade de comercialização de um produto que ofereça riscos à sociedade e ao ambiente. Várias pesquisas visando o delineamento das práticas a serem adotadas para avaliação da segurança do consumo de transgênicos têm sido desenvolvidas e adotadas. Neste contexto, diferentes organizações internacionais elaboram e propõem estratégias para a avaliação da segurança de OGMs, antes, durante e depois de sua liberação, garantindo, assim, a saúde do consumidor. Dentre as organizações envolvidas com esse propósito, destacam-se a “International Food Biotechnology Council (IFBC)”, “Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)”, “Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)”, “World Health Organization (WHO)” e “International Life Sciences Institute (ILSI)” (OLIVEIRA; WATANABE, 2004).

O *Codex Alimentarius*, Programa Conjunto FAO/WHO sobre Normas Alimentares, tem como objetivos básicos proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio internacional de alimentos. A Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC - “Codex Alimentarius Commission”) estabeleceu a Força Tarefa Intergovernamental sobre Alimentos Derivados de Biotecnologia (“TFFBT - Intergovernmental Task Force on Food Derived from Biotechnology”) com a finalidade de desenvolver padrões, normas ou recomendações para alimentos derivados da biotecnologia moderna, ou com características introduzidas por meio dessa tecnologia, baseados em evidências científicas e análise de risco (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). O *Codex Alimentarius* é adotado em muitos países

membros da Organização Mundial do Comércio (OMC) para regulamentação da segurança do consumo de transgênicos (HAMMOND *et al.*, 2013; FARIAS, 2013).

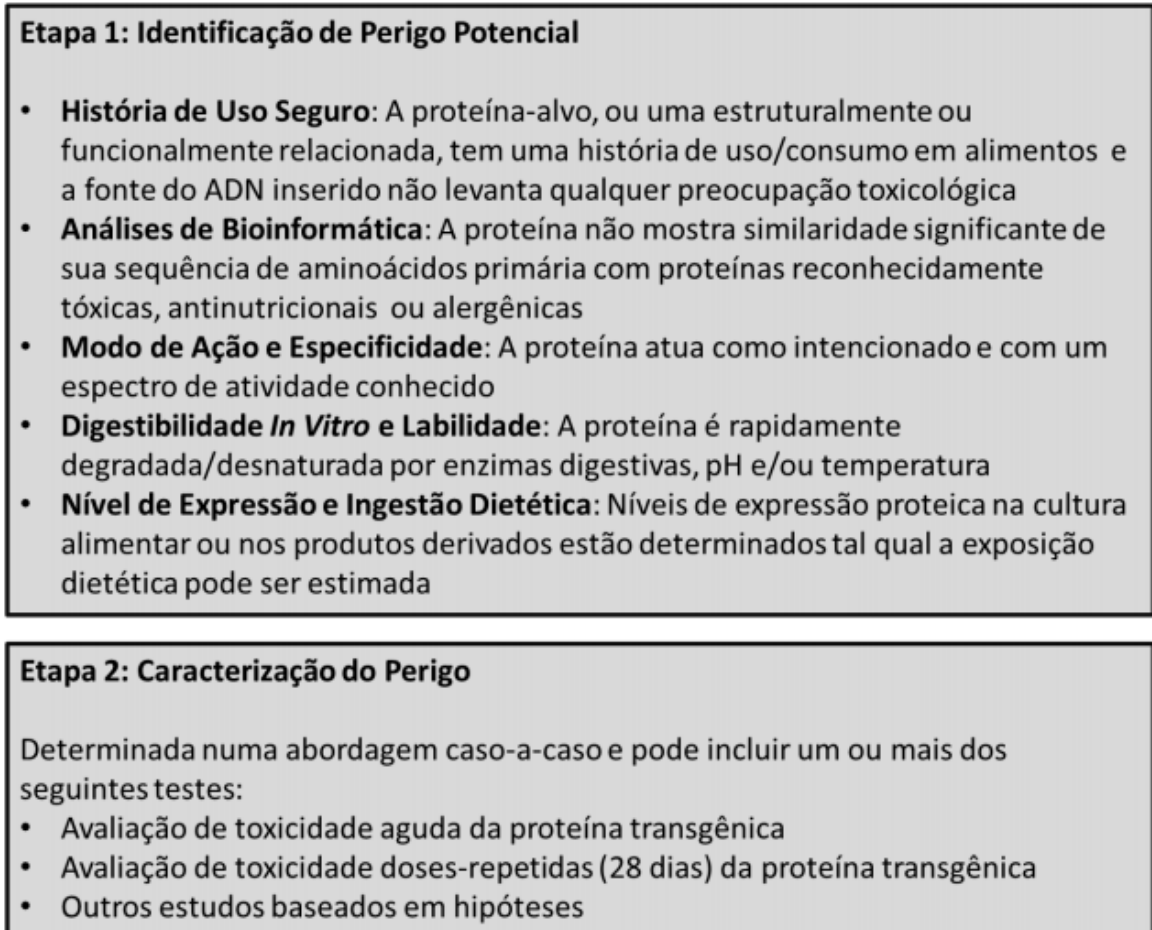
No Brasil, a primeira Lei de Biossegurança (Nº 9874) foi promulgada em 5 de janeiro de 1995 e revogada em 24 de março de 2005, onde instituiu-se a Lei Nº 11.105/05. Esta lei é responsável pela criação do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), re-estruturação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e, ainda, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB). A CTNBio é responsável por acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia, bioética e afins, com o objetivo de aumentar sua capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais, das plantas e do ambiente. Os OGMs aprovados no Brasil são submetidos a testes toxicológicos, alergênicos, nutricionais e ambientais, que passam pela análise da CTNBio, instância colegiada vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) (COSTA; COSTA, 2012; CTNBio, 2012), contemplando todas as etapas de avaliação sugeridas pela Comissão do *Codex Alimentarius*.

No contexto de avaliação da biossegurança alimentar, as proteínas merecem destaque, uma vez que várias delas introduzidas em culturas, através da tecnologia do DNA recombinante, historicamente não fazem parte da alimentação do homem e/ou animais. Dessa forma, a segurança dessas proteínas deve ser avaliada, visando prevenir a introdução de proteínas alergênicas, tóxicas, antinutricionais ou causadoras de outros efeitos adversos já conhecidos. Para tanto, o ILSI desenvolveu uma abordagem que vem sendo amplamente aceita pela comunidade científica, com uma característica relevante que é a sua maior flexibilidade experimental, especialmente quando comparada à árvore de decisão de “sim/não” proposta pela FAO/WHO, vinculada à avaliação de novas proteínas (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Essa abordagem recomenda a avaliação da biossegurança alimentar em duas etapas, ambas contemplando diferentes análises, e sugere que o valor preditivo dado a cada evidência obtida seja bem compreendido, a fim de atribuir maior relevância a certos dados, acrescentando maior confiança à avaliação completa (DELANEY *et al.*, 2008). Em síntese, o valor de predição de dados individuais pode não ser claramente definido, mas ensaios ou métodos adicionais contribuirão para melhorar seu valor preditivo.

As etapas citadas acima incluem a identificação de perigo potencial da proteína (etapa I) e a caracterização do perigo (etapa II), sendo a última apenas realizada quando os resultados da primeira etapa não são suficientes para a determinação da segurança (Figura 4). Na etapa I, são contemplados aspectos como (a) avaliação da função biológica ou modo de ação e a aplicação a qual se destina a proteína, (b) avaliação do histórico de uso seguro (“HOSU - History of Safe Use”) da proteína em estudo (CONSTABLE *et al.*, 2007), (c) comparação da sequência de aminoácidos da proteína com outras proteínas reconhecidamente tóxicas, antinutricionais e/ou alergênicas e (d) avaliação de propriedades físicas da proteína. O conhecimento obtido na etapa I pode ser suficiente para gerar informações acerca da segurança da proteína para expressão em culturas de interesse agrícola e, conseqüentemente, utilização para alimentação humana e/ou animal. A etapa II diz respeito aos ensaios de toxicidade referente à proteína em questão. Nesses estudos, são inclusos ensaios de toxicidade aguda (dose única e/ou doses repetidas), conduzidos, muitas vezes, através de exposição oral, por se tratar da via de exposição à proteína transgênica mais provável. Para tanto, os camundongos são os animais experimentais mais usados, uma vez que consomem menor quantidade da substância teste e, ao mesmo tempo, proporcionam a obtenção de dados confiáveis. No entanto, alguns estudos utilizando outras vias de exposição, tais como intraperitoneal ou intravenosa, também podem ser conduzidos. Dependendo dos resultados obtidos na etapa I, estudos toxicológicos adicionais e testes baseados em hipótese podem ser considerados (DELANEY *et al.*, 2008; CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

O método proposto pelo ILSI atende a todas as exigências do *Codex Alimentarius*, no que concerne à avaliação de biossegurança alimentar de novas proteínas. Além disso, a CTNBio, instância brasileira responsável por acompanhar e aprovar a liberação de OGMs, também faz uso das recomendações do *Codex Alimentarius* na avaliação de risco de novas proteínas para a saúde humana, animal e para o meio ambiente. Dessa forma, o método de duas etapas, que está de acordo com as exigências do *Codex Alimentarius* e da CTNBio, foi escolhido para a avaliação de biossegurança da proteína candidata à transgenia, *Mo-CBP<sub>3</sub>*, foco de estudo deste trabalho.

Figura 4 - Abordagem em duas etapas baseada em pesos de evidência para avaliação de biossegurança alimentar de novas proteínas



Fonte: Farias (2013) adaptado de Delaney *et al.* (2008).



### 3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótese

*Mo*-CBP<sub>3</sub> é segura para o consumo do homem e animais monogástricos de acordo com a metodologia vigente para avaliação de biossegurança alimentar e, portanto, mostra-se como uma ferramenta biotecnológica promissora para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de fungos fitopatogênicos.

#### 3.2 Objetivo geral

- Avaliar a biossegurança alimentar da proteína antifúngica *Mo*-CBP<sub>3</sub> para o homem e demais animais monogástricos.

#### 3.3 Objetivos específicos

- Analisar o histórico de uso seguro da espécie *M. oleifera*;
- Realizar estudos *in silico*, que vão desde a pesquisa de similaridade entre as sequências primárias das quatro isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais, até a busca por sítios potenciais de *N*-glicosilação;
- Determinar propriedades físico-químicas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> inerentes à determinação de potencial alergênico;
- Analisar parâmetros de toxicidade em camundongos fêmeas a partir da administração oral da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>.

## 4. Materiais

### 4.1 Sementes

Para obtenção da proteína de interesse, *Mo*-CBP<sub>3</sub>, sementes de *M. oleifera* foram coletadas de árvores localizadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), no período de outubro a dezembro de 2012. A exsicata da espécie foi depositada com o número EAC34591 no Herbário Prisco Bezerra da UFC (Fortaleza - CE, Brasil).

### 4.2 Animais de laboratório e alojamento

Trinta camundongos fêmeas convencionais, da linhagem Swiss, com três semanas de idade, foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen-UFC). Os animais foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), do Departamento de Biologia da UFC, com condições de temperatura ( $23 \pm 2$  °C), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e umidade do ar (45-55%) controlados. Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil), água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum*, até atingirem o peso aproximado de 20 g para realização dos testes.

Os protocolos com animais experimentais, adotados neste trabalho, foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, que adota os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e obedece a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regula o uso de animais em pesquisas científicas. Medidas foram adotadas para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

### 4.3 Reagentes químicos e outros materiais

Albumina sérica bovina (“BSA - Bovine Serum Albumin”), acrilamida, “coomassie brilliant blue” R-250, dodecil sulfato de sódio (“SDS - Sodium Dodecyl

Sulfate”), TEMED (*N,N,N,N*-tetrametiletenodiamina), ditioneitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol, membranas de polifluoreto de vinilideno (“PVDF - Polyvinylidene difluoride”), pepsina e pancreatina foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, EUA) ou Invitrogen (Carlsbad, EUA).

BCIP (“5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate”) e NBT (“nitro blue tetrazolium”) foram obtidos da Promega.

As matrizes cromatográficas e os marcadores de massa molecular de proteínas foram obtidos da GE HeathCare (Uppsala, Suécia).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Levantamento do histórico de uso seguro da espécie *M. oleifera*

Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro da espécie *M. oleifera* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Constable *et al.* (2007). Para guiar esta pesquisa, tentou-se seguir os seguintes eixos: (1) tempo de exposição dos seres humanos ou animais; (2) forma como o alimento foi processado ou preparado e seus prováveis níveis de ingestão; (3) perigo potencial associado ao consumo; (4) relatos de exposição animal e humana e suas consequências. Para tanto, foi acessada a base de dados PubMed, da Biblioteca Nacional Americana de Medicina, parte do Instituto Nacional de Saúde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). A pesquisa foi realizada utilizando palavras-chave na Língua Inglesa, combinadas de várias maneiras: (a) *Moringa oleifera* e “food safety”; (b) *Moringa oleifera* e “risk assessment”; (c) *Moringa oleifera* e “toxicity”; (d) *Moringa oleifera* e “nutrition”; (e) *Moringa oleifera* e “review” e (f) *Moringa oleifera*.

### 5.2 Similaridade da sequência de aminoácidos e busca por sítios potenciais de N-glicosilação

#### 5.2.1 Sequência primária das isoformas de Mo-CBP<sub>3</sub>

As sequências de aminoácidos das quatro isoformas de Mo-CBP<sub>3</sub> foram deduzidas a partir do cDNA, por nosso grupo de pesquisa (FREIRE, 2013). Estas sequências encontram-se depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com números de acesso de KF616830 a KF616833 (Figura 5). As sequências foram obtidas no formato FASTA.

Figura 5 - Sequência primária das quatro isoformas da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*

```

>Q3GS
MAKLTLLLATFALLVLLANASYYRTTVELDEEPDDNQQQQRCRHQFQSQQRLRACQRVIRRWSQGGGPMED
VEDEIGETDEIEEVVEPDQARRPPTLQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQQGQVGPQQVGHMYRV
ASRIPAICNPQPMRCPFRQQQGS

>Q3S2
MAKLTLLLATLALLVLLANASYYRTTVELDEEPDDNQQQQRCRHQFQTQQRLRACQRVIRRWSQGGGPMED
VEDEIDETDEIEEVVEPDQARRPPTLQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQQGQVGPQQVGHMYRV
ASRIPAICNLQPMRCPFRQQQSS

>Q3S2WL
MAKLTLLLATFGLLLLLTNASYYRTTVELDEEAADENQQQQRCRQQFQTHQLRACQRFIRRRTQGGGPLDE
VEDEVDEIEEVVEPDQGPGRQPAFQRCCQQLRNISPPCRPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQQVRQMYRVAS
NIPSMCNLQPMSCLFRQQQSSWL

>Q2
MAKFTLLLAIFALFLILANANVYRTTVELDEEPDDNQQGQQQQCRQQFLTHQLRACQRFIRRQTQGGG
ALEDVEDDVEEIEEVVEPDQARRPAIQRCCCQQLRNIQPRCRCPSLRQAVQLAHQQGQVGPQQVRQMYRL
ASNIPAICNLRPMSCPFGQQ

```

Peptídeo sinal - sombreado em cinza; pro-peptídeo *N*-terminal; a cadeia A + um peptídeo “linker” + a cadeia B - sombreados em amarelo; e uma extensão *C*-terminal

### **5.2.2 Análise de similaridade entre as sequências de aminoácidos de Mo-CBP<sub>3</sub> com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais**

Pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade das sequências de aminoácidos das quatro isoformas da proteína Mo-CBP<sub>3</sub> com aquelas de proteínas reconhecidamente alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais para o homem. Inicialmente, foram comparadas as sequências completas de aminoácidos, bem como a sequência correspondente à proteína madura (cadeia A + *linker* + cadeia B), como sugerido por Delaney *et al.* (2008). As sequências de aminoácidos das quatro isoformas da proteína Mo-CBP<sub>3</sub> foram comparadas com todas as sequências de proteínas presentes em sete grandes bancos de dados públicos de referência: NR, Refseq\_Protein, SwissProt, PDB, Env\_nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), UniProt/SwissProt (<http://www.uniprot.org/blast/>) e UniProt/SwissProt-Trembl (<http://web.expasy.org/blast/>). O algoritmo utilizado foi o BLASTP 2.2.29 + e a matriz de pontuação BLOSUM62. Os detalhes específicos do alinhamento foram cuidadosamente verificados [*E-value* < 0.01, identidade compartilhada > 50%, tamanho do alinhamento e frequência de espaços (*gap*) ≤ 6%] para determinar a significância de qualquer semelhança encontrada, uma vez que não existe um critério estabelecido para a pesquisa de substâncias tóxicas e proteínas antinutricionais (HEROUET-GUICHENEY *et al.*, 2009).

Adicionalmente, pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade das sequências de aminoácidos das quatro isoformas da proteína Mo-CBP<sub>3</sub> com aquelas de proteínas reconhecidamente alergênicas, utilizando os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001). As sequências foram comparadas às sequências de alérgenos depositadas nos seguintes bancos de dados: (1) “Structural Database of Allergenic Proteins” (SDAP), da Universidade do Texas, USA (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>); (2) “Allergen Database for Food Safety” (ADFS) (<http://allergen.nihs.go.jp/>); (3) “AllergenOnline version 14 database”, da Universidade de Nebraska em Lincoln (<http://www.allergenonline.com/>); e (4) “Allermatch”, da Universidade de Wageningen, na Holanda (<http://allermatch.org/>). As sequências completas das quatro isoformas da proteína Mo-CBP<sub>3</sub>, bem como as sequências correspondentes à proteína madura (cadeia A + “linker” + cadeia B), foram submetidas a comparações do tipo FASTA completa (“Full FASTA”), usando como filtro (“cutoff”) *E-value* < 0.01, na detecção de identidade > 70% para a

sequência completa (AALBERSE, 2000). Pesquisas utilizando o mesmo filtro, porém numa janela de 80 aminoácidos (alinhamentos com identidade > 35 %) e em sequências de oito, sete ou seis aminoácidos contíguos idênticos aos de proteínas alergênicas conhecidas também foram executadas (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Para avaliar a reatividade imunológica dos peptídeos da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* encontrados nas buscas, esses foram submetidos a uma nova pesquisa no banco de dados de epítomos (determinantes imunogênicos) do ADFS.

### **5.2.3 Pesquisa de sítios potenciais de N-glicosilação**

As sequências completas de aminoácidos das quatro isoformas da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* foram analisadas quanto à presença de potenciais sítios de N-glicosilação pelo programa NetNGlyc 1,0 Servidor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), como sugerido por Xu *et al.* (2009).

## **5.3 Obtenção e caracterização da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>***

### **5.3.1 Purificação da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>***

A proteína purificada foi obtida seguindo o método descrito por Gifoni *et al.* (2012), com modificações (Figura 6). As sementes foram destegumentadas manualmente, trituradas em liquidificador e, posteriormente, em moinho elétrico para café. A farinha resultante foi tratada com *n*-hexano, na proporção 1:10 (m/v), para remoção total dos lipídios. Após delipidação, a farinha foi deixada sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para evaporação do *n*-hexano, em uma capela de exaustão de gases. A farinha delipidada de *M. oleifera* foi acondicionada em frascos hermeticamente fechados e conservada a 4 °C.

A farinha delipidada (30 g) foi posta em contato com tampão de extração Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v), deixada sob agitação contínua por 4 h, a 4 °C, e filtrada em pano de trama fina. O filtrado foi centrifugado a 15.000 x *g*, 4 °C, durante 30 min, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro e denominado de Extrato Total. Este foi exaustivamente dialisado contra água ultrapura (PURELAB Option-Q, Elga), 4 °C, sob agitação contínua, em

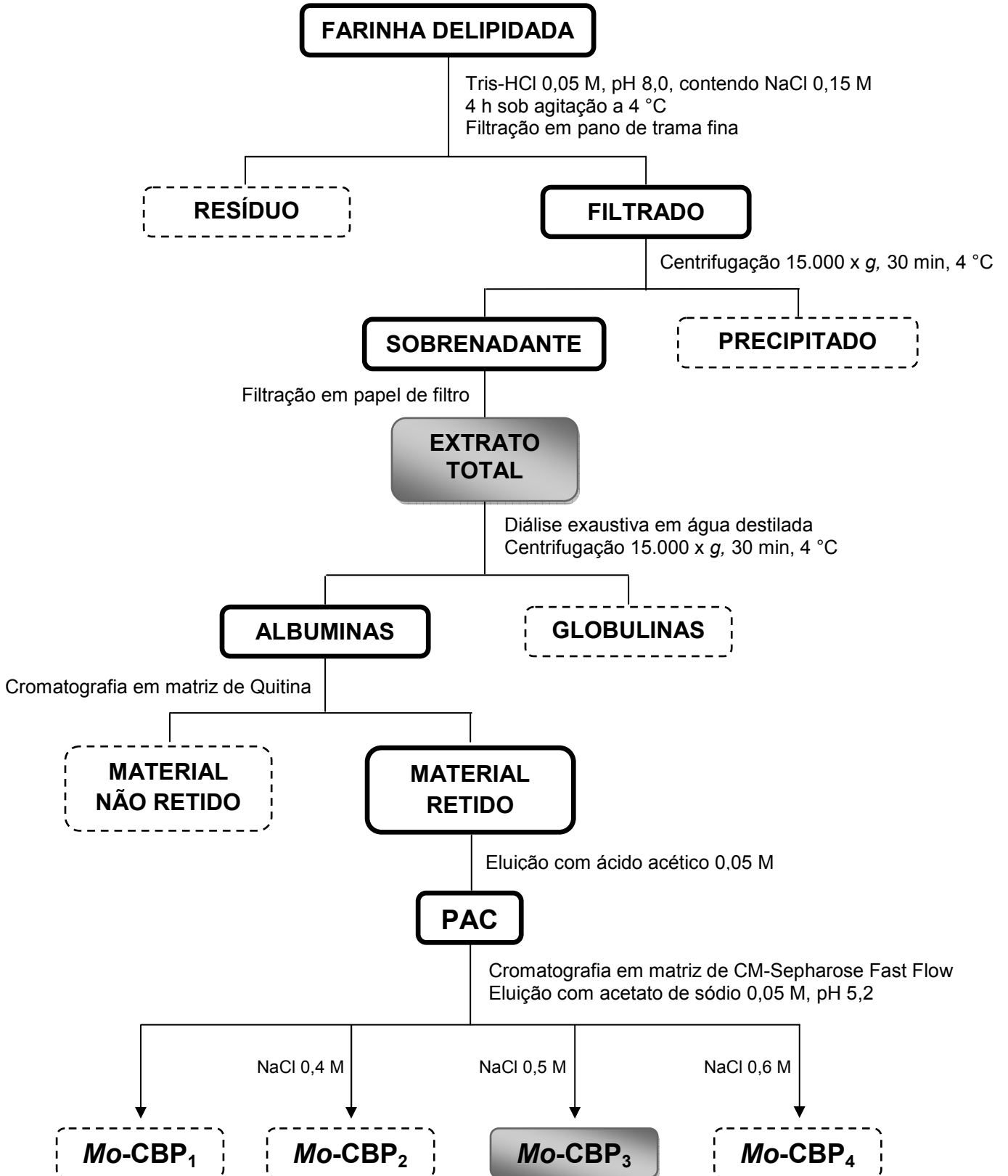
membranas com “cut-off” de 12 kDa. O material insolúvel resultante da diálise foi removido por centrifugação a 15.000 x *g*, a 4 ° C, durante 30 min, para obtenção da fração albumina (sobrenadante).

