



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

ANDRÉA SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE
UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia* L.),
COMO ETAPAS PRELIMINARES PARA SEU USO TERAPÊUTICO EM
HUMANOS**

FORTALEZA - CEARÁ

2016

ANDRÉA SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE
UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia* L.),
COMO ETAPAS PRELIMINARES PARA SEU USO TERAPÊUTICO EM
HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

FORTALEZA - CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C87a Costa, Andréa Santos.
Avaliação da estabilidade e da toxicidade pré-clínica de uma proteína isolada de sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.), como etapas preliminares para seu uso terapêutico em humanos. / Andréa Santos Costa. – 2016.
100 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. *Morinda citrifolia* L.. 2. Noni. 3. Stability tests. 4. Pre-clinical toxicity. 5. Biopharmaceutical. I. Título.
CDD 572
-

ANDRÉA SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE
UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia* L.),
COMO ETAPAS PRELIMINARES PARA SEU USO TERAPÊUTICO EM
HUMANOS**

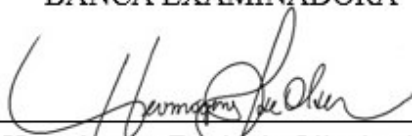
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 25 / 02 / 2016.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmãos, tios, primos e ao meu amor, que são as pessoas mais importantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida que me foi concedida e por me guiar e proteger, sempre me dando tantos motivos para comemorar e força nas dificuldades.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, segurando minha mão, torcendo pelo meu sucesso. Em especial, minha mãe, por seu amor incondicional, pela educação que me proporciona e por sempre buscar me mostrar o caminho correto. Também ao meu pai, por todo o amor, preocupação, ajuda e dedicação.

Aos meus irmãos Izaac e Izaura, por serem os mais bem-humorados companheiros e por sempre acreditarem em minha capacidade, mesmo quando eu mesma duvido.

À minha tia Cleonice e meu tio Paulo, por serem outros pais em minha vida, assim como meus primos Paulinho e Pedrinho, que na verdade são meus irmãos de coração.

Ao meu amor Ricardo, pelo carinho ofertado diariamente, companheirismo, dedicação e por sempre mostrar o lado leve da vida.

Ao meu orientador, professor Hermógenes David de Oliveira, por me oferecer o BioAP como segundo lar e acreditar no meu potencial para conduzir este trabalho. Por estar presente em cada detalhe, seja na escrita, bancada ou numa conversa durante o café, sempre me guiando com o carinho e disciplina de um pai e amigo.

À professora Márjory Holanda, por toda boa convivência e aprendizado e por contribuir para que o laboratório funcione da melhor forma.

À minha amiga que o laboratório me deu de presente, Dyély Campos, por todo o apoio e amizade dedicados a mim.

Aos companheiros de laboratório Acrísio, Adrienne, Adson, Amanda, Ana Márjory, Áurea, Carol, Chris, Diene, Ewerton, George, Ingrid, Neto, Patrício, Roberta, Sheila, Tici e Vilmara pela alegre convivência e por toda ajuda na condução dos experimentos.

Aos membros da minha banca examinadora, professoras Nylane Maria Nunes Alencar e Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira por darem suas contribuições a este trabalho.

Aos integrantes dos laboratórios de Toxinas Vegetais e Laboratório de Proteínas de Defesa de Plantas por todo suporte e disponibilidade em prestar ajuda sempre que necessário.

A todos os professores da pós-graduação em Bioquímica pelos ensinamentos transmitidos nas disciplinas cursadas.

A todos os amigos e amigas que estiveram presentes me dando alegria, apoio e momentos de descontração.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, especialmente ao Gilmar, Daniel, Gil, Edberto e Teka por garantirem o funcionamento adequado e viabilizarem a realização dos trabalhos de professores e alunos.

Ao Neto, por cuidar e zelar pelo Biotério, sempre buscando gerar o menor desconforto possível aos animais.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização deste mestrado e que me ofereceu experiências tão ricas.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas**, sob a coordenação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira e da Profa. Dra. Marjory Lima Holanda.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) e FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP) – através do apoio financeiro.

À **EMBRAPA – CNPAT**, representada pelo pesquisador Dr. João Alencar de Sousa, por fornecer as sementes de noni para a realização deste trabalho.

À **UNIVERSIDADE DE LONDRINA – UEL**, representada pelo professor Mário Sérgio Mantovani, pelo apoio na realização dos experimentos de citotoxicidade.