A fração albumina foi liofilizada. Em seguida, 1 g dessa fração foi ressuspenso em tampão de extração (15 mL), procedido de centrifugação a 8.000 x *g*, por 10 min, e o sobrenadante aplicado a uma matriz de quitina, previamente equilibrada com o tampão de extração. As proteínas não retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio/extração e as proteínas retidas, denominadas de P<sub>AC</sub>, eluídas com ácido acético 0,05 M, cujo processo foi monitorado por leitura de absorbância em espectrofotômetro (Novaspec II, Pharmacia) no comprimento de onda de 280 nm. As frações (4,5 mL) foram coletadas em um fluxo de 60 mL/h. Este passo cromatográfico teve como principal finalidade obter as proteínas ligantes à quitina. O material eluído foi dialisado contra água ultrapura, utilizando membranas com “cut-off” de 12 kDa, 4 °C, sob agitação contínua e liofilizado para posterior cromatografia de troca iônica.

O P<sub>AC</sub> (180 mg) foi ressuspenso em 2 mL do mesmo tampão de equilíbrio citado acima, centrifugado a 8.000 x *g*, por 10 min, e aplicado à matriz de CM-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada. As frações (4,5 mL) foram coletadas em um fluxo de 45 mL/h. As proteínas eluídas receberam a denominação de *Mo*-CBP (*Mo*: *Moringa oleifera* e “CBP: chitin binding protein”), acrescida de um número que representa a ordem de eluição. As proteínas não retidas à matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio e denominadas *Mo*-CBP<sub>1</sub>. Três picos principais de proteínas adsorvidas foram recuperados utilizando tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M, tendo sido denominados de *Mo*-CBP<sub>2</sub>, *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub>, respectivamente. Da mesma forma, a cromatografia foi monitorada por leitura de absorbância no comprimento de onda de 280 nm. A proteína de interesse, *Mo*-CBP<sub>3</sub>, foi dialisada (membranas com “cut-off” de 12 kDa) contra água ultrapura, 4 °C, sob agitação contínua, liofilizada e armazenada para posterior caracterização e uso nos testes biológicos.



Figura 6 - Esquema geral de purificação de *Mo*-CBP<sub>3</sub> a partir de sementes de *M. oleifera*



Fonte: própria autora

### **5.3.2 Determinação de proteínas**

A determinação de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando BSA, em várias concentrações, como padrão. A uma alíquota de 100 µL das amostras proteicas foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford (50 mL de metanol 95%, 100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250, 100 mL de ácido fosfórico 85% e 900 mL de água destilada). A mistura foi agitada e após 10 min foram feitas às leituras das absorvâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Novapesc II, Pharmacia). A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com BSA.

### **5.3.3 Análise da proteína Mo-CBP<sub>3</sub> em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (PAGE-SDS)**

Com o objetivo de avaliar a pureza da proteína obtida, Mo-CBP<sub>3</sub> foi analisada em condição desnaturante (PAGE-SDS), utilizando o método de eletroforese descontínua descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. Um gel de poliacrilamida de 1 mm de espessura, composto por um gel de aplicação que encerrava 3,5% de acrilamida (preparado em tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8 e 1% de SDS) e um gel de separação que encerrava 15,0% de acrilamida (preparado em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,8, contendo 0,2 M de glicina e 1% de SDS), foi montado num sistema de eletroforese vertical.

A proteína na concentração de 1 mg/mL foi preparada em água ultrapura e centrifugada a 5.000 x g, por 5 min, a 25 °C. Ao sobrenadante, foram adicionados tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 com SDS 1,0%, glicerol e azul de bromofenol, na presença ou não de β-mercaptoetanol 1,0%. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em agitador de microtubos, aquecida a 100 °C, por 5 min, e centrifugada a 5.000 x g, por 5 min, a 25 °C. Em seguida, 5 µL da amostra foram aplicados em poços feitos no gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (MV10COMP, Biosystems) com uma corrente constante de 20 mA e voltagem de 200 V, por aproximadamente 1 h. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (97 kDa); albumina sérica bovina (67,0 kDa); albumina do ovo (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30

kDa); inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa). A proteína foi visualizada por coloração com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25%, dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (1,0:3,5:8,0 v/v/v), por período em torno de 2 h. Em seguida, foi procedido o descoramento do gel com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v).

#### **5.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-PAGE-SDS)**

*Mo*-CBP<sub>3</sub> foi analisada por eletroforese em sistema Tricina-PAGE-SDS, contendo 10% e 16% de acrilamida, em sistema vertical com dimensões de 0,07 × 14 × 14 cm. Amostras (10  $\mu$ g) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo 4% de SDS, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 6%, sob aquecimento prévio a 100 °C, por 10 min. Como marcadores de massa molecular, foram usadas as mesmas proteínas citadas no item anterior. Para o cálculo da massa molecular aparente das proteínas em análise foi empregada a comparação das mobilidades das bandas proteicas em relação àquelas dos marcadores. As bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 (SCHAGGER; VON JAGOW, 1987).

#### **5.3.5 Determinação da digestibilidade *in vitro* da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>**

A susceptibilidade à digestão *in vitro* da proteína foi avaliada incubando *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,5 mg/mL) em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS), de maneira não sequencial. O FGS consistiu de uma mistura de NaCl 0,034 M, HCl 0,07% pH 2,0 e pepsina 3,2 mg/mL, enquanto o FIS foi composto por fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,5 e pancreatina 10 mg/mL, ambos preparados de acordo com as recomendações de Roesler e Rao (2001). A mistura foi incubada a 37 °C, sob agitação, e alíquotas de 200  $\mu$ L foram retiradas após 0, 15, 30, 60 s, 2, 5, 10, 20, 30 min, 1 e 2 h e transferidas para tampões de amostra/parada apropriados para cada fluido na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram, então, aquecidas a 100

°C, por 5 min, e a digestibilidade da proteína foi monitorada por PAGE-SDS, como descrito no item 5.3.3, e “Western Blot”.

O acompanhamento da digestibilidade através de “Western Blot” foi executado como descrito a seguir. Após o ensaio de digestibilidade, alíquotas de 5 µL de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, incubadas ou não com FGS ou FIS, foram aplicadas em gel de poliacrilamina 17,5%, como descrito no item 5.3.3. Ao término da corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF, previamente tratadas com tampão Tris 0,025 M, pH 8,3 contendo glicina 0,192 M, metanol 10% e SDS 0,04%, o mesmo tampão utilizado na transferência. Os parâmetros utilizados na transferência em sistema semisecco foram 150 mA e 50 V, por 1 h. Em seguida, os sítios livres de ligações com proteínas foram bloqueados com solução Tris-HCl 0,05 M, pH 7,3, com NaCl 0,15 M, contendo Tween 20 0,05% (TBS-T) e leite desnatado 3%, durante 16 h, a 4 °C, sob leve agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e, então, incubadas com o anticorpo primário anti-*Mo*-CBP<sub>3</sub> (1:10.000), em solução TBS-T, contendo 1% de leite desnatado, por 5 h, a 4 °C, sob leve agitação. As membranas foram, então, lavadas 6 vezes com TBS-T e, logo, em seguida, incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:2.000) em TBS-T, adicionado de leite desnatado 1%, por 2 h, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Transcorrido o tempo de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e incubadas com solução de revelação BCIP/NBT até o surgimento de coloração. A reação foi interrompida com a imersão das membranas em água ultrapura e posterior secagem à temperatura ambiente.

### **5.3.6 Determinação da estabilidade à temperatura da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>**

A estabilidade da proteína à temperatura foi avaliada por incubação de *Mo*-CBP<sub>3</sub> em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, a 1 mg/mL, em microtubos de 1,5 mL. A proteína foi submetida a 100 °C, por períodos de 10, 30 e 60 min. A incubação foi interrompida pela imersão do microtubo contendo a amostra em gelo, seguida da adição do tampão de amostra (Tris-HCl 0,05 M, sacarose 8%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,02% e 1% de β-mercaptoetanol). Uma amostra controle sem incubação da proteína a 100 °C (mantida a 4 °C) também foi preparada (HÉROUET

*et al.*, 2005). Após os tratamentos, a integridade da proteína foi analisada por SDS-PAGE, como descrito no item 5.3.3, e “Western Blot”, utilizando as mesmas condições mencionadas no item 5.3.4.

#### **5.4 Ensaio de toxicidade aguda (dose única) via oral da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* em camundongos**

O ensaio de toxicidade aguda, em dose única, via oral, de *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi realizado de acordo com o protocolo N° 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). Foram utilizados camundongos fêmeas (n = 6/ por grupo), pesando entre 20 e 24 g. A proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi ressuspensa em água destilada e administrada oralmente nas doses de 5, 50, 300 e 2000 mg de proteína por kg de peso corpóreo, formando assim 4 grupos experimentais. Um grupo de camundongos administrados somente com o veículo (água destilada) também foi conduzido, constituindo o grupo controle. Os animais foram mantidos em jejum por 2 e 1 h antes e depois da administração, respectivamente. Todos os camundongos foram observados nas primeiras horas após a administração da amostra e, depois, duas vezes ao dia, por 14 dias. Durante esse período, os animais foram inspecionados, visando detectar a ocorrência ou não de intervenção da proteína sobre a mortalidade e comportamento natural do animal, bem como indícios de toxicidade, a partir da verificação dos seguintes sintomas característicos: piloereção, anestesia, atividade motora, frêmito vocal, resposta ao toque, equilíbrio, presença de contorções, tremores, ptose e presença de fezes escuras ou disformes. O peso corpóreo de todos os camundongos foi mensurado nos dias 0, 4, 7, 10 e 14. No 14° dia, os animais, em jejum por 2 h, foram levemente sedados com éter etílico e exsanguinados pela via do seio retro-orbital, visando à coleta de sangue para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para observação da condição anatomo-morfológica dos órgãos vitais, sendo, depois, pesados para obtenção do peso úmido relativo. Após pesagem, os órgãos foram mergulhados em formalina 10%, por 24 h, e depois transferidos para álcool etílico 70%, onde foram mantidos para posterior realização da rotina histológica.

#### **5.4.1 Determinação de parâmetros hematológicos**

Para análise dos parâmetros hematológicos, os animais receberam previamente uma leve anestesia, por inalação de éter etílico, no 14<sup>o</sup> dia do experimento, tendo sido o sangue posteriormente coletado via plexo retro-orbital, com auxílio de tubo capilar heparinizado. Uma alíquota de 15 µL de sangue total de cada animal foi submetida a um analisador hematológico veterinário (Sysmex, modelo pochH-100iV Diff, Kobe, Japão). Os parâmetros verificados foram: leucócitos, hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, número de plaquetas, percentagem de linfócitos nas células brancas totais, percentagem de neutrófilos, basófilos e monócitos, amplitude de distribuição das hemácias medida como coeficiente de variação e amplitude de distribuição das hemácias medida como desvio padrão.

#### **5.4.2 Determinação de parâmetros bioquímicos**

O sangue coletado via plexo retro-orbital, no 14<sup>o</sup> dia do experimento, foi deixado por 16 h, a 8 °C, para completa coagulação. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 600 x g, por 10 min, e o soro coletado para análise dos parâmetros bioquímicos, os quais consistiram das seguintes determinações: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e colesterol VLDL. As análises sorológicas foram feitas utilizando kits (Labtest - Labtest Diagnóstica S. A., Vista Alegre, Minas Gerais, Brasil e Bioclin, QUIBASA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) específicos para cada parâmetro, seguindo as instruções do fabricante. Colesterol LDL e VLDL foram estimados utilizando as equações de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972), mostradas abaixo:

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicerídeos} / 5$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

### **5.4.3 Determinação do peso úmido relativo de órgãos internos e histopatologia**

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e dissecados para observação do estado anatomo-morfológico dos órgãos vitais. Aspectos como cor, presença de manchas e/ou irregularidades anatômicas, dentre outros aspectos, foram observados por um histopatologista. Os seguintes órgãos foram excisados sequencialmente: cérebro, timo, coração, pulmões, fígado, baço, estômago, pâncreas, intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo), intestino grosso, rins, bexiga, ovário, útero e tuba uterina. Todos os órgãos foram pesados em balança de precisão (Bioprecisa, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil), para obtenção do peso úmido relativo, de acordo com a equação abaixo. Em seguida os órgãos foram imediatamente fixados em formol 10%, por 24 h, e, depois, em álcool 70% para processamento histológico.

$$\text{Peso úmido relativo (\%)} = \text{Peso do órgão} \times 100 / \text{Peso total do animal}$$

Os órgãos/tecidos fixados foram processados por desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70 a 100%, diafanizados com xilol e incluídos em blocos de parafina. Cortes em micrótomo com lâmina de diamante foram feitos e secções de 4-6  $\mu\text{m}$  de espessura obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas correspondentes a cada tecido analisado foram examinadas por um histopatologista.

### **5.4.4 Análise estatística**

A homogeneidade dos dados foi analisada por meio de análise de variância simples (*One-way ANOVA*), seguida de teste de Tukey, com o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EUA). Diferenças nas variáveis analisadas entre os grupos experimentais e o grupo controle foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Histórico de uso seguro da espécie *M. oleifera*

A Tabela 1 mostra os principais aspectos positivos e negativos que compõem o histórico de uso da espécie *M. oleifera* de acordo com a literatura científica. Existe um grande número de relatos positivos associados ao uso de diversas partes da planta, seja como extratos, frações proteicas ou outras formas de utilização. Não foram encontradas publicações relevantes sobre efeitos adversos em mamíferos, em especial aos humanos, decorrentes de ingestão da planta *M. oleifera*, seja como alimento ou para uso medicinal. A espécie é consumida há mais de 100 anos pelo homem em diversas partes do mundo, sem relatos de quaisquer efeitos deletérios decorrentes do seu consumo.



Tabela 1 - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro\* da espécie *M. oleifera*

| Parte da planta | Formas de Utilização  | Aspectos positivos   | Referências   | Aspectos negativos   | Referências   |
|-----------------|---|--|---|--|---|
| <b>Raiz</b>     | Casca/<br>Sumo <sup>a</sup>   | - Amplamente utilizada na medicina popular indiana<br><br>- É útil para melhorar o apetite e auxiliar a digestão | Abdulkarim <i>et al.</i> (2005)<br>Matos (2004)   | —  |   |
| <b>Caule</b>    | Casca   | - Amplamente utilizado na medicina popular indiana   | Abdulkarim <i>et al.</i> (2005)   | —  |   |
| <b>Folha</b>    | - Extratos (aquoso orgânico)<br><br>- <i>Mo</i> -FPF (fração proteica de <i>M. oleifera</i> ) | - Evidências científicas em animais modelo reforçam o seu uso para o tratamento de diversas enfermidades         | Adedapo; Mogbojuri; Emikpe (2009); Awodele <i>et al.</i> (2012); Bakre; (2013); Jaiswal <i>et al.</i> (2009); De Paula (2012) | <i>M. oleifera</i> mostra toxicidade aguda em animais modelos em doses elevadas ( $\geq 3000$ mg/kg). Cuidados devem ser tomados com o tempo e a dose de exposição | Asare <i>et al.</i> (2012); Awodele <i>et al.</i> (2012); |

Tabela 1 (CONTINUAÇÃO) - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso\* seguro da espécie *M. oleifera*

| Parte da planta | Formas de Utilização                | Aspectos positivos  | Referências   | Aspectos negativos   | Referências                |
|-----------------|-------------------------------------|---|---|--|----------------------------|
| <b>Folha</b>    | Folhas cozidas ou pó                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Usada como vegetal particularmente na Índia, Paquistão, Filipinas, Havaí e em muitas partes da África, pelo homem, sem relatos de efeitos tóxicos</li> <li>- Na Tailândia as folhas de <i>M. oleifera</i> são consumidas como legume por mais de 100 anos</li> <li>- No Nordeste do Brasil, as folhas fazem parte da merenda escolar em alguns municípios</li> </ul> | <p>Anwar; Ashraf; Bhangar (2005); Chumark <i>et al.</i> (2008); Ghasi; Nwobodo; Ofili (2000);</p> <p>Matos (2004)</p> | -  |                            |
| <b>Semente</b>  | Sementes trituradas/ extrato aquoso | - É utilizada como um método alternativo para o tratamento de água em países desenvolvidos tornando-a adequada para o consumo humano  | <p>Ferreira <i>et al.</i> (2007); Ferreira <i>et al.</i> (2011); Joshi; Mehta (2010) Agrawal; Metha (2008)</p>        | - Em concentrações 3, 4, 5 ou 7,5 maiores que a concentração utilizada (0,2 µg/µL), as sementes de <i>M. oleifera</i> são mutagênicas, evidenciando um risco para a saúde humana | Rolim <i>et al.</i> (2011) |

Tabela 1 (CONTINUAÇÃO) - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso\* seguro da espécie *M. oleifera*

| Parte da planta | Formas de Utilização                                  | Aspectos positivos  | Referências  | Aspectos negativos   | Referências           |
|-----------------|---|---|--|--|-----------------------|
| <b>Semente</b>  | Sementes trituradas/<br>extrato aquoso                | - Extrato aquoso das sementes não apresentou toxicidade em animais modelos<br><br>- O pó da semente dissolvido em água tem sido usado como medicamento para o tratamento de infecções do trato respiratório | Ferreira <i>et al.</i> (2007);<br>Ferreira <i>et al.</i> (2011);<br>Joshi; Mehta (2010);<br>Agrawal;<br>Metha (2008) | - Os pacientes tratados com 3 g de pó de sementes por 3 semanas apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos | Agrawal; Metha (2008) |
|                 | Frações proteicas                                     | - Sementes de moringa têm frações proteicas específicas para a pele e cabelo que foram incorporadas na indústria cosmética (Purisoft ®)   | Stussi <i>et al.</i> (2002)  | —  |                       |
|                 | WSMol (lectina de <i>M. oleifera</i> solúvel em água) | - A lectina purificada poderia ser uma alternativa para o tratamento de água, uma vez que não apresenta efeitos mutagênicos em modelos de mutagenicidade e devido a sua propriedade coagulante              | Rolim <i>et al.</i> (2011)   |  |                       |

Tabela 1 (CONTINUAÇÃO) - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro\* da espécie *M. oleifera*

| Parte da planta | Formas de Utilização         | Aspectos positivos   | Referências  | Aspectos negativos | Referências |
|-----------------|------------------------------|--|--|--------------------|-------------|
| Fruto/Vagem     | Extratos (aquoso, etanólico) | - Efeitos benéficos de extratos de <i>M. oleifera</i> em modelos animais   | Karim; Azlan (2012)  | —                  |             |
|                 |                              | - Na Malásia, as vagens jovens são cortadas em pedaços pequenos e adicionadas a molhos;<br><br>- Amplamente consumidos e utilizados na medicina popular indiana<br><br>- Na Tailândia são consumidos como legumes por mais de 100 anos | Abdulkarim <i>et al.</i> (2005);<br>Chumark <i>et al.</i> (2008)<br>Mehta <i>et al.</i> (2003) | —                  |             |
| Flores          | Cozidas                      | - Usadas como vegetal, particularmente na Índia, Paquistão, Filipinas, Havaí e em muitas partes da África, pelo homem, sem relatos de toxicidade   | Anwar; Ashraf; Bhangar (2005);<br>Anwar <i>et al.</i> (2007);<br>Joshi; Mehta (2010)           | —                  |             |

Tabela 1 (CONCLUSÃO) - Levantamento bibliográfico acerca do histórico de uso seguro\* da espécie *M. oleifera*

| Parte da planta | Formas de Utilização | Aspectos positivos   | Referências                      | Aspectos negativos | Referências |
|-----------------|----------------------|--|----------------------------------|--------------------|-------------|
| Flores          |                      | - São amplamente consumidas e utilizadas na medicina popular indiana | Abdulkarim <i>et al.</i> (2005); | -                  |             |

\* A abordagem utilizada foi baseada nas recomendações de Delaney *et al.* (2008).

(-) Nenhum aspecto negativo foi encontrado.

<sup>a</sup> Líquido extraído da raiz.

## 6.2 Análises *in silico*

A análise *in silico* da sequência primária das isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, com ou sem o peptídeo sinal, conduzida nos bancos de dados do NCBI, Uniprot-Swissprot e UniProt-SwissProt-TrEMBL, não revelou qualquer identidade significativa com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais (Tabela 2).

As isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentaram identidade > 50%, no banco de dados NR com outras proteínas floculantes/coagulantes de *M. oleifera*, tais como MO 2.1 e MO 2.2. As isoformas Q3S2WL e Q2 mostraram similaridades com a cadeia B das proteínas mabilin I e III e albuminas 2S de *Capparis masaikai*. Apenas a sequência (cadeia A + “linker” + cadeia B) da isoforma Q3S2WL apresentou identidade > 50% com a cadeia A da proteína mabilin I. O mesmo foi observado para o banco de dados Swissprot onde todas as isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> exibiram identidade com as proteínas MO 2.1 e MO 2.2 de *M. oleifera*.

No banco de dados Env-nr, as isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, com ou sem o peptídeo sinal, apresentaram similaridade com proteínas de metagenoma marinho, porém com identidade inferior a 50% e E-value não significativo. Utilizando o banco de dados PDB, as isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentaram identidade com a estrutura cristal da cadeia A da proteína mabilin I de *C. masaikai*. Identidade acima de 50% foi também observada para as isoformas Q3GS e Q3S2 com a cadeia A da napina de *B. napus*, porém com E-value não significativo. Nesse último caso, a identidade foi observada apenas quando a sequência com o peptídeo sinal foi analisada. Quando o banco de dados Refseq\_protein foi utilizado, as isoformas Q3GS e Q3S2 mostraram identidade com uma proteína hipotética de *Citrus clementina*. Nessa mesma base de dados, não foi observado qualquer identidade das demais isoformas, seja na presença ou ausência do peptídeo sinal, com proteínas capazes de causar efeitos adversos.

Nos bancos de dados Uniprot-Swissprot e UniProt-SwissProt-TrEMBL, as isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> praticamente exibiram identidade apenas com proteínas de *M. oleifera*, de acordo com os critérios adotados. Somente a isoforma Q3S2WL mostrou identidade com a proteína mabilin II no banco de dados Uniprot-Swissprot (Tabela 2).

Tabela 2 - Pesquisa de similaridade da sequência primária de aminoácidos das isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não especializados) de proteínas\*

| Banco de dados         | Isoforma Q3GS                               |                  | Isoforma Q3S2                               |                  | Isoforma Q3S2WL   |                  | Isoforma Q2  |                  |
|------------------------|---|------------------|---|------------------|---|------------------|--|------------------|
|                        | Proteína(s) Similar(es)                     | Efeitos Adversos | Proteína(s) Similar(es)                     | Efeitos Adversos | Proteína(s) Similar(es)   | Efeitos Adversos | Proteína(s) Similar(es)  | Efeitos Adversos |
| NR <sup>†</sup>        | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i> | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i> | Sem relatos      | - Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i><br><br>- Proteínas mabilin I e III (cadeia B)   | Sem relatos      | - Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i><br><br>- Proteínas mabilin I e III (cadeia B) <sup>‡</sup> | Sem Relatos      |
| Swissprot <sup>†</sup> | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i> | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i> | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i><br><br>Proteína mabilin I (cadeia A) <sup>‡</sup> | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i><br><br>Proteína mabilin I (cadeia A) <sup>‡</sup>            | Sem Relatos      |
| Env-nr <sup>†</sup>    | _#  | -                | _#  | -                | _#  | -                | _#   | -                |
| PDB <sup>†</sup>       | Proteína mabilin II (cadeia A)              | Sem relatos      | Proteína mabilin II (cadeia A)              | Sem relatos      | Proteína mabilin II (cadeia A)  | Sem relatos      | Proteína mabilin II (cadeia A)   | Sem Relatos      |

Tabela 2 (CONCLUSÃO) - Pesquisa de similaridade da sequência primária de aminoácidos das isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> com proteínas tóxicas, antinutricionais e alergênicas em banco de dados gerais (não especializados) de proteínas\*

| Banco de dados                 | Isoforma Q3GS  |                  | Isoforma Q3S2  |                  | Isoforma Q3S2WL  |                  | Isoforma Q2                                 |                  |
|--------------------------------|--|------------------|--|------------------|--|------------------|---|------------------|
|                                | Proteína(s) Similar(es)                                      | Efeitos Adversos | Proteína(s) Similar(es)                                      | Efeitos Adversos | Proteína(s) Similar(es)  | Efeitos Adversos | Proteína(s) Similar(es)                     | Efeitos Adversos |
| Refseq_protein <sup>†</sup>    | Proteína hipotética de <i>Citrus clementina</i> <sup>‡</sup> | Sem relatos      | Proteína hipotética de <i>Citrus clementina</i> <sup>‡</sup> | Sem relatos      | _#   | -                | _#  | -                |
| UniProt SwissProt <sup>‡</sup> | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i>                  | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i>                  | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i><br><br>Proteína mabilin II | Sem relatos      | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i> | Sem relatos      |
| Uniprot-trEMBL <sup>¶</sup>    | _#   | -                | _#   | -                | Proteínas floculantes de <i>M. oleifera</i>                            | -                | _#  | -                |

\* A tabela engloba dados da análise das sequências com e sem o peptídeo sinal. O algoritmo utilizado foi BLASTP 2.2.29+ e a matriz de pontuação BLOSUM62. Foram considerados relevantes os resultados com *E-value* < 0.01, identidade > 50% e espaços ("gaps") ≤ 6%.

<sup>‡</sup> Encontrada apenas quando a sequência com peptídeo sinal foi analisada.

# Nenhuma proteína encontrada de acordo com os critérios utilizados.

<sup>†</sup> Banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

<sup>‡</sup> Acesso em: <http://www.uniprot.org/blast/>

<sup>¶</sup> Acesso em: <http://web.expasy.org/blast/>



A predição de alergenicidade conduzida nos bancos de dados de proteínas alergênicas (ADFS, Allermatch™, AllergenOnline e SDAP) mostrou que não há identidade > 70% da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, em todas as suas isoformas, com qualquer proteína alergênica conhecida, utilizando comparações do tipo FASTA completa (Tabelas 3 e 4).

Utilizando o critério da FAO/WHO de identidade > 35%, as quatro isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentaram identidade com proteínas reconhecidamente alergênicas (Tabelas 3 e 4). No banco de dados ADFS, foi encontrada identidade da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> com 8 proteínas alergênicas para a isoforma Q3GS e 7 proteínas alergênicas para as isoformas Q3S2, Q3S2WL e Q2, em sua maioria albuminas 2S. Quando a sequência sem o peptídeo sinal foi analisada, uma diminuição no número de proteínas com identidade > 35% foi observada para as isoformas Q3GS (identidade com 5 proteínas), Q3S2 e Q2 (identidade com 4 proteínas para ambas). A pesquisa no banco de dados AllergenOnline, utilizando o mesmo critério, revelou identidade com 21 proteínas para as isoformas Q3GS e Q3S2WL, 20 proteínas para a isoforma Q3S2 e 24 proteínas para a isoforma Q2. Uma menor quantidade de proteínas com identidade > 35% foi encontrada quando as sequências sem o peptídeo sinal das isoformas Q3GS (15), Q3S2 (16) e Q3S2WL (19) foram utilizadas na análise, nessa base de dados. No banco de dados Allermatch™, foram encontradas 10 proteínas alergênicas com identidade > 35% para a isoforma Q3GS com peptídeo sinal e 7 proteínas para essa mesma isoforma sem o peptídeo sinal. Nessa mesma base de dados, as isoformas Q3S2 e Q3S2WL com o peptídeo sinal apresentaram identidade com 11 proteínas. No entanto, quando a sequência sem o peptídeo sinal da isoforma Q3S2 foi utilizada, apenas 8 proteínas foram encontradas. A quantidade de proteínas para a isoforma Q2 permaneceu a mesma com ou sem peptídeo sinal, 9 proteínas com identidade superior a 35%. O banco de dados SDAP apresentou a menor quantidade de proteínas com identidade > 35%, quando comparadas as isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>; foram 3 proteínas para as isoformas Q3GS e Q3S2WL, 4 proteínas para a isoforma Q3S2 e 5 proteínas para a isoforma Q2. Esse número foi ainda menor para três das sequências das isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> sem o peptídeo sinal. Apenas 1 proteína para a isoforma Q3GS e 2 proteínas para as isoformas Q3S2 e Q2. A isoforma Q3S2WL apresentou identidade

com 5 proteínas, um resultado superior quando comparado ao da sequência da proteína com o peptídeo sinal.

A identidade com proteínas alergênicas também foi analisada utilizando como critério pesquisas de seis, sete e oito aminoácidos contíguos idênticos. Adotando como critério a identidade de seis aminoácidos contíguos, em todos os bancos de dados analisados, as isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentaram identidade com sequências de proteínas alergênicas. A predição resultou em identidade com 4 e 5 proteínas (menor e maior número de resultados dentre os bancos de dados acessados, respectivamente) para a isoforma Q3GS, 4 a 6 proteínas para a isoforma Q3S2, 5 a 11 proteínas para a isoforma Q3S2WL e 8 a 16 proteínas para a isoforma Q2 (Tabela 3). Para a sequência sem o peptídeo sinal, esse número foi reduzido. Números máximos de 4 proteínas alergênicas, para as isoformas Q3GS e Q3S2, e de 8, para as isoformas Q3S2 e Q2, foram encontrados (Tabela 4).

Para a pesquisa de similaridade de sete aminoácidos contíguos nos bancos de dados ADFS, Allermatch<sup>TM</sup> e SDAP, as isoformas Q3GS e Q3S2 mostraram identidade com sequências de 2 proteínas alergênicas. Com esse mesmo critério, no banco de dados ADFS, as isoformas Q3S2WL e Q2 apresentaram identidade com 4 e 5 proteínas alergênicas, respectivamente. A isoforma Q3S2WL, nos bancos de dados Allermatch<sup>TM</sup> e SDAP mostrou identidade com apenas 1 proteína alergênica, enquanto que a isoforma Q2 apresentou identidade com 2 e 1 proteínas, respectivamente (Tabela 3). A pesquisa com as sequências sem o peptídeo sinal mostrou que não há identidade das isoformas Q3GS e Q3S2 com nenhuma proteína alergênica nos bancos de dados ADFS, Allermatch<sup>TM</sup> e SDAP. Entretanto, para as isoformas Q3S2WL e Q2, identidade com 4 proteínas foi encontrada no banco de dados ADFS e somente uma proteína nos bancos de dados Allermatch<sup>TM</sup> e SDAP (Tabela 4). Os peptídeos encontrados nas pesquisas com seis e sete aminoácidos nos bancos de dados citados não são necessariamente peptídeos diferentes.

Aplicando-se o critério de busca para oito aminoácidos contíguos, não foi encontrada para qualquer uma das isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, com ou sem peptídeo sinal, nenhuma sequência idêntica nos bancos de dados de alérgenos utilizados (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Pesquisa de similaridade da sequência total de aminoácidos codificados, incluindo o peptídeo sinal, das quatro isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> em banco de dados de proteínas alergênicas

| Banco de Dados | Isoforma Q3GS   |                      |                         | Isoforma Q3S2   |                      |                         | Isoforma Q3S2WL |                      |                         | Isoforma Q2     |                      |                         |
|----------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|
|                | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> |
| AllergenOnline | 0*              | 21                   | ¥/0                     | 0               | 20                   | ¥/0                     | 0               | 21                   | ¥/0                     | 0               | 24                   | ¥/0                     |
| ADFS           | 0               | 8                    | 5/2/0                   | 0               | 7                    | 6/2/0                   | 0               | 7                    | 11/4/0                  | 0               | 7                    | 16/5/0                  |
| Allermatch™    | 0               | 10                   | 4/2/0                   | 0               | 11                   | 4/2/0                   | 0               | 11                   | 5/1/0                   | 0               | 9                    | 8/2/0                   |
| SDAP           | 0               | 3                    | 4/2/0                   | 0               | 4                    | 4/2/0                   | 0               | 3                    | 6/1/0                   | 0               | 5                    | 4/1/0                   |

SC: Sequência total de aminoácidos (aa's) codificados, incluindo o peptídeo sinal.

<sup>†</sup>Para ser considerado relevante a identidade deve ser superior a 70% (AALBERSE, 2000).

<sup>‡</sup>Para ser considerado relevante a identidade deve ser superior a 35% (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

<sup>¶</sup>Para ser considerado relevante a identidade deve ser de 100% (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

¥ Nessa base de dados não é possível fazer uma pesquisa para 6 e 7 aminoácidos contíguos.

\*Número de sequências similares encontradas de acordo com as especificidades para cada parâmetro analisado.

Tabela 4 - Pesquisa de similaridade da sequência primária de aminoácidos (cadeia A + “linker” + cadeia B) das quatro isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> em banco de dados de proteínas alergênicas

| Banco de Dados | Isoforma Q3GS   |                      |                         | Isoforma Q3S2   |                      |                         | Isoforma Q3S2WL |                      |                         | Isoforma Q2     |                      |                         |
|----------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|
|                | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> | SC <sup>†</sup> | 80 aa's <sup>‡</sup> | 6/7/8 aa's <sup>¶</sup> |
| AllergenOnline | 0*              | 15                   | ¥/0                     | 0               | 16                   | ¥/0                     | 0               | 19                   | ¥/0                     | 0               | 24                   | ¥/0                     |
| ADFS           | 0               | 5                    | 4/0/0                   | 0               | 4                    | 4/0/0                   | 0               | 4                    | 8/4/0                   | 0               | 7                    | 8/4/0                   |
| Allermatch™    | 0               | 7                    | 3/0/0                   | 0               | 8                    | 3/0/0                   | 0               | 11                   | 2/1/0                   | 0               | 9                    | 2/1/0                   |
| SDAP           | 0               | 1                    | 0/0/0                   | 0               | 2                    | 0/0/0                   | 0               | 5                    | 2/1/0                   | 0               | 2                    | 1/1/0                   |

SC: Sequência completa de aminoácidos (aa's).

<sup>†</sup>Para ser considerado relevante a identidade deve ser superior a 70% (AALBERSE, 2000).

<sup>‡</sup>Para ser considerado relevante a identidade deve ser superior a 35% (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

<sup>¶</sup>Para ser considerado relevante a identidade deve ser de 100% (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

¥ Nessa base de dados não é possível fazer uma pesquisa para 6 e 7 aminoácidos contíguos.

\*Número de sequências similares encontradas de acordo com as especificidades para cada parâmetro analisado.

Com o objetivo de avaliar a relevância imunológica dos peptídeos com seis e sete aminoácidos encontrados nas pesquisas nos bancos de dados de alérgenos utilizados, os mesmos foram submetidos a uma nova pesquisa na base de dados de epítomos (determinantes imunogênicos), ADFS. Os resultados encontrados na pesquisa de seis aminoácidos corresponderam a um total de 17 peptídeos diferentes nas quatro sequências das isoformas, contendo o peptídeo sinal. Sete dos peptídeos encontrados pertencem somente a isoforma Q2, que ainda compartilha mais 3 peptídeos com a isoforma Q3S2WL. Ambas as isoformas totalizam 13 dos peptídeos encontrados. Dos 4 peptídeos restantes, apenas um pertence somente à isoforma Q3S2, um é encontrado nas isoformas Q3S2WL, Q3GS e Q3S2 e 2 pertencem às duas últimas isoformas mencionadas. Os peptídeos encontrados pertencem a alérgenos de várias espécies de plantas, a exemplo do caju (*Anacardium occidentale* - "Ana o 3"), trigo (*Triticum aestivum* - "Tri a ?"), mostarda (*Sinapis alba* - "Sin a ?"), amêndoa (*Prunus dulcis* - "Pru d u 6 b"), castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* - "Ber e ?"), feijão-verde (*Vigna radiata* - "Vig r 2 b), mamona (*Ricinus communis* - "Ric c 1"), seringueira (*Hevea brasiliensis* - "Hev b 1), dentre outras espécies vegetais, e um peptídeo foi encontrado no alérgeno "Api m 6" de abelha (*Apis mellifera*). Contudo, apenas o peptídeo "DNQQGQ", encontrado na isoforma Q2, apresentou identidade de 100% com um epítomo do alérgeno "Hev b 1" da seringueira. Todos os outros peptídeos não apresentaram qualquer identidade, dentro dos padrões analisados, com epítomos de proteínas alergênicas.

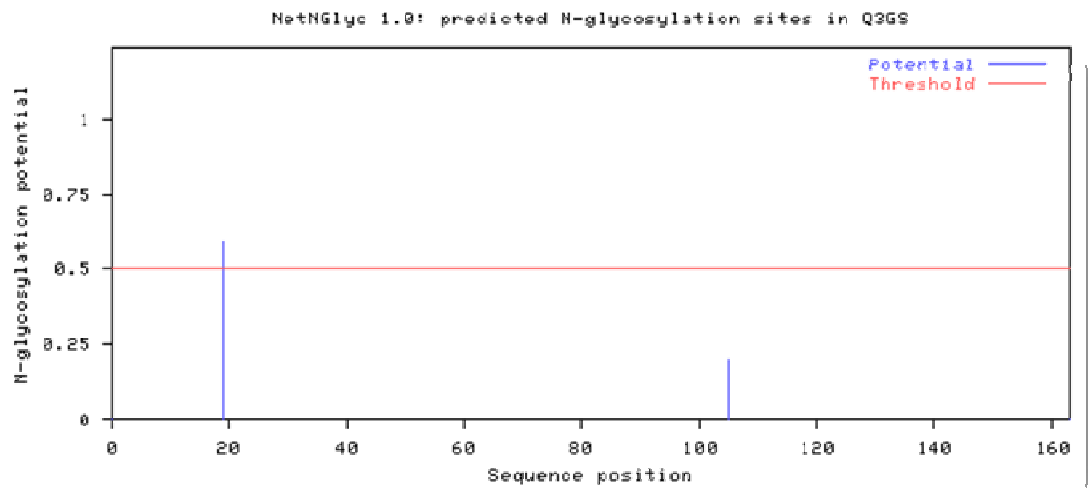
A relevância imunológica dos peptídeos de seis aminoácidos das sequências sem o peptídeo sinal também foi analisada. Apenas 6 peptídeos diferentes foram encontrados com identidade com alérgenos de espécies como pistache (*Pistacia vera*), trigo, mostarda, amêndoa, feijão-verde, avelã (*Corylus avellana*) e gergelim (*Sesamum indicum*). Esses, quando analisados no banco de dados de epítomos do ADFS, não apresentaram identidade com nenhum epítomo dos alérgenos pertencentes às espécies citadas.

Os 4 peptídeos diferentes de sete aminoácidos encontrados nas buscas utilizando as sequências das isoformas contendo o peptídeo sinal não apresentaram identidade com nenhum epítomo de alérgenos depositados no banco de epítomos do ADFS. O mesmo pode ser observado para os 2 peptídeos encontrados para a análise com as sequências das isoformas sem o peptídeo sinal.

A busca por sítios de *N*-glicosilação, utilizando o programa NetNGlyc 1.0 Server, mostrou a presença de sítios de *N*-glicosilação em quase todas as isoformas na posição 19, exceto para a isoforma Q2 (Figura 7). Portanto, a região que compreende a proteína madura (cadeia A + *linker* + cadeia B) não apresenta sítios potenciais de *N*-glicosilação.

Figura 7 - Pesquisa de sítios potenciais de *N*-glicosilação na sequência primária da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>

(A) Isoforma Q3GS



(B) Isoforma Q3S2

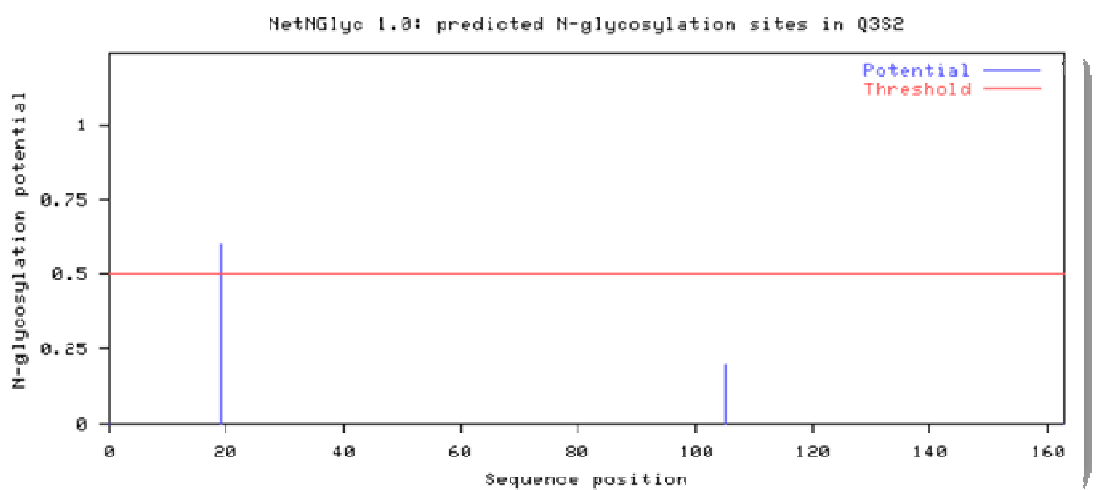
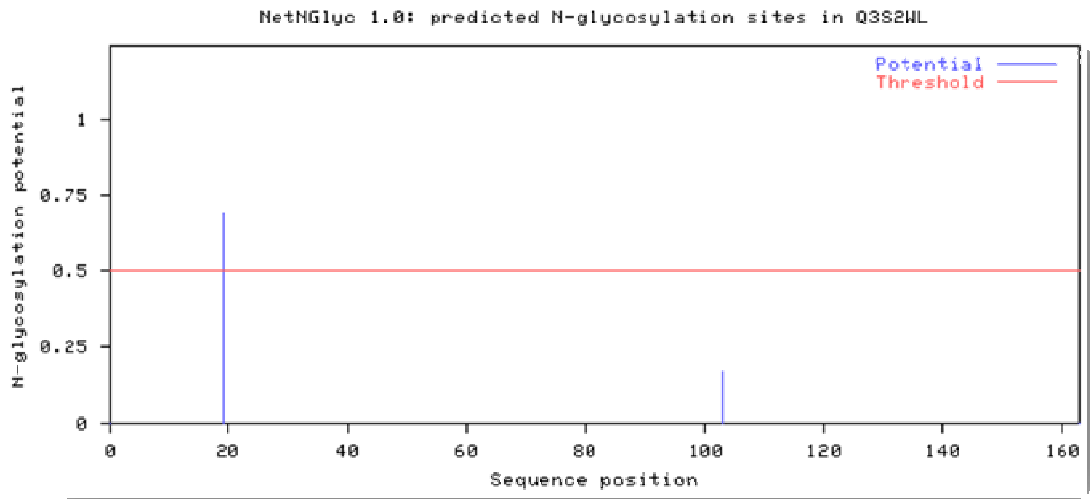
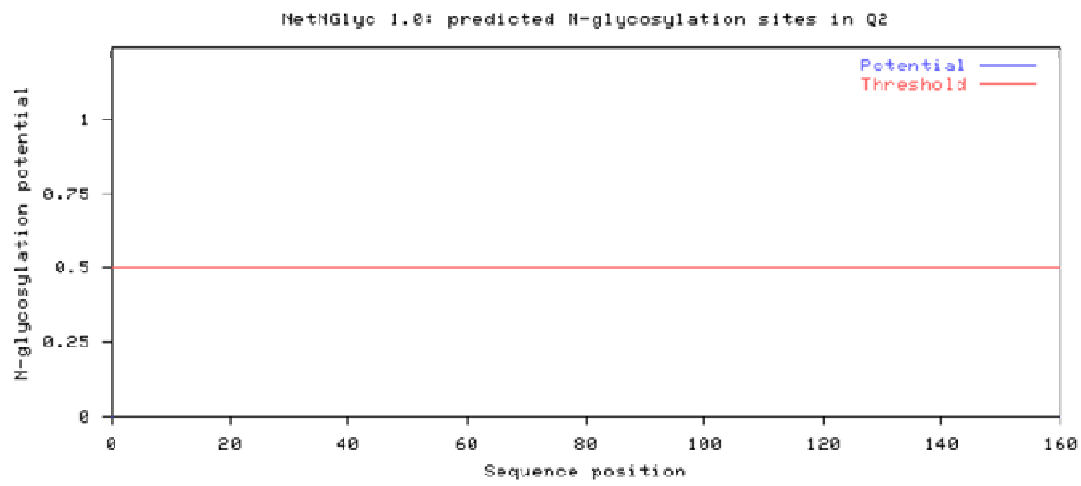


Figura 7 (CONCLUSÃO) - Pesquisa de sítios potenciais de *N*-glicosilação na sequência primária da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>

(C) Isoforma Q3S2WL



(D) Isoforma Q2



O eixo X indica as posições referentes aos aminoácidos na sequência primária de *Mo*-CBP<sub>3</sub>. O eixo Y indica a pontuação referente à probabilidade de ocorrer uma ligação *N*-glicosídica, representada pela linha vertical azul. A linha vermelha indica o valor mínimo para que ocorra uma ligação *N*-glicosídica.

### 6.3 Obtenção e caracterização da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>

Na Tabela 5, as etapas de purificação da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, com os respectivos teores e rendimentos proteicos, estão apresentados. O teor médio de proteínas extraídas da farinha das sementes de *M. oleifera* correspondeu a  $212,48 \pm 2,48$  mgP/gF. A fração albumínica obtida a partir de diálise exaustiva contra água e centrifugação do extrato total, após liofilização, representou  $140,9$  mgP/gF  $\pm 4,87$ . O rendimento proteico dessa fração correspondeu a 66,31% em relação às proteínas do extrato total. A liofilização da fração albumínica correspondeu à primeira modificação em relação ao protocolo estabelecido por Gifoni *et al.* (2012).

Proteínas ligantes à quitina foram obtidas após cromatografia de afinidade em matriz de quitina. O perfil cromatográfico resultante dessa cromatografia está ilustrado na Figura 8. Nessa etapa, não foi utilizado o açúcar *N*-acetil-D-glucosamina para eluição de material ligante à quitina, como descrito no protocolo de Gifoni *et al.* (2012), correspondendo, então, à segunda modificação. O rendimento proteico dessa fração após diálise e liofilização foi de  $47,57 \pm 5,46$  mgP/gF, correspondendo a 23,05% em relação ao extrato total. As proteínas ligantes à quitina eluídas com ácido acético (P<sub>AC</sub>) foram utilizadas para o próximo passo cromatográfico.

A aplicação de P<sub>AC</sub> em matriz de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow resultou em quatro frações distintas. Todas as proteínas eluídas receberam a denominação *Mo*-CBP (Mo: *Moringa oleifera* e “CBP: Chitin Binding Protein”), acrescida de números subscritos (1 - 4) que representam a ordem de eluição. A fração eluída com tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,5 M, denominada de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, é o objeto de estudo deste trabalho. O perfil cromatográfico resultante da cromatografia de troca iônica em matriz CM-Sepharose Fast Flow está ilustrado na Figura 8. A troca da matriz, de Resource S para CM-Sepharose Fast Flow, e a não utilização do cromatógrafo FPLC (“Fast Protein Liquid Chromatography”) corresponderam à terceira modificação realizada neste protocolo. Após liofilização, *Mo*-CBP<sub>3</sub> mostrou-se com um rendimento de aproximadamente  $10,89 \pm 1,65$  mgP/gF, correspondendo a 5,12% das proteínas do extrato total (Tabela 5).

O perfil eletroforético de *Mo*-CBP<sub>3</sub> sob condições desnaturantes mostra que, na ausência de agente redutor, *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentou-se como uma banda de massa molecular aparente de 18 kDa (Figura 10A). Em condições redutoras, *Mo*-CBP<sub>3</sub>



mostrou duas cadeias de massas moleculares aparentes de 8,0 kDa e 4,0 kDa (Figura 10A). Esse perfil foi confirmado, e melhor evidenciado, na análise realizada por eletroforese em sistema Tricina-PAGE-SDS (Figura 10B).

Tabela 5 - Etapas de purificação de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, com os respectivos teores e rendimentos proteicos

| <b>Etapas de purificação</b>             | <b>Proteína (mgP/gF)<sup>a</sup></b> | <b>Rendimento (%)<sup>b</sup></b> |
|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Extrato total                            | 212,48 ± 2,48                        | 100,0                             |
| Fração albumina                          | 140,90 ± 4,87                        | 66,31                             |
| P <sub>AC</sub> <sup>c</sup>             | 47,57 ± 5,46                         | 23,05                             |
| <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> <sup>d</sup> | 10,89 ± 1,65                         | 5,12                              |

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos similares.

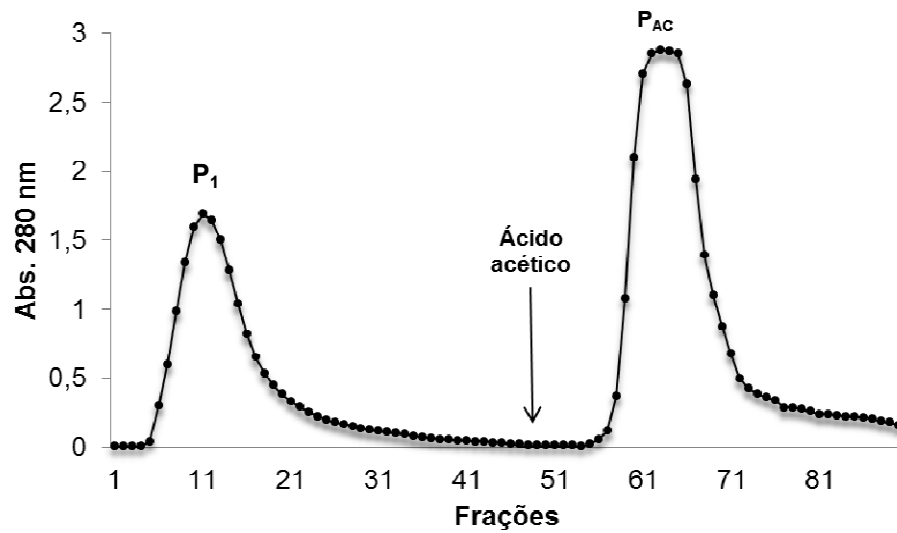
<sup>a</sup> Quantidade total de proteína recuperada (mg), em cada etapa de purificação, por grama de farinha de sementes de *M. oleifera*.

<sup>b</sup> Rendimento proteico (%) em cada etapa de purificação, considerando aquele determinado no extrato total como sendo 100%.

<sup>c</sup> Fração proteica ligante à quitina eluída com ácido acético.

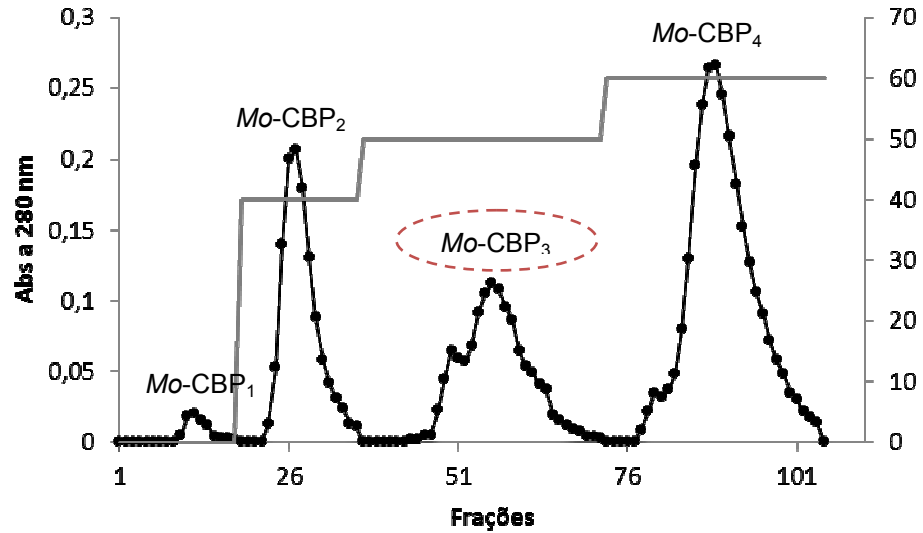
<sup>d</sup> *Mo*-CBP<sub>3</sub>: proteína ligante à quitina e retida na CM-Sepharose, eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M.

Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração albumina, obtida a partir do extrato total de sementes de *M. oleifera*, em matriz de quitina



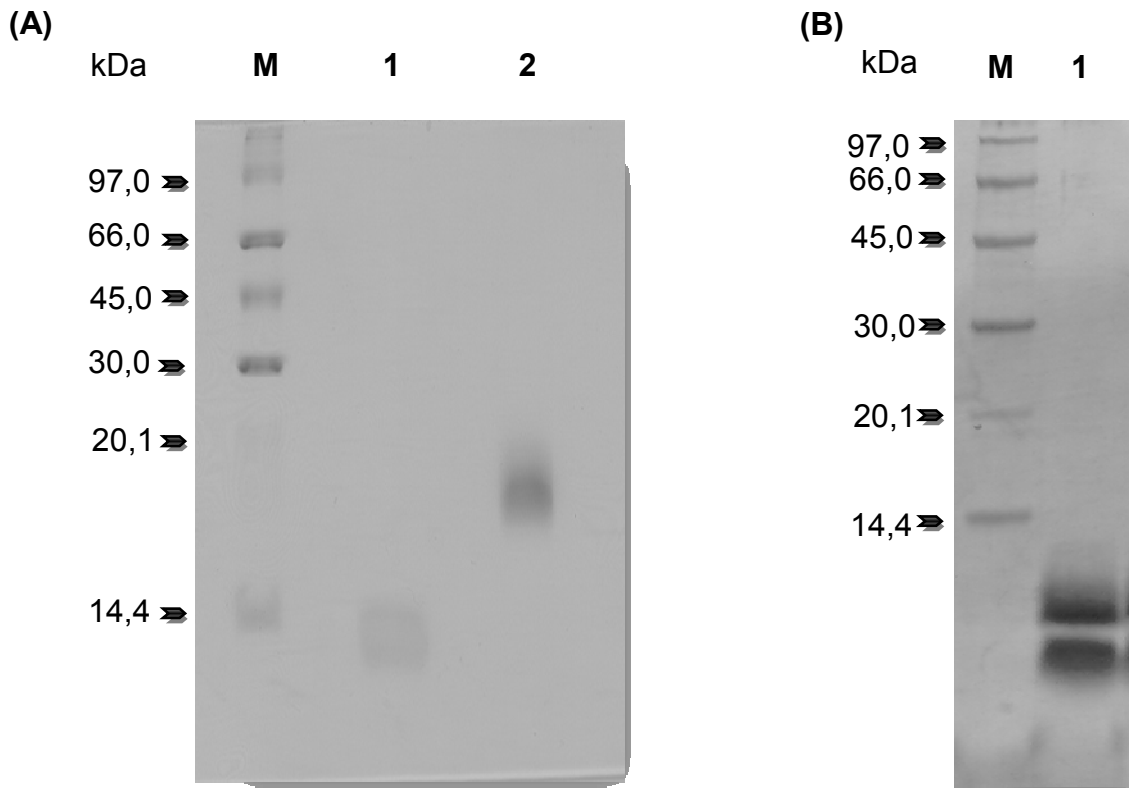
A fração albumina (1 g) foi aplicada em matriz de quitina (110 mL) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. P<sub>1</sub> corresponde às proteínas não adsorvidas que foram eluídas com tampão de equilíbrio. P<sub>AC</sub> representa as proteínas adsorvidas na matriz e eluídas com ácido acético 0,05 M. Frações (4,5 mL) foram coletadas com fluxo de 60 mL/h e monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

Figura 9 - Perfil cromatográfico da fração proteica retida em matriz de quitina ( $P_{AC}$ ) em matriz de CM-Sepharose Fast Flow



$P_{AC}$  (180 mg) foi aplicado à matriz (80 mL) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.  $Mo-CBP$  representa as proteínas ligantes à quitina de sementes de *M. oleifera*, obtidas por afinidade na matriz de quitina.  $Mo-CBP_3$  corresponde à proteína adsorvida na matriz e eluída com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,5 M. Frações (4,5 mL) foram coletadas em um fluxo de 45 mL/h e monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

Figura 10 - Perfil eletroforético de *Mo*-CBP<sub>3</sub>



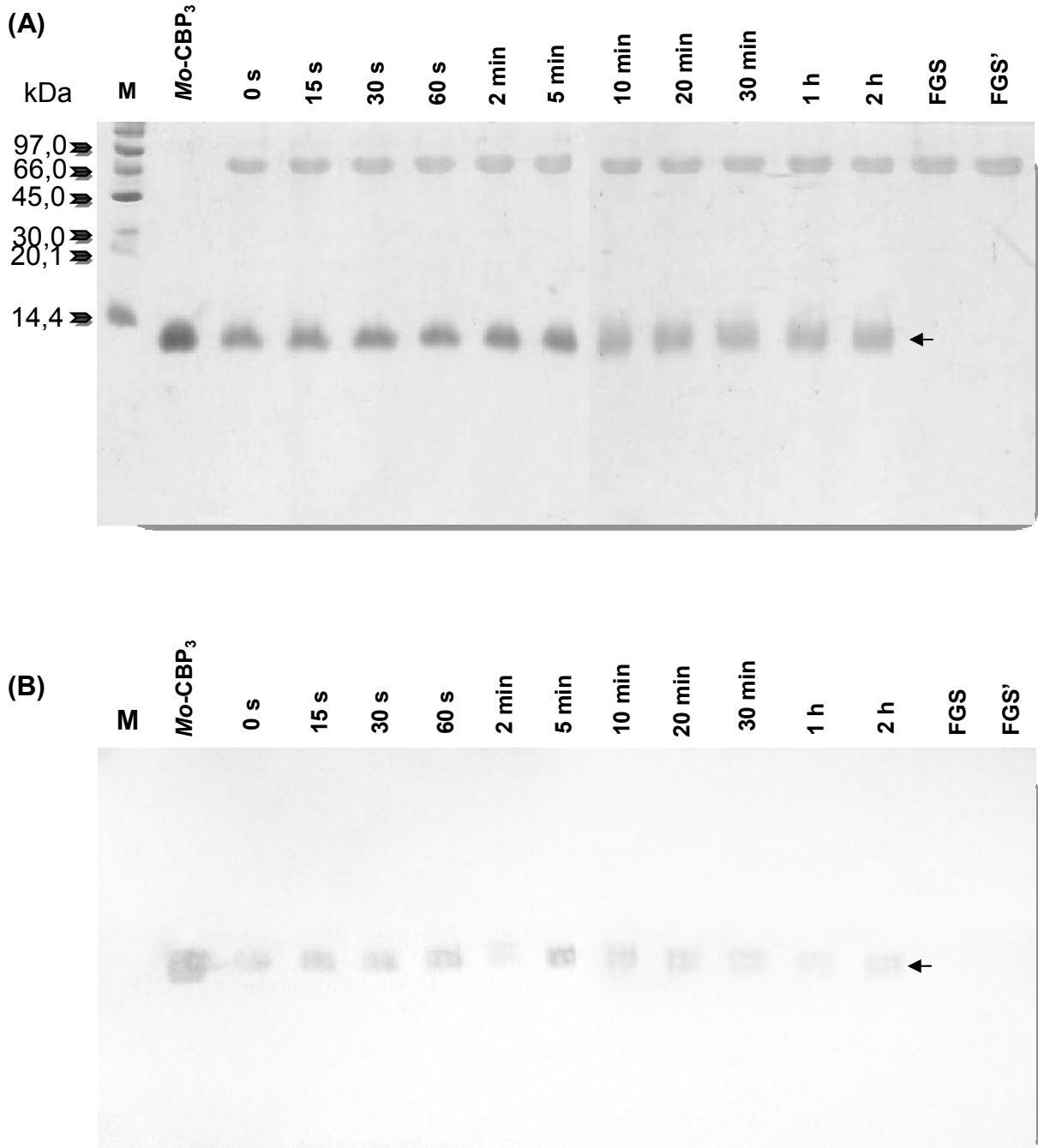
Amostras de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (5 µg de proteína) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15,0%, contendo SDS (A) e em sistema Tricina-Poliacrilamida-SDS (B). 1 - *Mo*-CBP<sub>3</sub> na presença de β-mercaptoetanol 1% (A) e 6% (B), respectivamente; 2 - *Mo*-CBP<sub>3</sub> na ausência de β-mercaptoetanol e M - Marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 30,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa e α-lactalbumina - 14,4 kDa); As proteínas foram coradas com “Coomassie Brilliant Blue R-250”.

### **6.3.1 Digestibilidade *in vitro* e estabilidade à temperatura**

A digestibilidade *in vitro* de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi avaliada utilizando enzimas digestivas encontradas no trato gastrointestinal. *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi posta em contato com pepsina e pancreatina (uma mistura de proteases, lipases e amilases), nas condições ideais para hidrólise enzimática, de forma não sequencial. BSA, utilizada como controle, foi totalmente digerida pelas enzimas. A proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> na presença de pepsina não foi completamente digerida, mesmo depois de 2 h de incubação. Apenas uma digestão parcial de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi observada após 10 min de contato com a referida enzima, mostrando-se como uma banda difusa no gel (Figura 11A). Entretanto, quando em contato com pancreatina, a proteína mostrou-se totalmente digerida após 2 h (Figura 12A). A proteína permaneceu detectável em ensaio de imunoreatividade após incubação com pepsina em todos os tempos e com pancreatina até 1 h (Figuras 11B e 12B).

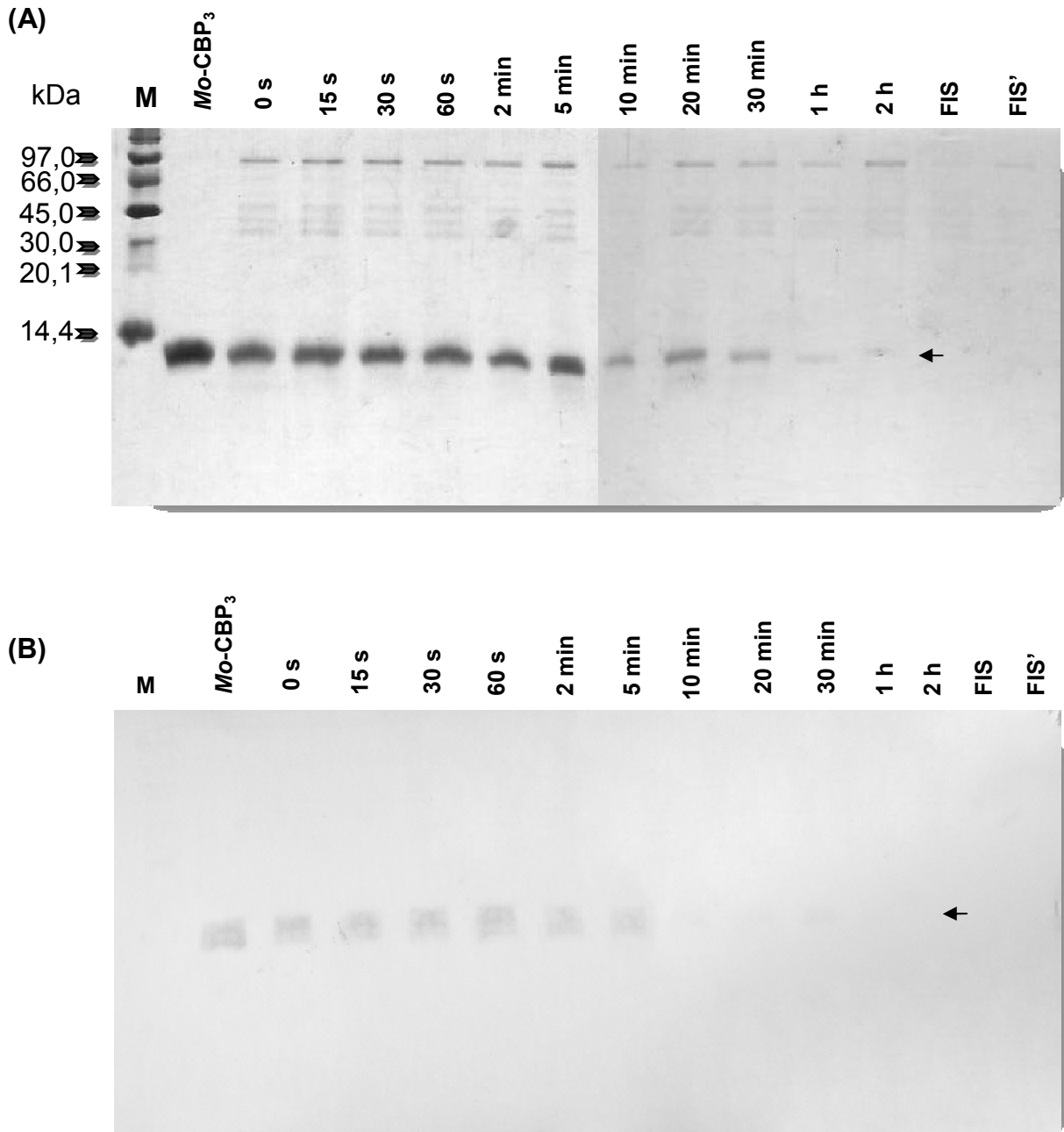
Quanto à estabilidade térmica, *Mo*-CBP<sub>3</sub> mostrou-se resistente ao tratamento térmico após incubação a 100 °C, por 10, 30 e 60 min. Em adição, a proteína ainda mostrou-se imunoreativa (Figura 13).