RESUMO

Morinda citrifolia L. (Noni) é uma espécie vastamente utilizada como agente terapêutico em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil. Recentemente nosso grupo de pesquisa isolou a partir das sementes dessa espécie uma proteína transferidora de lipídeos, denominada *McLTP₁*, com ações terapêuticas promissoras em modelos de nocicepção e inflamação. As atividades de *McLTP₁* foram também observadas após o tratamento de camundongos com a proteína pela via oral. Este trabalho objetivou avaliar a estabilidade de *McLTP₁* em diferentes condições de armazenamento, seu período de ação antinociceptiva, além de avaliar a sua toxicidade pré-clínica utilizando guidelines sugeridos pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). *McLTP₁* foi isolada a partir de sementes de noni seguindo um protocolo previamente estabelecido. O armazenamento de *McLTP₁* por 1, 3 e 6 meses a -20, 4 e 25 °C, protegida da incidência de luz, não foi capaz de promover alterações em sua aparência, suspendabilidade, estrutura secundária e atividade antinociceptiva, cuja potência de efeito foi estatisticamente igual àquela obtida no grupo controle tratado com a proteína não-armazenada. No armazenamento de *McLTP₁* sem proteção da luz foram observadas alterações na cor, mudanças significativas na suspendabilidade já no primeiro mês, visto que o teor de proteínas foi significativamente reduzido em relação à proteína não armazenada, bem como na potência de efeito farmacológico. *McLTP₁* apresentou efeito biológico mesmo após 12 horas de administração, no qual ainda foi verificada redução significativa do número de contorções abdominais em camundongos e proteína disponível na circulação sistêmica nos animais tratados, comprovada por imunodeteção. Nos testes de toxicidade em dose única (doses de 8 e 80 mg/kg) e repetidas (8 mg/kg), não foram observadas alterações no ganho de peso, consumo de ração, parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos. A análise histológica também mostrou que a arquitetura de diversos órgãos também foi preservada. Também não foram observadas alterações na viabilidade celular em cultura de células HepG2/C3a no teste de citotoxicidade. Os dados obtidos estabeleceram condições ideais para o armazenamento de *McLTP₁* e forneceram bases relevantes para o seu uso como princípio ativo para o tratamento da inflamação e da dor.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia* L. Noni. Testes de estabilidade. Toxicidade pré-clínica. Biofármaco.

ABSTRACT

Morinda citrifolia L. (noni) is a medicinal plant that has been reported to have a broad range of health benefits for cancer, infection, hypertension and inflammation. Previous reports have demonstrated that a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. seeds, named *McLTP*₁, displays anti-inflammatory activity in mice when administered by oral route, suggesting that this protein has potential to act as a new active principle for the development of an anti-inflammatory drug. *McLTP*₁ was isolated from the noni seed meal through trichloroacetic acid (2.5%) precipitation and ultrafiltration. In this work, we carried out a storage stability and toxicity study of the *McLTP*₁ and investigated its capacity to reach the systemic circulation, as well as its duration of the antinociceptive effect after oral administration. The *McLTP*₁ storage for 1, 3 and 6 months at -20, 4 and 25 ° C, protected from light incidence, did not change its appearance, suspension, secondary structure and antinociceptive activity. *McLTP*₁ prove to be capable of reaching a systemic circulation being detected up to 12 hours after the administration and maintaining its antinociceptive effect at the same time. There was neither significant change in mice's gross behavior and toxicity signs throughout the experimental period (single and repeated dose). Mice body weight as well as haematological, biochemical and histopathological parameters were not affected by daily administration of *McLTP*₁ (8mg/kg). It was not found any sign of cytotoxicity using cell line of human hepatocarcinoma (HepG2/C3a). In conclusion, these results contribute to the safety assessment of *McLTP*₁ for human use in treatment of inflammation and pain.