Figura 11 - Digestibilidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> em fluido gástrico simulado - FGS. (A) PAGE-SDS; (B) "Western Blot"



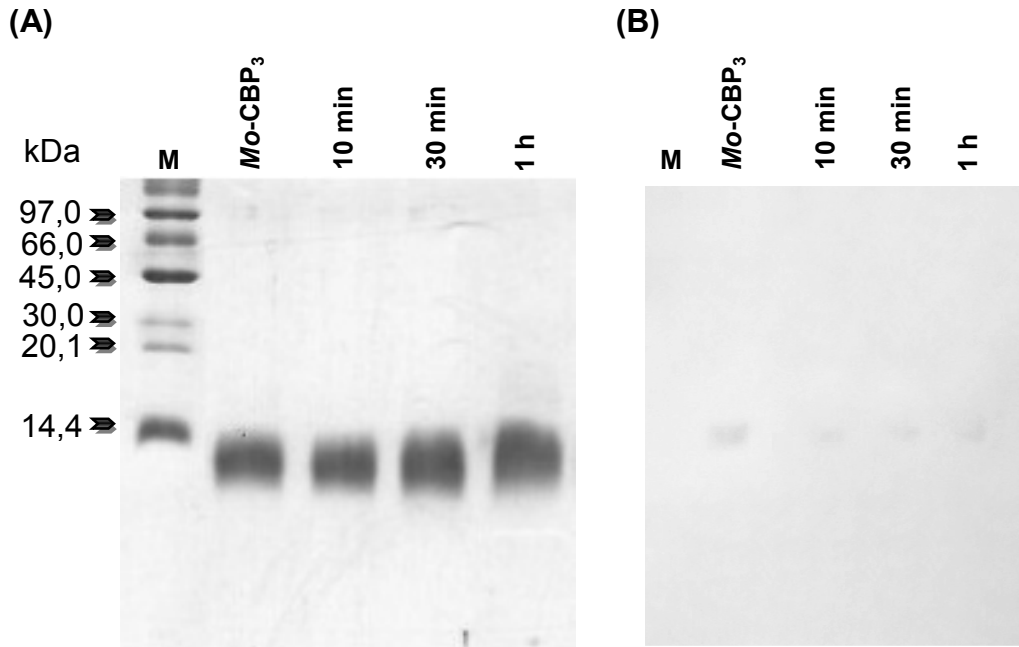
*Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 0,5 mg/mL. Amostras de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (2,5 µg de proteína) em FGS, por 0, 15, 30, 60 s, 2, 5, 10, 20, 30 min, 1 e 2 h, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 17,5%, coradas com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25% (A) ou transferidas (5,0 µg de proteína) para membrana de PVDF para imunodeteção com anti-*Mo*-CBP<sub>3</sub> (1:10.000) (B). M - marcadores de massa molecular; FGS: FGS sem incubação; FGS': FGS com incubação por 2 h. O tampão de amostra para FGS contém β-mercaptoetanol 5% e DDT 1 M.

Figura 12 - Digestibilidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> em fluido intestinal simulado - FIS. (A) PAGE-SDS; (B) "Western Blot"



*Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 0,5 mg/mL. Amostras de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (2,5 µg de proteína) em FIS por 0, 15, 30, 60 s, 2, 5, 10, 20, 30 min, 1 e 2 h, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 17,5%, coradas com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25% (A) ou transferidas (5,0 µg de proteína) para membrana de PVDF para imunodeteção com anti-*Mo*-CBP<sub>3</sub> (1:10.000) (B). M: marcadores de massa molecular; FIS: FIS sem incubação; FIS': FIS com incubação por 2 h. O tampão de amostra para FIS contém β-mercaptoetanol 5% e DDT 1 M.

Figura 13 - Estabilidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> submetida à temperatura de 100 °C por diferentes tempos



(A) PAGE-SDS; (B) "Western Blot". *Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 1 mg/mL na presença de β-mercaptoetanol 5% e DDT 1 M. Amostras de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (5,0 µg de proteína) em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, submetidas ou não a 100 °C por 10, 30 e 60 min, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 17,5% coradas com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25% (A) ou transferidas (5,0 µg de proteína) para membrana de PVDF para imunodeteção com anti-*Mo*-CBP<sub>3</sub> (1:10.000) (B). M - marcadores de massa molecular; *Mo*-CBP<sub>3</sub>: solubilizada e estocada a 4 °C.



#### 6.4 Ensaio de toxicidade aguda (dose única) via oral da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* em camundongos

Na avaliação de toxicidade aguda de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, via oral, não foram registrados mortalidade ou quaisquer sintomas aparentes de intoxicação, bem como qualquer comportamento anormal, seja nos animais do grupo teste ou naqueles do grupo controle, durante os 14 dias de observação (Tabela 6).

Quanto à evolução do peso corporal e ganho de peso dos camundongos, mensurados ao longo dos 14 dias de observação (dias 0, 4, 7, 10 e 14), os dados estão mostrados na Figura 14. O peso corpóreo dos animais dos grupos experimentais não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) daquele dos animais do grupo controle, ocorrendo uma sobreposição clara entre as curvas de crescimento de todos os grupos.

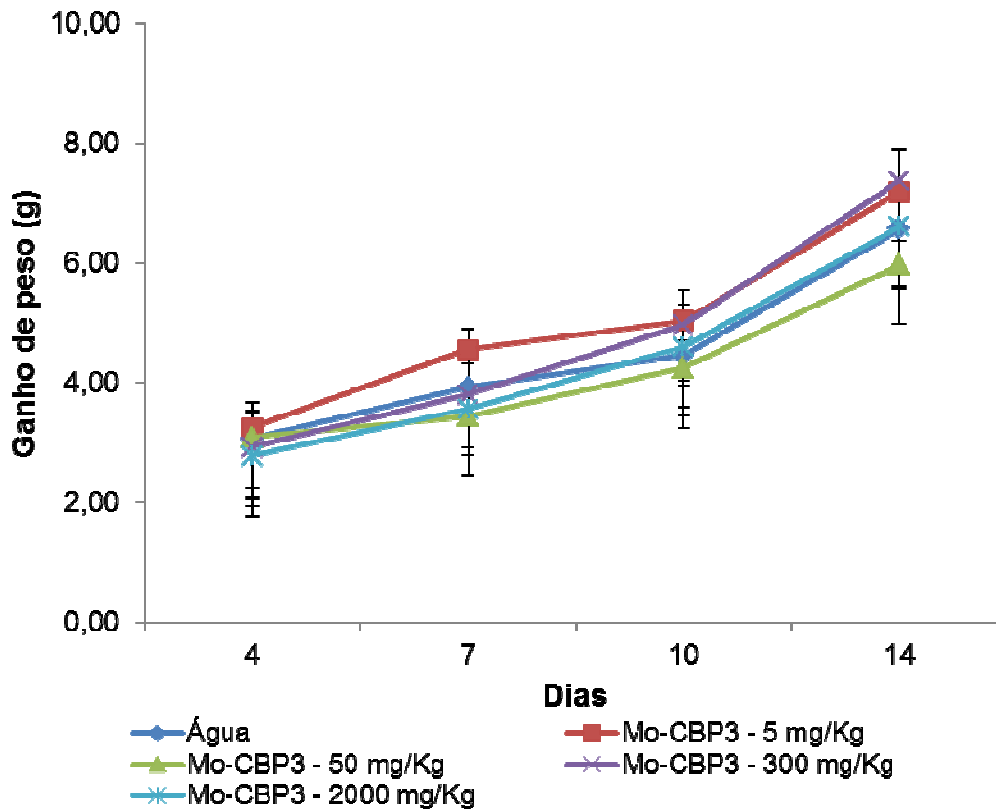
Tabela 6 - Verificação da mortalidade e de sinais de toxicidade, após 24 h e 14 dias, em camundongos submetidos ao teste de toxicidade aguda, via oral, da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*

| Grupo | Dose (mg/kg)              | 24 h | 14 dias | Sinais de toxicidade <sup>a</sup> |
|-------|---------------------------|------|---------|-----------------------------------|
|       |                           | M/T* | M/T*    |                                   |
| 0     | 0,2 mL (H <sub>2</sub> O) | 0/6  | 0/6     | Sem alterações observadas         |
| 1     | 5                         | 0/6  | 0/6     | Sem alterações observadas         |
| 2     | 50                        | 0/6  | 0/6     | Sem alterações observadas         |
| 3     | 300                       | 0/6  | 0/6     | Sem alterações observadas         |
| 4     | 2000                      | 0/6  | 0/6     | Sem alterações observadas         |

\*M/T: Número de camundongos mortos/número total de camundongos (n = 6).

<sup>a</sup>piloereção, anestesia, atividade motora, frêmito vocal, resposta ao toque, equilíbrio, presença de contorções, tremores, ptose e ocorrência de fezes escuras ou disformes.

Figura 14 - Ganho de peso corpóreo (g) de camundongos fêmeas administradas oralmente com a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e água destilada como veículo (controle) durante 14 dias



Os valores são média  $\pm$  desvio-padrão para cada dia de pesagem ( $n = 6/\text{grupo}$ ). As medições de ganho de peso corpóreo nos dias mencionados não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ; One-way ANOVA) entre os grupos.

Ao final dos 14 dias, os animais foram sacrificados e seus órgãos internos dissecados, para obtenção do peso úmido relativo dos mesmos. Com relação a esse parâmetro, através da análise estatística, percebe-se que a proteína, nas doses testadas (5, 50, 300 e 2000 mg/kg), afetou o peso dos ovários bem como do útero e tubas uterinas. Para os demais órgãos, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, mesmo na maior dose testada (2000 mg/kg), e o controle (Tabela 7). Em adição, a análise histopatológica não revelou qualquer alteração em todos os órgãos examinados, inclusive nos órgãos do sistema reprodutor. Alterações patológicas (degenerativas, inflamatórias ou neoplásicas) também não foram encontradas nos órgãos examinados, com base na análise histopatológica.

Tabela 7 - Peso úmido relativo (%) dos órgãos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e com água destilada como veículo (controle)

| Órgãos   | Grupos      |                                      |                                       |  |   |
|----------|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
|          | Controle    | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>5 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>50 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>300 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>2000 mg/kg |
| Cérebro  | 1,55 ± 0,07 | 1,58 ± 0,13                          | 1,54 ± 0,11                           | 1,47 ± 0,07                            | 1,55, ± 0,09                            |
| Timo     | 0,27 ± 0,04 | 0,29 ± 0,04                          | 0,24 ± 0,06                           | 0,35 ± 0,09                            | 0,29 ± 0,05                             |
| Coração  | 0,56 ± 0,08 | 0,52 ± 0,07                          | 0,54 ± 0,06                           | 0,55 ± 0,06                            | 0,52 ± 0,07                             |
| Pulmões  | 0,53 ± 0,13 | 0,61 ± 0,04                          | 0,65 ± 0,08                           | 0,59 ± 0,04                            | 0,63 ± 0,08                             |
| Baço     | 0,31 ± 0,02 | 0,28 ± 0,04                          | 0,24 ± 0,03                           | 0,26 ± 0,05                            | 0,26 ± 0,05                             |
| Pâncreas | 0,54 ± 0,03 | 0,51 ± 0,02                          | 0,52 ± 0,04                           | 0,51 ± 0,05                            | 0,46 ± 0,07                             |
| Fígado   | 5,30 ± 0,29 | 4,83 ± 0,23                          | 4,62 ± 0,25                           | 5,18 ± 0,76                            | 5,19 ± 0,37                             |
| Rins     | 1,47 ± 0,06 | 1,37 ± 0,06                          | 1,32 ± 0,05                           | 1,42 ± 0,12                            | 1,43 ± 0,09                             |
| Estômago | 0,74 ± 0,09 | 0,74 ± 0,08                          | 0,75 ± 0,07                           | 0,76 ± 0,03                            | 0,75 ± 0,07                             |
| Duodeno  | 1,76 ± 0,27 | 1,63 ± 0,15                          | 1,48 ± 0,29                           | 1,56 ± 0,28                            | 1,83 ± 0,29                             |

Tabela 7 (CONCLUSÃO) - Peso úmido relativo (%) dos órgãos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e com água destilada como veículo (controle)

| Órgãos               | Grupos      |                                      |                                       |  |   |
|----------------------|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
|                      | Controle    | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>5 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>50 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>300 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>2000 mg/kg |
| Jejuno               | 1,65 ± 0,14 | 1,39 ± 0,26                          | 1,42 ± 0,22                           | 1,29 ± 0,21                            | 1,52 ± 0,19                             |
| Íleo                 | 1,31 ± 0,16 | 1,11 ± 0,05                          | 1,22 ± 0,12                           | 1,34 ± 0,26                            | 1,25 ± 0,09                             |
| Intestino Grosso     | 2,29 ± 0,19 | 1,95 ± 0,10                          | 2,05 ± 0,23                           | 2,28 ± 0,21                            | 2,27 ± 0,16                             |
| Bexiga               | 0,07 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01                          | 0,06 ± 0,01                           | 0,07 ± 0,01                            | 0,06 ± 0,01                             |
| Ovários              | 0,11 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>             | 0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>              | 0,05 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>           | 0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>                |
| Tuba uterina + útero | 0,80 ± 0,05 | 0,42 ± 0,09 <sup>a</sup>             | 0,53 ± 0,16 <sup>a</sup>              | 0,42 ± 0,13 <sup>a</sup>               | 0,38 ± 0,06 <sup>a</sup>                |

Os valores são média ± desvio-padrão (n = 6/grupo).

<sup>a</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo controle comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 5 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg separadamente.

<sup>b</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 5 mg/kg comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg separadamente.

<sup>c</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg.

<sup>d</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg comparado com o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg.

A Tabela 8 mostra os resultados dos parâmetros hematológicos obtidos de todos os animais dos grupos experimentais e do grupo controle. Dentre os parâmetros analisados, o número de leucócitos apresentou diferença apenas no grupo administrado com a dose 5 mg da proteína/kg de peso corpóreo do animal. O número de plaquetas também variou nos grupos submetidos às doses de 50 e 300 mg da proteína/kg de peso corpóreo do animal, efeito não observado, na menor (5 mg/kg de peso corpóreo) e na maior (2000 mg/kg de peso corpóreo) dose quando comparadas com o controle. Em contrapartida, o número de neutrófilos, basófilos e monócitos foi alterado apenas na maior dose (2000 mg/kg de peso corpóreo).

No que diz respeito à dosagem dos parâmetros bioquímicos do soro, os dados estão mostrados na Tabela 9. Foram detectadas diferenças entre os grupos de camundongos para os valores de proteínas totais, albumina, ureia, HDL e LDL e triglicerídeos. As dosagens de proteínas totais e de albumina no soro dos camundongos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no grupo que recebeu a dose de 5 mg da proteína/kg de peso corpóreo do animal, quando comparado ao valor médio do grupo controle. O mesmo não se repetiu nos demais grupos experimentais. Quanto à dosagem de ureia sérica, os grupos que receberam a menor (5 mg/kg de peso corpóreo) e a maior (2000 mg/kg de peso corpóreo) dose apresentaram valores inferiores ( $p < 0,05$ ) àqueles apresentados pelos grupos 50 e 300 mg de proteína/kg de peso corpóreo do animal e controle. Os valores de HDL dos animais do grupo teste foram menores e diferentes ( $p < 0,05$ ) daqueles dos animais do grupo controle nas doses de 5 e 50 mg de proteína/kg de peso corpóreo, sendo restabelecidos nas maiores doses (300 e 2000 mg proteína/kg de peso corpóreo). Já para os níveis de LDL, valores aumentados e significativamente diferentes do grupo controle foram observados para todas as doses, com exceção da maior dose testada (2000 mg de proteína/kg de peso corpóreo). A dosagem de triglicerídeos foi significativamente ( $p < 0,05$ ) mais baixa para os animais que receberam *Mo*-CBP<sub>3</sub> em todas as doses testadas em relação ao grupo controle.

Tabela 8 - Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e com água destilada como veículo (controle)

| Parâmetros analisados  | Grupos       |                                      |                                       |  |   |
|--|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
|  | Controle     | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>5 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>50 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>300 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>2000 mg/kg |
| Leucócitos<br>(10 <sup>3</sup> /μL)                                  | 3,30 ± 0,44  | 4,80 ± 0,39 <sup>a</sup>             | 4,32 ± 0,59                           | 3,72 ± 0,52 <sup>b</sup>               | 3,42, ± 0,62 <sup>b</sup>               |
| Hemácias<br>(10 <sup>12</sup> /μL)                                   | 8,87 ± 0,54  | 8,49 ± 0,43                          | 8,42 ± 0,40                           | 8,46 ± 0,52                            | 8,82 ± 0,23                             |
| Hemoglobina<br>(g/dL)  | 14,26 ± 0,88 | 13,11 ± 0,77                         | 13,51 ± 0,84                          | 13,11 ± 0,42                           | 13,55 ± 0,58                            |
| Hematócrito<br>(%)   | 38,68 ± 2,33 | 37,16 ± 1,69                         | 36,98 ± 1,89                          | 36,46 ± 1,62                           | 38,01 ± 1,70                            |
| Volume corpuscular<br>médio - VCM (fL)                               | 43,98 ± 0,30 | 42,83 ± 1,49                         | 43,90 ± 1,08                          | 43,11 ± 1,10                           | 43,10 ± 1,58                            |
| Hemoglobina<br>corpuscular média –<br>HCM (pg)                       | 16,08 ± 0,49 | 15,45 ± 0,39                         | 16,03 ± 0,49                          | 15,53 ± 0,60                           | 15,36 ± 0,50                            |
| Concentração de<br>hemoglobina corpuscular<br>média – CHCM<br>(g/dL) | 36,03 ± 0,92 | 36,08 ± 0,49                         | 36,55 ± 0,50                          | 35,98 ± 0,57                           | 35,63 ± 0,37                            |

Tabela 8 (CONCLUSÃO) - Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e com água destilada como veículo (controle)

| Parâmetros analisados  | Grupos         |                                      |                                       |  |   |
|--|----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
|  | Controle       | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>5 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>50 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>300 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>2000 mg/kg |
| Plaquetas<br>(10 <sup>3</sup> /μL)                             | 862,00 ± 66,42 | 933,50 ± 78,19                       | 1008,5 ± 60,65 <sup>a</sup>           | 684,20 ± 58,75 <sup>a,b,c</sup>        | 913,80 ± 52,33 <sup>d</sup>             |
| Linfócitos<br>(10 <sup>3</sup> /μL)                            | 2,65 ± 0,37    | 3,80 ± 0,14                          | 3,82 ± 1,31                           | 2,82 ± 0,34                            | 2,97 ± 0,46                             |
| Neutrófilos, basófilos e<br>monócitos<br>(10 <sup>3</sup> /μL) | 0,97 ± 0,15    | 1,00 ± 0,16                          | 1,00 ± 0,14                           | 0,82 ± 0,10                            | 0,57 ± 0,05 <sup>a,b,c</sup>            |
| RDW-SD<br>(fL)   | 27,32 ± 1,23   | 26,75 ± 1,39                         | 27,03 ± 1,49                          | 25,76 ± 0,69                           | 26,46 ± 1,63                            |
| RDW-CV<br>(%)  | 14,38 ± 0,91   | 15,03 ± 0,49                         | 14,46 ± 0,69                          | 13,90 ± 0,90                           | 14,70 ± 0,85                            |

Os valores são média ± desvio-padrão (n = 6/grupo).

<sup>a</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo controle comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 5 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg separadamente.

<sup>b</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 5 mg/kg comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg separadamente.

<sup>c</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg.

<sup>d</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg comparado com o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg.

Tabela 9 - Parâmetros séricos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e com água destilada como veículo (controle)

| Parâmetros analisados       | Grupos         |                                      |                                       |  |   |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
|                             | Controle       | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>5 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>50 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>300 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>2000 mg/kg |
| Fosfatase alcalina<br>(U/L) | 134,80 ± 23,94 | 121,00 ± 15,53                       | 120,70 ± 20,79                        | 161,40 ± 33,31                         | 173,90 ± 21,95 <sup>b,c</sup>           |
| AST<br>(U/mL)               | 85,00 ± 12,34  | 108,6 ± 8,92                         | 108,7 ± 21,72                         | 89,64 ± 3,83                           | 94,40 ± 3,99                            |
| ALT<br>(U/mL)               | 99,75 ± 16,71  | 104,10 ± 10,87                       | 96,00 ± 10,31                         | 111,00 ± 11,64                         | 86,63 ± 8,75                            |
| Proteínas totais<br>(g/dL)  | 5,11 ± 0,41    | 4,28 ± 0,53 <sup>a</sup>             | 5,08 ± 0,27 <sup>b</sup>              | 5,03 ± 0,20 <sup>b</sup>               | 4,97 ± 0,45 <sup>b</sup>                |
| Albumina<br>(g/dL)          | 3,21 ± 0,18    | 2,90 ± 0,13 <sup>a</sup>             | 3,19 ± 0,16                           | 3,30 ± 0,15 <sup>b</sup>               | 3,09 ± 0,09                             |
| Ureia<br>(mg/dL)            | 63,03 ± 4,11   | 50,28 ± 1,08 <sup>a</sup>            | 55,44 ± 2,84 <sup>b</sup>             | 60,83 ± 3,52                           | 49,92 ± 5,07 <sup>a,d</sup>             |
| Creatinina<br>(mg/dL)       | 0,33 ± 0,02    | 0,28 ± 0,03                          | 0,35 ± 0,03                           | 0,37 ± 0,03 <sup>b</sup>               | 0,37 ± 0,04 <sup>b</sup>                |
| Colesterol<br>(mg/dL)       | 107,00 ± 10,98 | 109,30 ± 16,41                       | 124,60 ± 6,37                         | 122,00 ± 0,83                          | 103,30 ± 13,67                          |



Tabela 9 (CONCLUSÃO) - Parâmetros séricos de camundongos fêmeas administradas oralmente com dose única (5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corpóreo) da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* e com água destilada como veículo (controle)

| Parâmetros analisados    | Grupos        |                                      |                                       |  |   |
|--------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
|                          | Controle      | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>5 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>50 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>300 mg/kg | <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i><br>2000 mg/kg |
| HDL<br>(mg/dL)           | 40,31 ± 2,28  | 29,59 ± 2,70 <sup>a</sup>            | 34,98 ± 0,84 <sup>a,b</sup>           | 38,80 ± 3,81 <sup>b</sup>              | 38,65 ± 1,49 <sup>b</sup>               |
| LDL<br>(mg/dL)           | 36,08 ± 3,33  | 61,11 ± 9,26 <sup>a</sup>            | 60,77 ± 7,01 <sup>a</sup>             | 55,25 ± 2,50 <sup>a</sup>              | 38,50 ± 9,97 <sup>b,c</sup>             |
| VLDL<br>(mg/dL)          | 31,25 ± 2,80  | 24,11 ± 8,52                         | 24,37 ± 2,41                          | 27,81 ± 3,48                           | 25,89 ± 2,51                            |
| Triglicérides<br>(mg/dL) | 161,70 ± 7,86 | 100,00 ± 14,03 <sup>a</sup>          | 117,90 ± 11,11 <sup>a</sup>           | 120,00 ± 15,02 <sup>a</sup>            | 120,00 ± 13,61 <sup>a</sup>             |

Os valores são média ± desvio-padrão (n = 6/grupo).

<sup>a</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo controle comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 5 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg separadamente.

<sup>b</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 5 mg/kg comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg, *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg separadamente.

<sup>c</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 50 mg/kg comparado com os grupos *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg e *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg.

<sup>d</sup>p < 0,05 (ANOVA) para o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 300 mg/kg comparado com o grupo *Mo-CBP<sub>3</sub>* - 2000 mg/kg.

## 7. DISCUSSÃO

As técnicas de engenharia genética junto ao melhoramento convencional tornaram-se a principal abordagem para melhorar culturas agrônomicas importantes. Em muitos casos, a biotecnologia vegetal moderna envolve a introdução de um ou mais genes no genoma da planta. Quando expressos na planta, esses transgenes adicionam à cultura as características específicas desejadas. Se a expressão do transgene resulta na produção de uma proteína heteróloga, a avaliação da segurança deve focar nessa proteína. Pertencente à classe dos macronutrientes, as proteínas são um componente essencial da dieta humana. Embora a grande maioria das proteínas dietéticas não tenha sido testada em relação a sua segurança, usando o atual regime de testes que é aplicado a proteínas transgênicas, o consumo por um longo período de tempo pelo homem e animais sem quaisquer relatos de efeitos adversos associados nos dá a certeza de que elas são seguras. Com exceção de alguns casos bem descritos, o consumo de proteínas, em geral, não é associado com efeitos adversos (PARROTT *et al.*, 2010; GONG; WANG, 2013; HAMMOND *et al.*, 2013).

Para evitar que proteínas potencialmente perigosas sejam inseridas em cultivares transgênicos de importância agrícola e, conseqüentemente, tragam efeitos prejudiciais para o homem e/ou animais, essas proteínas candidatas à expressão em plantas transgênicas são avaliadas quanto a uma série de critérios que atestem sua inocuidade quanto à alergenicidade e toxicidade. O ideal é que esta avaliação seja realizada em um estágio inicial do desenvolvimento de plantas GM. Dessa forma, uma avaliação de segurança pré-transformação vegetal deve ser realizada, a fim de garantir previamente que o novo OGM não apresentará riscos à saúde (RICE *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a proteína antifúngica *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi analisada quanto a uma série de critérios capazes de atestar seu caráter inócuo, habilitando-a como uma ferramenta promissora para a transformação de culturas de interesse agrícola, de modo a conferir-lhes resistência a fungos fitopatogênicos. Para tanto, uma abordagem de duas etapas, baseada em pesos de evidência, foi adotada de acordo com o proposto pelo ILSI (DELANEY *et al.*, 2008). Esse estudo contempla diferentes análises, acrescentando maior confiança à avaliação no todo, ou seja, os resultados

obtidos são analisados de maneira holística. Além disso, nessas análises estão contempladas todas as recomendações do CODEX e da CTNBio, no que concerne à avaliação de segurança de proteínas recombinantes candidatas ao consumo pelo homem e/ou animais.

A avaliação da biossegurança alimentar da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> teve início com pesquisas na literatura científica que fundamentassem a determinação do histórico de uso seguro da fonte do gene da qual a proteína foi obtida, a espécie vegetal *M. oleifera*. A pesquisa de uso seguro considerando somente a proteína não foi possível, uma vez que esta foi descoberta por nosso grupo nos últimos anos e poucos estudos sobre a mesma são relatados. Por outro lado, um importante aspecto positivo é que a literatura especializada já acumula inúmeros relatos sobre a utilização segura da espécie *M. oleifera* (THURBER; FAHEY, 2009; KUMAR *et al.*, 2010). Todas as partes da planta são comestíveis e têm sido consumidas pelo homem em diversas partes do mundo há mais de 100 anos (FAHEY, 2005). Os frutos são geralmente consumidos de forma similar aos grãos verdes. As sementes são comidas como ervilhas ou assadas como nozes. As flores são comestíveis quando cozidas. As folhas são altamente nutritivas, sendo uma fonte significativa de betacaroteno, vitamina C, proteína, ferro e de potássio. Elas são cozidas e usadas como espinafre e, quando secas, trituradas em pó para uso em sopas e molhos (JOSHI; MEHTA, 2010; NAMBIAR *et al.*, 2010).

Não obstante, já é bastante relatada na literatura a presença de lectinas nas sementes de *M. oleifera*, a exemplos a cMOL, a WSMoL e uma outra proteína com afinidade à quitina (*Mo*-CBP<sub>4</sub>), esta última purificada por nosso grupo de pesquisa (SANTOS *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011). As lectinas são proteínas que, dentre outras funções, podem participar na defesa da planta contra patógenos. Muitas lectinas vegetais já foram relatadas por seus efeitos tóxicos e/ou antinutricionais para animais superiores (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Um estudo em que ratos foram alimentados com dieta contendo farinha de sementes de *M. oleifera* como fonte proteica, resultou em perda de apetite, problemas de crescimento, aumento do estômago, intestino delgado, fígado, pâncreas, rins, coração e pulmões e redução do timo e do baço. Os resultados observados podem estar relacionados à presença de compostos antinutricionais presentes na farinha de sementes de *M. oleifera*, a exemplo das lectinas e, também, à dose muito alta que

ela foi adicionada na dieta dos animais (100 g/kg da dieta) (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Apesar das observações mencionadas, não há nenhuma evidência quanto à toxicidade ou propriedades antinutricionais vinculadas às lectinas citadas. Ao contrário, os estudos relacionados às lectinas citadas mencionam aspectos positivos, como sua capacidade de aglutinar material em suspensão na água (SANTOS *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2009; PEREIRA, 2010). Devido a essa propriedade, as sementes de *M. oleifera* têm sido utilizadas em países em desenvolvimento como coagulante natural no tratamento de água para consumo humano (KATAYON *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2010; MANGALE; CHONDE; RAUT, 2012).

Além disso, outro fator que diminui o perigo associado à ingestão de qualquer parte da espécie vegetal *M. oleifera* é sua utilização milenar na medicina tradicional. Várias partes da planta, como as folhas, raízes, sementes, cascas, frutas, flores e vagens imaturas são utilizadas como estimulantes cardíacos e circulatórios, possuem atividades antitumoral, antipirética, antiepiléptica, anti-inflamatória, antiespasmódica, diurética, anti-hipertensiva, antidiabética, antibacteriana, antifúngica, dentre outras, sendo, então, utilizada para o tratamento de diferentes doenças na medicina popular. Em adição, diferentes partes da *M. oleifera* também são incorporadas em várias formulações fitoterápicas comercializadas, como Rumalaya e Septilin (Empresa Farmacêutica do Himalaia, Bangalore, Índia), Orthoherb (Walter Bushnell Ltd, Mumbai, Índia), Kupid Fort e Livospin (Herbals APS Unip. Ltd, Patna, Índia), utilizadas para vários problemas de saúde (MEHTA *et al.*, 2003). Além disso, sementes de *M. oleifera* possuem frações proteicas específicas para a pele e cabelo. Purisoft® consiste de peptídeos da semente de *M. oleifera* utilizado na proteção da pele humana no combate ao envelhecimento precoce. Dois novos componentes ativos para a indústria cosmética foram extraídos do óleo da *M. oleifera*. O extrato das sementes de *M. oleifera* ainda possui a capacidade de limpar, hidratar e fortalecer os cabelos sendo, dessa forma, uma solução inovadora para o cuidado com os cabelos (STUSSI *et al.*, 2002).

Apesar de terem sido suscitados aspectos negativos relacionados aos perigos potenciais associados ao uso da espécie *M. oleifera*, seu histórico de uso seguro é embasado por uma grande quantidade de dados científicos. Entretanto, esses resultados não são suficientes para assegurar o caráter inócuo dessa espécie, nem

de proteínas extraídas dela, para o homem e animais. Assim, prosseguiu-se para os testes posteriores que compõem a primeira etapa da avaliação da biossegurança alimentar da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, visando acumular mais evidências de peso para atestar a inocuidade dessa proteína.

Outro aspecto importante na avaliação da biossegurança alimentar de uma nova proteína consiste em comparar sua sequência primária de aminoácidos com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais, visando detectar o grau de identidade entre elas. Partindo do princípio de que não existe nenhum consenso sobre a sequência primária de uma proteína tóxica e/ou antinutricional, a comparação deve ser feita em bancos de dados gerais com todas as sequências de proteínas disponíveis, adotando, assim, uma abordagem conservadora. As proteínas identificadas com similaridade significativa usando um algoritmo de alinhamento local são então avaliadas quanto à sua relevância em causar efeitos adversos (CODEX ALIMENTARIUS, 2009; MADDURI *et al.*, 2012). Nesse contexto, a sequência da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi comparada à sequência dessas proteínas em sete bancos de dados de domínio público, como parte das recomendações do *Codex Alimentarius* (2009) e, ainda, em concordância com a avaliação de biossegurança alimentar em duas etapas, sugerida pelo ILSI. Nos sete grandes bancos de dados utilizados para tal propósito não foi observada qualquer identidade da referida proteína com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais, com base nos parâmetros utilizados. A proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> mostrou identidade, em sua maioria, apenas com proteínas flocculantes de *M. oleifera*. Resultados semelhantes foram obtidos quando um BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) foi realizado com a sequência determinada da região N-terminal da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> (GIFONI *et al.*, 2012). Dessa forma, *Mo*-CBP<sub>3</sub> não apresenta similaridade significativa com proteínas consideradas tóxicas e/ou antinutricionais para seres humanos ou animais.

A introdução de uma nova proteína em culturas transgênicas requer, além das análises já mencionadas, uma avaliação do seu potencial alergênico. Para predizer o risco alergênico de uma determinada proteína, vários fatores devem ser considerados. O potencial alergênico de uma proteína pode ser avaliado pela comparação de sua sequência primária de aminoácidos com aquelas de proteínas alergênicas depositadas em bancos de dados (FAO/WHO, 2001; LADICS, 2008; CODEX ALIMENTARIUS, 2009; LADICS *et al.*, 2011; CRESSMAN; LADICS 2009).

A comparação da sequência das quatro isoformas da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*, com e sem o peptídeo sinal, nos bancos de dados ADFS, Allermatch™, AllergenOnline e SDAP, não revelou qualquer identidade com proteínas potencialmente alergênicas. De acordo com Aalberse (2000), alinhamentos com alto potencial de identidade podem indicar alergenicidade (reação cruzada). Isso é provável quando a proteína compartilha identidade superior a 70% ao longo de sua sequência completa, podendo dessa forma apresentar os mesmos epítomos para IgE. Quando a identidade compartilhada é menor que 50%, é pouco provável que essa reatividade cruzada aconteça. Embora este alinhamento completo não seja exigido pelas diretrizes da FAO/WHO, ele ajuda no posicionamento das regiões potenciais de alergenicidade em toda a estrutura primária da proteína (FIERS *et al.*, 2004).

Outro critério utilizado para detectar identidade da sequência de aminoácidos da proteína em estudo com proteínas alergênicas é a comparação dessas sequências utilizando uma janela de 80 aminoácidos. Como recomendado pela FAO/WHO (2001), a possibilidade de reação cruzada entre uma nova proteína e uma proteína alergênica conhecida é considerada quando a identidade entre elas é > 35%. O tamanho de uma janela de 80 aminoácidos é baseado na presença de epítomos descontínuos, ditos também conformacionais, que mesmo a uma razoável distância uns dos outros, dentro da sequência primária e unidimensional da proteína, são capazes de se ligarem a IgE, quando a proteína se encontra em sua forma nativa, ou seja, tridimensional (KLETER; PEIJNENBURG, 2002). A utilização desse critério resultou em identidade das isoformas da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*, com ou sem peptídeo sinal, com pelo menos um alérgeno conhecido. Proteínas que compartilham alta porcentagem de identidade pelos programas de alinhamento local, tais como FASTA ou BLASTP, são altamente susceptíveis a causar reações cruzadas (GOODMAN *et al.*, 2005, 2008). Dessa forma, a proteína deve ser submetida a experimentos *in vitro* com soro de pacientes atópicos (alérgicos) para avaliar seu potencial em desencadear reação alérgica (GOODMAN, 2008; THOMAS *et al.*, 2009; RANDHAWA; SINGH; GROVER, 2011; CAO *et al.*, 2012).

Ainda em relação ao critério de utilização de uma janela de 80 aminoácidos para predição de alergenicidade, a FAO/WHO (2001) recomenda que o peptídeo sinal seja removido da sequência para que a previsão seja realizada. A razão para esta simplificação é que apenas uma minoria das proteínas analisadas que possuem

evidências experimentais contendo o peptídeo sinal está disponível nas bases de dados de anotação (FAO/WHO, 2001; STADLER; STADLER, 2003). Em nossa pesquisa, utilizando a sequência da proteína sem o peptídeo sinal, uma pequena diminuição do número de sequências com identidade > 35% foi observada. Stadler e Stadler (2003) também observaram uma ligeira diminuição no número de alérgenos quando o peptídeo sinal foi removido, analisando, por exemplo, sequências de alérgenos do banco de dados Swiss-prot. A princípio, este resultado pode nos induzir a pensar que *Mo*-CBP<sub>3</sub> é um alérgeno potencial. No entanto, outras análises para avaliar o potencial alergênico desta nova proteína pode fornecer maior peso de evidência a esta conclusão ou mesmo minimizar ou ignorar tais informações. Este é o princípio da abordagem de duas etapas proposta pelo ILSI. Assim, este provável potencial alergênico de *Mo*-CBP<sub>3</sub> não foi confirmado por subseqüentes ensaios *in silico* e digestibilidade *in vitro*, como discutido abaixo.

O potencial alergênico de proteínas também é avaliado através da pesquisa de pequenos segmentos de aminoácidos contíguos idênticos em banco de dados de alérgenos. A FAO/WHO (2001) recomenda pesquisas de 6 a 8 aminoácidos contíguos. A pesquisa utilizando como critério 6 aminoácidos contíguos revelou um número razoável de alérgenos que apresentaram identidade com as isoformas da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>. Um número menor desses alérgenos foi encontrado quando as sequências da proteína foram analisadas na ausência do peptídeo sinal. Em alguns casos (Banco de dados SDAP - isoformas Q3GS e Q3S2), identidade utilizando esse critério não foi observada. Dessa forma, a abordagem utilizando 6 aminoácidos contíguos é bastante criticada por gerar uma alta taxa de falsos positivos (KONIG *et al.*, 2004; LADICS, 2008). Em adição, alérgenos também foram encontrados quando o critério de 7 aminoácidos foi utilizado. No entanto, esse número foi bem menor quando comparado ao critério anterior, sendo essa identidade não observada para as sequências das isoformas Q3GS e Q3S2 sem o peptídeo sinal, em todas as bases de dados utilizadas. Muitos resultados aleatórios, que não apresentam qualquer risco de uma reação cruzada, são observados quando uma sequência curta de aminoácidos é utilizada. Por exemplo, Hileman *et al.* (2002), estudando proteínas do milho, relataram que, utilizando como critério a identidade com sete ou menos aminoácidos contíguos, uma alta taxa de falsos positivos foi observada (84% quando se utiliza seis aminoácidos contíguos, uma superestimativa clara para o

milho, que é considerado uma das menores fontes de alérgenos alimentares (HILEMAN *et al.*, 2002; LADICS, 2008). Adicionalmente, uma pesquisa com 8 aminoácidos contíguos também foi realizada utilizando a sequência da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*, com e sem o peptídeo sinal. Utilizando esse critério, não foi encontrada nenhuma sequência idêntica do banco de dados de alérgenos às sequências da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*. Uma pesquisa com 8 aminoácidos contíguos é provavelmente mais eficaz na detecção de epítomos imunogênicos (ILSI HESI, 2001; HILEMAN *et al.*, 2002; HERMAN; SONG; SEKHAR, 2009).

A relevância imunológica, ou seja, o potencial dos peptídeos encontrados (6 e 7 aminoácidos contíguos) em desencadear reação cruzada, foi analisada submetendo esses mesmos peptídeos ao banco de dados de epítomos do ADFS. De todos os peptídeos encontrados, apenas o peptídeo “<sup>35</sup>DNQQGQ<sup>40</sup>”, da isoforma Q2 (sequência contendo o peptídeo sinal), apresentou identidade de 100% com um dos oito epítomos (“<sup>2</sup>AEDEDNQQGQ<sup>11</sup>”) do alérgeno “Hev b 1” de *H. brasiliensis* (seringueira) (BANERJEE *et al.*, 2000). Contudo, para que a resposta alérgica seja desencadeada, ou seja, o reconhecimento por receptores celulares de IgE, reticulação de mastócitos, indução de um sinal intracelular e, subsequente, liberação de vários mediadores (por exemplo, histamina), dois epítomos de ligação a IgE na mesma proteína são necessários (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000; LADICS, 2008).

Muitos alérgenos proteicos são glicosilados, levantando a possibilidade de que os grupos glicosil podem contribuir para a sua alergenicidade (JENKINS; PAREKH; JAMES, 1996). Dessa forma, a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi também avaliada quanto à presença de qualquer sítio potencial de *N*-glicosilação, baseando-se na presença de determinadas sequências consenso. As sequências pesquisadas foram Asparagina-Xaa-Serina/Treonina e Asparagina-Xaa-Cisteína (onde Xaa representa qualquer aminoácido exceto Prolina), através do programa *on line* NetNGlyc 1.0 Server, desenvolvido para predição de sítios de *N*-glicosilação em proteínas humanas, mas que tem sido bastante utilizado para pesquisa desses sítios em proteínas de outras origens (HÉROUET *et al.*, 2005; HÉROUET-GUICHENEY *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009). Sítios de *N*-glicosilação foram encontrados na posição 19 apenas para as sequências nas quais o peptídeo sinal estava presente. Logo, o sítio de *N*-glicosilação foi detectado no peptídeo sinal e as sequências correspondentes à



proteína madura não o apresenta. Por outro lado, sítios de O-glicosilação na sequência da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> foram detectados por Freire (2013), corroborando os achados experimentais de que *Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma glicoproteína com 2,5% de carboidratos em sua estrutura (GIFONI *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que O-glicanos também estão envolvidos nas estruturas de epítomos importantes de ligação à IgE. Este é o caso de Art v 1, o principal alérgeno de *Artemisia vulgaris* (LEONARD *et al.*, 2005). Entretanto, o conhecimento atual sobre as estruturas e os possíveis epítomos de oligossacarídeos ligados a glicoproteínas alergênicas mostra que os N-glicanos estão mais frequentemente envolvidos nas estruturas de epítomos de IgE (FÖTISCH; VIETHS, 2001; ALTMANN, 2007).

Para a realização dos ensaios *in vitro* e do teste de toxicidade aguda, foi realizada a purificação da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, utilizando a metodologia descrita por Gifoni *et al.* (2012), com modificações. As alterações realizadas visaram diminuir os custos, tornar a purificação mais rápida e prover um maior rendimento da proteína. As mudanças no protocolo (retirada da etapa de concentração de proteínas por adição de sulfato de amônio, não realização da eluição de proteínas ligantes à quitina por inclusão de N-acetil-D-glucosamina no tampão de equilíbrio e substituição da matriz iônica de Resource S para CM-Sepharose), resultaram em um rendimento cerca de dez vezes maior que o da metodologia proposta por Gifoni *et al.* (2012).

A purificação da proteína foi acompanhada por eletroforese em gel de poli(acrilamida em condição desnaturante (PAGE-SDS), que foi utilizada também para determinação da massa molecular aparente de *Mo*-CBP<sub>3</sub>. Por essa técnica, a proteína em condição não redutora se apresentou como uma banda proteica de 18,0 kDa. Quando a proteína foi tratada com β-mercaptoetanol 1%, duas bandas proteicas de baixa massa molecular foram visualizadas, em torno de 4,0 e 8,0 kDa. Tais dados foram confirmados na eletroforese em gel de tricina-poli(acrilamida-SDS, com a amostra contendo β-mercaptoetanol 6%. Os dados apresentados para condições redutoras corroboram com os resultados encontrados por Batista (2013) e Freire (2013). Proteínas coagulantes de *M. oleifera* geralmente apresentam perfis similares ao mostrado por *Mo*-CBP<sub>3</sub>.

Estudos de digestibilidade *in vitro* são comumente utilizados como parte da avaliação do potencial alergênico de proteínas com potencial biotecnológico de

aplicação na agricultura, visando adicionar mais evidências de peso à pesquisa (THOMAS *et al.*, 2004; DELENEY *et al.*, 2008; CODEX ALIMENTARIUS, 2009; RANDHAWA; SINGH; GROVER, 2011). Com exceção das proteínas do pólen, todas as proteínas alergênicas conhecidas demonstram alta resistência à degradação enzimática. A proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> mostrou ser altamente resistente à degradação por pepsina (FGS), mesmo depois de 2 h de incubação. Tal fato poderia evidenciar um possível potencial alergênico. No entanto, algumas proteínas que são conhecidas por não causar alergias alimentares também são estáveis à degradação enzimática (FU; ABBOTT; HATZOS, 2002). A digestibilidade da proteína também foi analisada utilizando pancreatina (FIS). Nessas condições, a proteína se mostrou mais susceptível à degradação, sendo totalmente degradada após 2 h de incubação. Tem sido relatado que proteínas rapidamente hidrolisadas em peptídeos < 3,5 kDa e aminoácidos são menos prováveis de serem alergênicas (FU; ABBOTT; HATZOS, 2002).

Outro aspecto que compõe a bateria de experimentos a serem realizados na primeira etapa de avaliação da segurança alimentar de uma proteína, segundo Delaney *et al.* (2008), é sua resistência a elevadas temperaturas. Isso se justifica pelo fato de que proteínas expressas em culturas agrícolas irão sofrer, em alguns casos, processamento térmico antes de seu consumo, o que poderia afetar sua atividade biológica, bem como diminuir o nível de exposição (CAO *et al.*, 2010). Após tratamento a 100 °C por 10, 30 e 60 min, a proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> permaneceu detectável na mesma altura (4,0 e 8,0 kDa) da proteína sem tratamento térmico no gel de eletroforese. Isso sugere que a proteína parece não ter sido afetada ou degradada pelo tratamento térmico, a ponto de interferir na sua migração em PAGE-SDS. Em adição, sua imunoreatividade parece não ter sido afetada. O reconhecimento de *Mo*-CBP<sub>3</sub> tratada termicamente pelo anticorpo anti-*Mo*-CBP<sub>3</sub> sugere a preservação de epítomos antigênicos quando a proteína foi submetida a esse tipo de processamento, nas condições empregadas. Apesar do teste de estabilidade à temperatura ser requerido por agência regulatórias na avaliação de potencial alergênico de proteínas, esse, associado a mensurações funcionais e/ou métodos de detecção imunológica, tem sido severamente criticado e desencorajado no contexto de um estudo de biossegurança alimentar (PRIVALLE *et al.*, 2011). A resistência de *Mo*-CBP<sub>3</sub> a temperatura já foi relatada por Gifoni *et al.* (2012) e Batista

(2013). *Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 0,1 mgP/mL manteve sua atividade antifúngica mesmo quando aquecida a 100 °C, por 1 h.

O conjunto de dados acumulados na primeira etapa de avaliação da biossegurança alimentar da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> nos permite sugerir que a mesma não apresenta qualquer perigo em potencial. A proteína mostrou identidade > 35% com proteínas alergênicas utilizando uma janela de 80 aminoácidos. Entretanto, analisando a sequência completa de aminoácidos, assim como conjunto de 8 aminoácidos contíguos, essa identidade não foi observada. Em adição, os peptídeos encontrados nas análises de 6 e 7 aminoácidos contíguos não mostraram identidade relevante com epítomos de alérgenos potenciais. Dessa forma, prosseguindo para a segunda etapa da avaliação de biossegurança alimentar, visando acumular mais evidência aos resultados obtidos e partindo do pressuposto de que testes toxicológicos são exigidos na avaliação de risco de novas proteínas, o teste de toxicidade aguda via oral foi realizado.

Após acúmulo da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, teste de toxicidade aguda, dose única, utilizando camundongos fêmeas, foi realizado seguindo o protocolo N° 423 da OECD (2001). O princípio do teste de toxicidade aguda consiste em administrar uma única dose da amostra em grupo de 3 animais (de preferência fêmeas) iniciando com uma dose de 5 mg/kg e, à medida em que seja mantida 100% de sobrevivência, aumenta-se a dose (50 mg/kg, 300 mg/kg), chegando a um máximo de 2000 mg/kg.

A administração da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub>, por gavagem, em doses únicas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, não resultou em mortalidade ou quaisquer sintomas aparentes de intoxicação e alteração do comportamento normal dos animais, categorizando-a no grupo 5 do guia da OECD, ou seja, nenhuma toxicidade. Além disso, os camundongos dos grupos experimentais não apresentaram alterações no ganho de peso corpóreo quando comparados aos do grupo controle, ao longo dos 14 dias de experimento. Estudos demonstraram que o extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* (700 mg/kg) causou baixa ou mesmo nenhuma toxicidade quando administrado via oral em camundongos e ratos, respectivamente (FERREIRA *et al.*, 2009). Em adição, a proteína ligante à quitina *Mo*-CBP<sub>4</sub>, purificada no passo posterior à obtenção de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, também não revelou quaisquer efeitos tóxicos, mudanças de comportamento ou alteração no peso corpóreo de camundongos fêmeas, quando administrada na dose de 2000 mg/kg, dose única por gavagem

(PEREIRA, 2013). Algumas proteínas vegetais, a exemplo as lectinas, são tóxicas/antinutricionais para animais superiores, interferindo na digestão e absorção das proteínas da dieta (CARVALHO *et al.*, 2011). Animais experimentais alimentados com dietas contendo lectinas vegetais apresentaram sinais típicos de toxicidade aguda, como náusea, inchaço, vômito e diarreia, além de diminuição de massa corpórea e perda de apetite (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

Ao final dos 14 dias de experimento, os animais foram sacrificados e seus órgãos internos dissecados, para obtenção do peso úmido relativo, observações macroscópicas e análises histopatológicas. Essa análise foi realizada, tendo em vista que muitos órgãos são alvos da toxicidade de proteínas vegetais, a exemplo das lectinas. Algumas lectinas (WGA, ConA, ConBr SBA e PNA de *Triticum vulgare*, *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Glycine max* e *Arachis hypogaea*, respectivamente) foram responsáveis pelo aumento do intestino delgado de ratos (PUSZTAI, 1991; GRANT, 1991, 1999). As lectinas também são responsáveis por afetar órgãos como pâncreas, timo, fígado e pulmão (OLIVEIRA *et al.*, 1994; GRANT *et al.*, 1995; PUSZTAI *et al.*, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 2001; KELSALL *et al.*, 2002; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Ao contrário dessas lectinas, Mo-CBP<sub>3</sub> não afetou o peso dos órgãos dos animais, com exceção dos órgãos do sistema reprodutor das fêmeas (ovários, útero e tuba uterina). A proteína, nas doses testadas (5, 50, 300 e 2000 mg/kg), impediu o desenvolvimento desses órgãos. Entretanto, a análise histopatológica não revelou qualquer alteração em todos os órgãos examinados, inclusive nos órgãos do sistema reprodutor. Alterações patológicas (degenerativas, inflamatórias ou neoplásicas) também não foram encontradas nos órgãos examinados, com base na análise histopatológica.

A análise dos parâmetros hematológicos mostrou que houve um pequeno aumento no número de leucócitos no grupo administrado com a dose 5 mg/kg. O número de plaquetas também variou nos grupos submetidos às doses de 50 e 300 mg/kg, aumentando e diminuindo, respectivamente. Baixo número de plaquetas está relacionado à diminuição da produção ou aumento da destruição dessas células. Uma redução da produção estaria relacionada a injúrias ou alterações nos megacariócitos que produzem as plaquetas, enquanto o aumento da destruição dá-se a partir de uma ativação acelerada ou reconhecimento imune das plaquetas (HEDRICH, 2012). Dessa forma, fica difícil suscitar qualquer efeito tóxico da

proteína, uma vez que na maior dose testada (2000 mg/kg), efeito semelhante não foi observado. Em contrapartida, o número de neutrófilos, basófilos e monócitos diminuiu de forma significativa apenas na maior dose (2000 mg/kg). Outro ponto importante a ser considerado é a grande variação de valores relatados para os parâmetros hematológicos de camundongos da linhagem Swiss. Com base nesses estudos, os valores encontrados para todos os parâmetros estão dentro das variações, portanto seriam considerados normais (DINIZ *et al.*, 2006; BRANCO *et al.*, 2011; HEDRICH, 2012).

A medição dos parâmetros bioquímicos séricos pode ser útil para ajudar a identificar os órgãos-alvo de efeitos tóxicos, bem como o estado geral de saúde dos animais, além de fornecer alerta precoce de alterações potencialmente nocivas em organismos estressados (SACHER; McPHERSON, 2000). No que diz respeito à dosagem dos parâmetros bioquímicos do soro, foram detectadas diferenças entre os grupos de camundongos para os valores de proteínas totais, albumina, ureia, HDL e LDL e triglicerídeos. As dosagens de proteínas totais e de albumina diminuíram no grupo que recebeu a dose de 5 mg/kg, quando comparado ao valor médio do grupo controle. O mesmo não foi observado para as doses mais elevadas. Quanto à dosagem de ureia sérica, uma diminuição foi observada na maior dose (2000 mg/kg). Porém, os valores encontrados estão dentro dos valores padrões encontrados para camundongos Swiss (DINIZ *et al.*, 2006; BRANCO *et al.*, 2011).

Colesterol e triglicerídeos no sangue podem ser utilizados como indicadores do estado nutricional, podendo seus aumentos estar relacionados a danos no fígado (SEYIT *et al.*, 2000). Os valores de HDL dos animais do grupo teste foram diminuídos e diferentes ( $p < 0,05$ ) daqueles dos animais do grupo controle nas doses de 5 e 50 mg/kg de peso corpóreo, sendo restabelecidos nas maiores doses (300 e 2000 mg/kg). Em relação às LDL, valores aumentados em relação ao grupo controle foram observados para todas as doses, com exceção da maior dose testada (2000 mg/kg). Valores diminuídos para a dosagem de triglicerídeos foram observados para todas as doses de *Mo*-CBP<sub>3</sub> administradas. Vários estudos reportam a atividade hipolipidêmica de *M. oleifera*. Extrato das folhas foi capaz de diminuir os níveis de triglicerídeos e colesterol do soro de animais experimentais (ARA; RASHID; AMRAN, 2008). Coelhos alimentados com dieta padrão e hipercolesterolêmica, após ingerirem sementes cozidas de *M. oleifera* (200 mg/kg/dia, via oral), apresentaram níveis de triglicerídeos reduzidos no soro.

Com base nos resultados do teste de toxicidade aguda, dose única, é possível afirmar que a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* pouco afetou a homeostase funcional de camundongos. Isso evidencia que não há indícios relevantes de toxicidade associados à ingestão da proteína de interesse. Entretanto, experimentos adicionais de toxicidade, como dose repetida e, também, a utilização de outras vias de administração, podem ser conduzidos, a fim de aumentar o grau de certeza sobre a inocuidade da proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* para o homem e animais.

## 8. CONCLUSÃO

O conjunto de dados acumulados no estudo de avaliação da biossegurança alimentar da proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> permite considerar o uso seguro dessa proteína no contexto da biotecnologia agrícola, tendo em vista seu grande potencial para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de fungos e caráter inócuo para o homem e demais animais monogástricos.

## REFERÊNCIAS

- ABDULKARIM, S. M.; LONG, K.; LAI, O. M.; MUHAMMAD, S. K. S.; GHAZALI, H. M. Some physio-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. **Food Chemistry**, v. 93, p. 253-263, 2005.
- AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 228-38, 2000.
- ADEDAPO, A. A.; MOGBOJURI, M. O.; EMIKPE, B. O. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, p. 586-591, 2009.
- AGRAWAL, B.; METHA, A. Antiasthmatic activity of *Moringa oleifera* Lam: a clinical study. **Indian Journal Pharmacology**, v. 40, p. 28-31, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Elsevier-Academic Press, 5th ed, London, 2005.
- ALTMANN, F. The role of protein glycosylation in allergy. **International Archives Allergy and Immunology**, v. 142, p. 99-115, 2007.
- AMAGLO, N. K.; BENNETT, R. N.; LO CURTO, R. B.; ROSA, E. A. S.; LO TURCO, V.; GIUFFRIDA, A.; LO CURTO, A.; CREA, F.; TIMPO, G. M. Profiling selected phytochemical and nutrients in different tissues of the multi-purpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1047-1054, 2010.
- AMIAN, A. A.; PAPPENBROCK, J.; JACOBSEN, H. J.; HASSAN, F. Enhancing transgenic pea (*Pisum sativum* L.) resistance against fungal diseases through stacking of two antifungal genes (chitinase and glucanase). **Genetically Modified Crops**, v. 2, p. 104-109, 2011.
- AMMAR, M. I.; NENAAH, G. E.; MOHAMED, A. H. H. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 49, p. 21-25, 2013.
- ANWAR, F.; ASHRAF, M.; BHANGER, M. I. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oil seeds from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 82, p. 45-51, 2005.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperature regions of Pakistan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558-6563, 2003.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.
- ARA, N.; RASHID, M.; AMRAN, S. Comparison of *Moringa oleifera* leaves extract with atenolol on serum triglyceride, serum cholesterol, blood glucose, heart weight,



body weight in adrenaline induced rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 253-258, 2008.

ASARE, G. A.; GYAN, B.; BUGYEI, K.; ADJEI, S.; MAHAMA, R.; ADDO, P.; OTU-NYARKO, L.; WIREDU, E. K.; NYARKO, A. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 265-272, 2012.

ASLAM, M.; ANWAR, F.; NADEEM, R.; RASHID, U.; KAZI, T. G.; NADEEM, M. Mineral composition of *Moringa oleifera* leaves and pods from different regions of Punjab, Pakistan. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 417-421, 2005.

AWODELE, O.; OREAGBA, I. A.; ODOMA, S.; DA SILVA, J. A.; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139 p. 330-336, 2012.

BANERJEE, B.; KANITPONG, K.; FINK, J. N.; ZUSSMAN, M.; SUSSMAN, G. L.; KELLY, K. J.; KURUPA, V. P. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 789-798, 2000.

BAKRE, A. G.; ADERIBIGBE, A. O.; ADEMOWOA, O. G. Studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 783-789, 2013.

BATISTA, A. B. **Caracterização estrutural da Mo-CBP<sub>3</sub>, uma albumina 2S de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu modo de ação contra fungos fitopatogênicos**. 2013. 154 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; MUÑOZ-SERRANO, A.; PERES, J. A. Towards overcoming TOC increase in wastewater treated with *Moringa oleifera* seed extract. **Chemical Engineering Journal**, v. 188, p. 40-46, 2012.

BEN SALEM, H.; MAKAR H. P. S. Defatted *Moringa oleifera* seed meal as a feed additive for sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, p. 27-33, 2009.

BENNETT, R. N.; MELLON, F. A.; FOIDL, N.; PRATT, J. H.; DUPONT, M. S., PERKINS, L., KROON, P. A. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. and *Moringa stenopetala* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3546-3553, 2003.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. 1995.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G. K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 477-482, 2007.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-438, 2011.

BORAD, V.; SRIRAM, S. Pathogenesis-related proteins for the plant protection. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 22, p. 189-196, 2008.

BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Cell Press /Trends in Genetics**, v. 29, p. 233-240, 2013.

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. 722, p. 248-254, 1976.

BRANCO, A. C. S. C.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 209-214, 2011.

CÁCERES, A.; CABRERA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 213-216, 1991.

CÁCERES, A.; SARAVIA, A.; RIZZO, S.; ZABALA, L.; DE LEON, E.; NAVE, F. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 2: screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 233-237, 1992.

CAO, B.; HE, X.; LUO, Y.; MA, L.; LIU, P.; CAO, S.; LIU, Y.; ZOU, S.; XU, W.; HUANG, K. Safety assessment of dehydration-responsive element-binding (DREB) 4 protein expressed in *E. coli*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 11, p. 4077-4084, 2012.

CAO, S.; HE, X.; XU, W.; RAN, W.; LIANG, L.; LUO, Y.; YUAN, Y.; ZHANG, N.; ZHOU, X.; HUANG, K. Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food resource. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 474-481, 2010.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Plant defensins - Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, v. 30, p. 1007-1020, 2009.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 4270-4293, 2011.

CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SOUSA, N. M.; CAVALHEIRO, M. G.; FERNANDES, G. S.; BRASIL, I. C. F.; MAIA, A. A. B.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M.; GOUVEIA, S. T.; MACHADO, O. L. T. Preliminary assessment of the nutritional composition of underexploited wild legumes from semi-arid Caatinga and moist forest environments of northeastern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 487-493, 2011.

CHUANG, P.-H.; LEE, C.-W.; CHOU, J.-Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.-J.; CHEN, H.-M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

CONSTABLE, A.; JONAS, D.; COCKBURN, A.; DAVI, A.; EDWARDS, G.; HEPBURN, P.; HEROUET-GUICHENEY, C.; KNOWLES, M.; MOSELEY, B.; OBERDÖRFER, R.; SAMUELS, F. 'History of safe use' as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2513-2525, 2007.

CHEN, M. Elucidation of bactericidal effects incurred by *Moringa oleifera* and chitosan. **Journal of the U.S. SJWP**, v. 4, p. 65-79, 2009.

CHEN, H.; LIN, Y. Promise and issues of genetically modified crops. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 255-260, 2013.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWAT, S.; PONGRAPEEPORN, K. U. 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, p. 439-446, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. Foods derived from modern biotechnology. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Second Edition. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm>. Acesso em: 10.10.2013.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M.; PAIVA, P. M. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COLLINGE, D. B.; JORGENSEN, H. J.; LUND, O. S.; LYNGKJAER, M. F. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 269-291, 2010.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL E BIOSSEGURANÇA (CTNBio). Aprovações comerciais. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12786.html>>. Acesso em: 25.06.14 2012.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. **Entendendo a Biossegurança**. Epistemologia e Competências para a Área de Saúde. 3ª ed. Rio de Janeiro: Publit, 2012. 208p.

CRESSMAN, R. F.; LADICS, G. Further evaluation of the utility of “Sliding Window” FASTA in predicting cross-reactivity with allergenic proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. S20-S25, 2009.

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DAOUBI, M.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; BENHARREF, A.; COLLADO, I. G. Screening study of lead compounds for natural product-based fungicides: antifungal activity and biotransformation of 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy- $\beta$ -himachalene by *Botrytis cinerea*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 6673-6677, 2005.

DE PAULA, P. C. **Propriedade hipoglicemiante, hipocolesterolêmica e antioxidante de proteínas de folhas de *Moringa oleifera* Lam.** 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, p. 1-17, 2012.

DELANEY, B.; ASTWOOD, J. D.; CUNNY, H.; CONN, R. E.; HEROUET-GUICHENEY, C.; MACINTOSH, S.; MEYER, L. S.; PRIVALLE, L.; GAO, Y.; MATTSSON, J.; LEVINE, M. Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. S71-S97. 2008.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. **Crop Protection**, v. 29, p. 1059-1075, 2010.

DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; AGUIAR, F. B.; TOSCANO, M. G.; RIBEIRO, E. A. N. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, p.171-176, 2006.

DIOUF, D. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] “omics” research for genetic improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2803-2810, 2011.

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, 2005.

FAO. FAO Statistical Yearbook 2013. World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Glossary. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 27.11.2013.

FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2001.

FARIAS, D. F. **Biossegurança alimentar de proteínas Cry: dos métodos clássicos e oficiais à era ômica**. 2013. 242 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. F. U.; SOUSA, D. F.; FERREIRA, J. M.; MARTINS, A. R.; MARTINS, A. M. C.; QUEIROZ, M. G. R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**. v. 1, p. 45-53, 2007.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G.; Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 207-216, 2009.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F.; SÁ, R. A.; CARNEIRO-DACUNHA, M. G.; MORAIS, M. M.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 186-192, 2011.

FIERS, M. W.; KLETER, G. A.; NIJLAND, H.; PEIJNENBURG, A. A.; NAP, J. P.; VAN HAM, R. C. Allermatch™, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. **BMC Bioinformatics (Open Access)**, v. 5:133, 2004.

FOIDL, N.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: **The Miracle Tree/The Multiple Attributes of Moringa**, Ed. Lowell J Fuglie, CTA. USA, 2001.

FÖTISCH, K.; VIETHS, S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 373-390, 2001.

FREIRE, J. E. C. **Análise in silico da sequência deduzida de Mo-CBP<sub>3</sub>, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* LAM**. 2013. 116 f. Dissertação

(Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499-502, 1972.

FU, T. J.; ABBOTT, U. R.; HATZOS, C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 7154-7160, 2002.

GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p.106-109, 2006.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Role and importance of chitinase gene expression in plants for fungal disease tolerance. In: JAYABALAN, N. (Org.). **Plant Biotechnology**, New Delhi: APH Publishing Corporation, p. 1-28, 2006.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GAO, A. G.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J.; ROMMENS, C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1307-1310, 2000.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Petunia floral defensinas with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. **PLoS ONE**, v. 7, e39557, 2012.

GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam. in high fat diet fed Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 21-25, 2000.

GIFONI, J. M. **Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta**. 2005. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

GIFONI, J. M. **Propriedades bioquímicas e funcionais de uma proteína ligante à quitina purificada das sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. 2009. 122 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, p. 812-818, 2010.

GOODMAN, R. E. Performing IgE serum testing due to bioinformatics matches in the allergenicity assessment of GM crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. S24-S34, 2008.

GOODMAN, R. E.; HEFLE, S. L.; TAYLOR, S. L.; VAN REE, R. Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: a review. **International Archives Allergy Immunology**, v. 137, p. 153-166, 2005.

GOODMAN, R. E.; VIETHS, S.; SAMPSON, H. A.; HILL, D.; EBISAWA, M.; TAYLOR, S. L.; VAN REE, R. Allergenicity assessment of genetically modified crops-what makes sense?. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 73-81, 2008.

GOMES, A. S. **Purificação, caracterização físico-química e biológica de proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. 2002. 100 p. Monografia (Graduação em Biologia) - Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

GONG, C. Y.; WANG, T. Proteomic evaluation of genetically modified crops: current status and challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, Article 41, 2013.

GOWRISHANKAR, R.; KUMAR, M.; MENON, V.; DIVI, S. M.; SARAVANAN, M.; MAGUDAPATHY, P.; PANIGRAHI, B. K.; NAIR, K. G. M.; VENKATARAMANIAN K. Trace element studies on *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Moringa oleifera* (Moringaceae), and *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) using PIXE. **Biological Trace Element Research**, v. 133, p. 357-363, 2010.

GOYAL, B. R.; AGRAWAL, B. B.; GOYAL, R. K.; MEHTA, A. A. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam - an overview. **Natural Product Radiance**, v. 6, p. 347-353, 2007.

GRANT, G. Lectins. In: D'MELLO, J. P. F., Duffus, C.M. (Eds.), **Toxic Substances in Crop Plants**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991. 49-67 p.

GRANT, G.; MORE, L. J.; MCKENZIE, N. H.; DORWARD, P. M.; BUCHAN, W. C.; TELEK, L.; PUSZTAI, A. Nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 124, p. 437-445, 1995.

GRANT, G., Plant lectins. In: CAYGILL, J. C., MUELLER-HARVEY, I. (Eds.), **Secondary Plant Products: Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding**, Nottingham: Nottingham University Press, 1999. 87-110 p.

GUIMARÃES, S. S. C. ***Fusarium solani* associado à soja no Brasil: morfologia, filogenia molecular e patogenicidade**. 2011. 66 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras-MG, 2011.

GUO, P.; WANG, Y.; ZHOU, X.; XIE, Y.; WU, H.; GAO, X. Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests. **Plant Science**, v. 211, p. 17-22, 2013.

HAMMOND, B.; KOUGH, J.; HEROUET-GUICHENEY, C.; JEZ, J. M. Toxicological evaluation of proteins introduced into food crops. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, p. 25-42, 2013.

HARRIS, C. A.; RENFREW, M. J.; WOOLRIDGE, M. W. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, p. 1124-1129, 2001.

HEDRICH, H. (Org.). **The laboratory mouse**. 1<sup>a</sup> ed. Academic Press, 2012. 868 p.

HEGEDUS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 132-145, 2013.

HERMAN, R. A.; SONG, P.; SEKHAR, A. T. Value of eight-amino-acid matches in predicting the allergenicity status of proteins: an empirical bioinformatic investigation. **Clinical and Molecular Allergy (Open Access)**, v. 9:7, 2009.

HÉROUET-GUICHENEY, C.; ROUQUIÉ, D.; FREYSSINET, M.; CURRIER, T.; MARTONE, A.; ZHOU, J.; BATES, E. E.; FERULLO, J. M.; HENDRICKX, K.; ROUAN, D. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 143-153, 2009.

HÉROUET, C.; ESDAILE, D. J.; MALLYON, B. A.; DEBRUYNE, E.; SCHULZ, A.; CURRIER, T.; HENDRICKX, K.; VAN DER KLIS, R. J.; ROUAN, D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 134-49, 2005.

HILEMAN, R. E.; SILVANOVICH, A.; GOODMAN, R. E.; RICE, E. A.; HOLLESCHAK, G.; ASTWOOD, J. D.; HEFLE, S. L. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. **International Archives of Allergy Immunology**, v. 128, p. 280-291, 2002.

HUBY, R. D. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **Toxicological Sciences**, v. 55, p. 235-246, 2000.

ISAAA. Pocket K No. 1: Q and A About Genetically Modified Crops. Biotech Information Resources. International Service for Acquisition Agri-Biotech Applications. 2014. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/>. Acesso em: 25.06.14.

ILSI HESI. Allergenicity Assessment for Foods Derived from Genetically Modified Crops, Protein Allergenicity Subcommittee. Health and Environmental Sciences Institute, International Life Sciences Institute, Washington DC, 2001.



JABEEN, R.; SHAHID, M.; JAMIL, A.; ASHRAF, M. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, p. 1349-1358, 2008.

JAISWAL, D.; KUMAR, R. P.; KUMAR, A.; MEHTA, S.; WATAL, G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 392-396, 2009.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. ISAAA Brief No. 46. ISAAA: Ithaca, NY. 2013.

JENKINS, N.; PAREKH, R. B.; JAMES, D. C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 975–981. 1996

JHA, S.; CHATTOO, B. B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. **Transgenic Research**, v. 19, p. 373-384, 2010.

JIANG, Y.; FU, X.; WEN, M.; WANG, F.; TANG, Q.; TIAN, Q.; LUO, K. Overexpression of an nsLTPs-like antimicrobial protein gene (LJAMP2) from motherwort (*Leonurus japonicus*) enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* oilseed rape (*Brassica napus*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 82, p. 81-87, 2013.

JOSHI, P.; MEHTA, D. Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick Leaves. **Journal of Metabolomics and Systems Biology**, v. 1, p. 5-9, 2010.

KANT, P.; REINPRECHT, Y.; MARTIN, C. J.; ISLAM, R.; PAULS, K. P. Disease Resistance/Pathology/Fusarium. **Comprehensive Biotechnology**, Second Edition. Amsterdam: Elsevier, p. 729-743, 2011.

KARIM, A. A.; AZLAN, A. Fruit pod extracts as a source of nutraceuticals and pharmaceuticals. **Molecules**, v. 17, p. 11931-11946, 2012.

KATAYON, S.; NOOR, M. J. M. M.; ASMA, M.; GHANI, L. A. A.; THAMER, A. M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B. C.; SULEYMAN, A. M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v.97, p.1455-1460, 2006.

KELSALL, A.; FITZGERALD, A. J.; HOWARD, C. V.; EVANS, R. C.; SINGH, R.; RHODES, J. M.; GOODLAD, R. A. Dietary lectins can stimulate pancreatic growth in the rat. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, p. 203-208, 2002.

KLETER, G. A.; PEIJNENBURG, A. A. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE - binding linear epitopes of allergens. **BMC Structural Biology (Open Access)**, v. 2:8, 2002.

KIBA, A.; NAKATSUKA, T.; YAMAMURA, S.; NISHIHARA, M. Gentic lipid transfer protein homolog with antimicrobial properties confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology**, v. 29, p. 95-101 2012.

KÖNIG, A.; COCKBURN, A.; CREVEL, R. W.; DEBRUYNE, E.; GRAFSTROEM, R.; HAMMERLING, U.; KIMBER, I.; KNUDSEN, I.; KUIPER, H. A.; PEIJNENBURG, A. A.; PENNINKS, A. H.; POULSEN, M.; SCHAUZU, M.; WAL, J. M., Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1047-1088, 2004.

KOSTOV, K.; CHRISTOVA, P.; SLAVOV, S.; BATCHVAROVA, R. Constitutive expression of a radish defensin gene Rs-Afp2 in tomato increases the resistance to fungal pathogens. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 1121-1125, 2009.

KUMAR, P. S.; MISHRA D.; GHOSH, G.; PANDA, C. S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. **International Journal of Phytomedicine**, v. 2, p. 210-216, 2010.

KUTCHER, H. R.; JOHNSTON, A. M.; BAILEY, K. L.; MALHI, S. S. Managing crop losses from plant diseases with foliar fungicides, rotation and tillage on a Black Chernozem in Saskatchewan, Canada. **Field Crops Research**, v. 124, p. 205-212, 2011.

LABANDEIRA, C. C.; PREVEC, R. Plant paleopathology and the roles of pathogens and insects. **International Journal of Paleopathology**, v.4, p. 1-16, 2014.

LACERDA, A. F.; VASCONCELOS, E. A. R.; PELEGRINI, P. B.; GROSSI DE SA, M. F. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers Microbiology**, v. 5, p. 1-10, 2014.

LADICS, G. S. Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. S20-S23, 2008.

LADICS, G. S.; CRESSMAN, R. F.; HÉROUET-GUICHENEY, C.; HERMAN, R. A.; PRIVALLE, L.; SONG, P.; WARD, J. M.; MCCLAIN, S. Bioinformatics and the allergy assessment of agricultural biotechnology products: Industry practices and recommendations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 46-53, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LEE, O. S.; LEE, B.; PARK, N.; KOO, J. C.; KIM, Y. H.; PRASAD, D. T.; KARIGAR, C.; CHUN, H. J.; JEONG, B. R.; KIM, D. H.; NAM, J.; YUN, J. G.; KWAK, S. S.; CHO, M. J.; YUN, D. J. Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1073-1079, 2003.

LEONARD, R.; PETERSEN, B. O.; HIMLY, M.; KAAR, W.; WOPFNER, N.; KOLARICH, D.; VAN REE, R.; EBNER, C.; DUUS, J. Ø.; FERREIRA, F.; ALTMANN, F. Two novel types of o-glycans on the mugwort pollen allergen art v 1 and their role in antibody binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 7932-7940, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 347, 2002.

MADDURI, K. M.; SCHAFER, B. W.; HASLER, J. M.; LIN, G.; FOSTER, M. L.; EMBREY, S. K.; SASTRY-DENT, L.; SONG, P.; LARRINUA, I. M.; GACHOTTE, D. J.; HERMAN, R. A. Preliminary safety assessment of a membrane-bound delta 9 desaturase candidate protein for transgenic oilseed crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3776-3784, 2012.

MANDAL, S. M.; PORTO, W. F.; DEY, P.; MAITI, M. K.; GHOSH, A. K.; FRANCO, O. L. The attack of the phytopathogens and the trumpet solo: Identification of a novel plant antifungal peptide with distinct fold and disulfide bond pattern. **Biochimie**, v. 95, p. 1939-1948, 2013.

MANGALE, S. M.; CHONDE, S. G.; RAUT, P. D. Use of *Moringa oleifera* (Drumstick) seed as natural absorbent and an antimicrobial agent for ground water treatment. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, p. 31-40, 2012.

MANGURO, L. O.; LEMMEN, P. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. **Natural Product Research**, v. 21, p. 56-68, 2007.

MAREI, G. I. Kh.; RASOUL, M. A. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 56-61, 2012.

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E. Plant peptides in defense and signaling. **Peptides**, v. 56, p. 30-44, 2014.

MATOS, F. J. A. (Org.). **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Editora UFC, 2004.

MAZIAH, M.; SARIAH, M.; SREERAMANAN, S. Transgenic Banana Rastali (AAB) with  $\beta$ -1,3-glucanase Gene for Tolerance to *Fusarium* Wilt Race 1 Disease via *Agrobacterium*-mediated Transformation System. **Plant Pathology Journal**, v. 6, p. 271-282, 2007.

MEHTA, L. K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A. H.; BAFNA, P. A.; GULATI, O. D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 191-195, 2003.

MENG, X.; YANG, L.; KENNEDY, J. F.; TIAN, S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 70-75, 2010.

MICHELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v.10, p. 311-324, 2009.

MOHANDAS, S.; SOWMYA, H. D.; SAXENA, A. K.; MEENAKSHI, R.; THILAKA RANI, R.; MAHMOOD, R. Transgenic banana cv. *Rasthali* (AAB, Silk gp) harboring Ace-AMP1 gene imparts enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 1. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 392-399, 2013.

MUGHAL, M. H. S.; SRIVASTAVA, P. S.; IQBAL, M. Drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.): a unique source of food and medicine. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, v. 23, p. 47-61, 1999.

MURAD, A. M.; PELEGRINI, P. B.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L. Novel findings of defensins and their utilization in construction of transgenic plants. **Transgenic Plant Journal**, v. 1, p. 39-48, 2007.

NAMBIAR, V. S.; GUIN, P.; PARNAMI, S.; DANIEL, M. Impact of antioxidants from drumstick leaves on the lipid profile of hyperlipidemics. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**, v. 4, p. 165-172, 2010.

NEWMAN, M. A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-14, 2013.

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, v. 25, p.1215-1222, 2004.

NICOLIA, A.; MANZO, A.; VERONESI, F.; ROSELLINI, D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. **Critical Reviews in Biotechnology**, Early Online, p 1-12, 2013.

OECD. An Introduction to the Food/Feed Safety Consensus Documents of the Task Force. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, n. 14. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development. 2006.

OECD. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Proteins. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Journal: General Papers, v. 7, 35p, 2007.

OECD. Safety Assessment of Transgenic Organisms. OECD Consensus, Documents OECD, v. 3, 324p, 2010. Disponível em: [http://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/safety-assessment-of-transgenic-organisms\\_9789264095434-en](http://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/safety-assessment-of-transgenic-organisms_9789264095434-en). Acesso em: 25.06.14.

OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg\\_425.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg_425.pdf). Acesso em: 10 nov. 2013.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, E. M. M.; WATANABE, E. Revisão: Segurança Alimentar de Produtos Derivados da Biotecnologia Moderna. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, p. 201-213, 2004.

OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; GONDIM, M. J. L.; MOREIRA, L. I. M. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, p. 417-424, 1994.

OLIVEIRA, J. T. A.; SILVEIRA, S. B.; VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 815-820, 1999.

PARROTT, W.; CHASSY, B.; LIGON, J.; MEYER, L.; PETRICK, J.; ZHOU, J.; HERMAN, R.; DELANEY, B.; LEVINE, M. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1773-1790, 2010.

PEREIRA, M. L. **Identificação de Uma Proteína Ligante à Quitina em Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck com Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PEREIRA, M. L. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP<sub>4</sub>, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral**. 2013. 208 f. Tese. (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; GIFONI, J. M.; ROCHA, R. O.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.

PRETTY, J. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 363, p. 447-465, 2008.

PRIVALLE, L.; BANNON, G.; HERMAN, R.; LADICS, G.; MCCLAIN, S.; STAGG, N.; WARD, J.; HEROUET-GUICHENEY, C. Heat stability, its measurement, and its lack of utility in the assessment of the potential allergenicity of novel proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 292-295, 2011.

PUSZTAI, A. General effects on animal cells. In: PUSZTAI, A., (Ed.), **Plant Lectins**, Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 105-205 p.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; GELENCSE, E.; EWEN, S. W. B.; PFÜLLER, U.; EIFLER, R.; BARDOCZ, S. Effects of an orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 31-36, 1998.

QI, X.; ZHOU, C.; LI, P.; XU, W.; CAO, Y.; LING, H.; NING CHEN, W.; MING LI, C.; XU, R.; LAMRANI, M.; MU, Y.; LEONG, S. S.; WOOK CHANG, M.; CHAN-PARK, M. B. Novel short antibacterial and antifungal peptides with low cytotoxicity: Efficacy and action mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, p. 594-600, 2010.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Journal of Economic Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980.

RANDHAWA, G. J.; SINGH, M.; GROVER, M. Bioinformatic analysis for allergenicity assessment of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins expressed in insect-resistant food crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 356-362, 2011.

RICE, E. A.; THOMAS, C. L.; GLEN, R.; GARY, A. B. Safety assessment of proteins used in crops developed through agricultural biotechnology. In: HAMMOND, B. G. **Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology**. Series: Food Science and Technology. CRC Press Content, 2007 320p.

ROCHA, M. F. G.; AGUIAR, F. L. N.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TEXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; ZEFERINO, J. P. O.; MAFEZOLI, J.; SAMPAIO, C. M. S.; BARBOSA, F. G.; SIDRIM, J. J. C. Extratos de *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp. sobre *Candida albicans* e *Microsporium canis* isolados de cães e gatos e análise da toxicidade em *Artemia* sp. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1807-1812, 2011.

ROESLER, K. R.; RAO, A. G. Rapid gastric fluid digestion and biochemical characterization of engineered proteins enriched in essential amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3443-3451, 2001.

ROLIM, L. A. D. M. M.; MACÊDO, M. F. S.; SISENANDO, H. A.; NAPOLEÃO, T. H.; FELZENSZWALB, I.; AIUB, C. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; MEDEIROS, S. R. B.; PAIVA, P. M. G. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 53-58, 2011.

ROLOFF, A.; WEISGERBER, H.; LANG, U.; STIMM, B. *Moringa oleifera* Lam., 1785. **Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie**, v. 40, 2009.

ROY-BARMAN, S.; SAUTTER, C.; CHATTOO, B. B. Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP1 in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. **Transgenic Research**, v. 15, p. 435-446, 2006.

SACHER, R. A.; MCPHERSON, R. A. **Widmann's clinical interpretation of laboratory tests**. F. A. Davis Company. Washington, D. C., 2000. 1090p.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, N. D. L.; MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K. N.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **Plos one**, v. 7, e44840, 2012.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SEYIT, A.; NEJDET, G.; HARUN, Y. Natural and experimental infections of *Campylobacter cryaerophila* in rainbow trout: gross pathology, bacteriology, clinical pathology and chemotherapy. **Fish Pathology**, v. 35, p. 117-123, 2000.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SIDDIQUI, Y.; ALI, A. Chapter 11 - *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose) **Postharvest Decay**, p. 337-371, 2014.

SILVA, L. G. C. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* associados à antracnose do cajueiro**. 2011. 90 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

SILVA, A. R.; KERR, W. E. **Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil**. Uberlândia: UFU/DIRIU, 95 p, 1999.

SOUSA, A. J. S. **Caracterização do exsudato de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e investigação de seu papel na defesa do vegetal**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SRIDEVI, G.; PARAMESWARI, C.; SABAPATHI, N.; RAGHUPATHY, V.; Combined expression of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. **Plant Science**, v. 175, p. 283-290, 2008.

STADLER, M. B.; STADLER, B. M. Allergenicity prediction by protein sequence. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1141-1143, 2003.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 83-116, 2005.

STUSSI, I. A.; FREIS, O.; MOSER, P.; PAULY, G. Laboratoires Sérobiologiques Pulnoy, France [http://www.laboratoiresserobiologiques.com/pdf/Article\\_HappiAntiPol2002.pdf](http://www.laboratoiresserobiologiques.com/pdf/Article_HappiAntiPol2002.pdf). 2002.

THOMAS, K.; AALBERS, M.; BANNON, G. A.; BARTELS, M.; DEARMAN, R. J.; ESDAILE, D. J.; FU, T. J.; GLATT, C. M.; HADFIELD, N.; HATZOS, C.; HEFLE, S. L.; HEYLINGS, J. R.; GOODMAN, R. E.; HENRY, B.; HEROUET, C.; HOLSAPPLE, M.; LADICS, G. S.; LANDRY, T. D.; MACINTOSH, S. C.; RICE, E. A.; PRIVALLE, L. S.; STEINER, H. Y.; TESHIMA, R.; VAN REE, R.; WOOLHISER, M.; ZAWODNY, J. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 87-98, 2004.

THOMAS, K.; MACINTOSH, S.; BANNON, G.; HEROUET-GUICHENEY, C.; HOLSAPPLE, M.; LADICS, G.; MCCLAIN, S.; VIETHS, S.; WOOLHISER, M.; PRIVALLE, L. Scientific advancement of novel protein allergenicity evaluation: An overview of work from the HESI Protein Allergenicity Technical Committee (2000–2008). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1041-1050, 2009.

THURBER, M. D.; FAHEY, J. W. Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the “diffusion of innovations” theory. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 48, p. 212-225, 2009.

TOENNIESSEN, G. H.; O'TOOLE, J. C.; DEVRIES, J. Advances in plant biotechnology and its option in developing countries. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 191-198, 2003.

UTKHEDE, R.; BOGDANOFF, C. Influence of lysozyme, yeast, azoxystrobin, and myclobutanil on fungal diseases of cucumbers grown hydroponically. **Crop Protection**, v. 22, p. 315-320, 2003.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1538-1550, 2011.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A. B.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 1-8, 2001.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.

VIEIRA, A. M. S.; VIEIRA, M. F.; SILVA, G. F.; ARAÚJO, A. A.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; VEIT, M. T.; BERGAMASCO, R. Use of *Moringa oleifera* seed as a natural adsorbent for wastewater treatment. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p. 273-281, 2010.

VOGT, V.; CIFUENTE, D.; TONN, C.; SABINI, L.; ROSAS, S. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 583-586, 2013.



WADHWA, S.; PANWAR, M. S.; SAINI, N.; RAWAT, S. S.; SINGHAL, S. A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of moringa oleifera. **Global Journal of Traditional Medicinal Systems**, v. 2, p. 1-13, 2013.

XIANBI, L.; XINGYONG, Y.; DEMOU, L.; SHAOHUI, G.; YAN, P. Enhancing disease resistance in transgenic tomato over-expressing antimicrobial proteins, LjAMP1 and LjAMP2 from motherwort seeds. **Acta Phytophylacica Sinica**, v. 34, p. 354-358, 2007.

XU, W.; CAO, S.; HE, X.; LUO, Y.; GUO, X.; YUAN, Y.; HUANG, K. Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1459-1465, 2009.

YADAV, S.; TOMAR, A. K.; YADAV, R. N.; YADAV S. Screening of antifungal proteins from plants of Cucurbitaceae family against *Fusarium oxysporum*: Potential as biofungicides. **International Research Journal of Environment Sciences**, v. 2, p. 91-96, 2013.

YANG, X.; XIAO, Y.; WANG, X.; PEI, Y. Expression of a Novel Small Antimicrobial Protein from the Seeds of Motherwort (*Leonurus japonicus*) Confers Disease Resistance in Tobacco. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 939-946, 2007.