Keywords: *Morinda citrifolia* L. Noni. Stability tests. Pre-clinical toxicity. Biopharmaceutical.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 01 - Visão geral do processo inflamatório.	16
Figura 02 – Processo de descoberta de drogas (<i>drug-discovery</i>).	20
Figura 03 – Aspectos gerais das partes de <i>Morinda citrifolia</i> L.	31
Figura 04 – Estrutura de uma LTP de <i>Triticum aestivum</i> .	34
Figura 05 – Esquema de isolamento de <i>McLTP</i> ₁ a partir de sementes de <i>Morinda citrifolia</i> L.	40
Figura 06 – Aparência de <i>McLTP</i> ₁ liofilizada não-armazenada e armazenada pelos períodos de 1, 3 e 6 meses em diferentes condições.	51
Figura 07 – Análise eletroforética de <i>McLTP</i> ₁ armazenada por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.	55
Figura 08 – Análise densitométrica de <i>McLTP</i> ₁ não-armazenada e armazenada por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.	56
Figura 09 – Espectro de Dicroísmo Circular de <i>McLTP</i> ₁ não armazenada (tempo 0) liofilizada e reconstituída em H ₂ O destilada.	58-59
Figura 10 – Atividade antinociceptiva de <i>McLTP</i> ₁ (8mg/kg, v.o.) armazenada nos tempos 1, 3 e 6 meses, em diferentes temperaturas, em camundongos.	61-62
Figura 11 – Imunodeteção de <i>McLTP</i> ₁ no soro de camundongos tratados com a dose de 8 mg/kg pela via oral.	63
Figura 12 – Acompanhamento do efeito antinociceptivo de <i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg) após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 horas de administração pela via oral.	64
Figura 13 – Massa corpórea dos animais de ambos os sexos tratados com <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg no teste de toxicidade em doses repetidas.	66
Figura 14 – Análise histológica dos órgãos de camundongos tratados com <i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg) no teste toxicidade em doses repetidas.	70-73
Figura 15 – Avaliação da citotoxicidade de <i>McLTP</i> ₁ em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3a) após 24 horas de estabilização celular.	74

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 01 – Alguns biofármacos comercializados.	26
Tabela 02 – Teores de <i>McLTP</i> ₁ solúvel em água após o armazenamento por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.	53
Tabela 03 – Teores de <i>McLTP</i> ₁ solúvel em água estimada pelo método de Bradford (1976) após o armazenamento por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.	54
Tabela 04 - Padrões de distribuição da estrutura secundária presentes em <i>McLTP</i> ₁ , determinados a partir do espectro de dicroísmo circular.	60
Tabela 05 – Análises hematológicas dos camundongos de ambos os sexos tratados com <i>McLTP</i> ₁ no teste toxicidade em doses repetidas.	67
Tabela 06 – Parâmetros bioquímicos em camundongos tratados com <i>McLTP</i> ₁ no teste toxicidade em doses repetidas.	68
Tabela 07 – Peso fresco relativo dos órgãos (g/10 g) de camundongos de ambos os sexos tratados com <i>McLTP</i> ₁ no teste toxicidade em doses repetidas.	69

SUMÁRIO

	PÁGINA
1	INTRODUÇÃO 15
1.1	Tratamento da inflamação e da dor: aspectos farmacológicos e efeitos adversos 15
1.2	Utilização de plantas medicinais em estratégias de <i>Drug Discovery</i> 18
1.2.1	<i>Potencial terapêutico de proteínas e peptídeos de plantas</i> 21
1.3	Testes de estabilidade e segurança farmacológica para futuros medicamentos 24
1.4	<i>Morinda citrifolia</i> L. 30
1.4.1	<i>Visão geral</i> 30
1.4.2	<i>McLTP₁: Morinda citrifolia Lipid Transfer Protein 1</i> 33
2	OBJETIVOS 38
2.1	Objetivos gerais 38
2.2	Objetivos específicos 38
3	MATERIAIS E MÉTODOS 39
3.1	Material biológico 39
3.2	Isolamento de <i>McLTP₁</i> 39
3.3	Bloco 01 – Avaliação da estabilidade de <i>McLTP₁</i> 41
3.3.1	<i>Delineamento experimental</i> 41
3.3.2	<i>Aparência, solubilidade e quantificação de proteínas</i> 42
3.3.3	<i>Perfil eletroforético e análise densitométrica</i> 42
3.3.4	<i>Determinação dos espectros de dicroísmo circular</i> 43
3.3.5	<i>Potência de efeito farmacológico</i> 43

3.3.5.1	<i>Animais experimentais</i>	43
3.3.5.2	<i>Atividade antinociceptiva</i>	44
3.4	Bloco 02 – Avaliação da biodisponibilidade, cinética de decaimento de efeito farmacológico e toxicidade de <i>McLTP₁</i>	45
3.4.1	<i>Avaliação da biodisponibilidade de <i>McLTP₁</i> por imunodeteção</i>	45
3.4.2	<i>Acompanhamento do efeito antinociceptivo</i>	46
3.4.3	<i>Toxicidade oral em dose única</i>	47
3.4.4	<i>Toxicidade oral em doses repetidas</i>	47
3.4.4.1	<i>Análise hematológica</i>	47
3.4.4.2	<i>Análise bioquímica</i>	48
3.4.4.3	<i>Avaliação macroscópica dos órgãos</i>	48
3.4.4.4	<i>Histopatologia</i>	48
3.4.5	<i>Citotoxicidade de <i>McLTP₁</i> utilizando o teste do MTT</i>	49
3.5	Análise estatística	
4	RESULTADOS	50
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

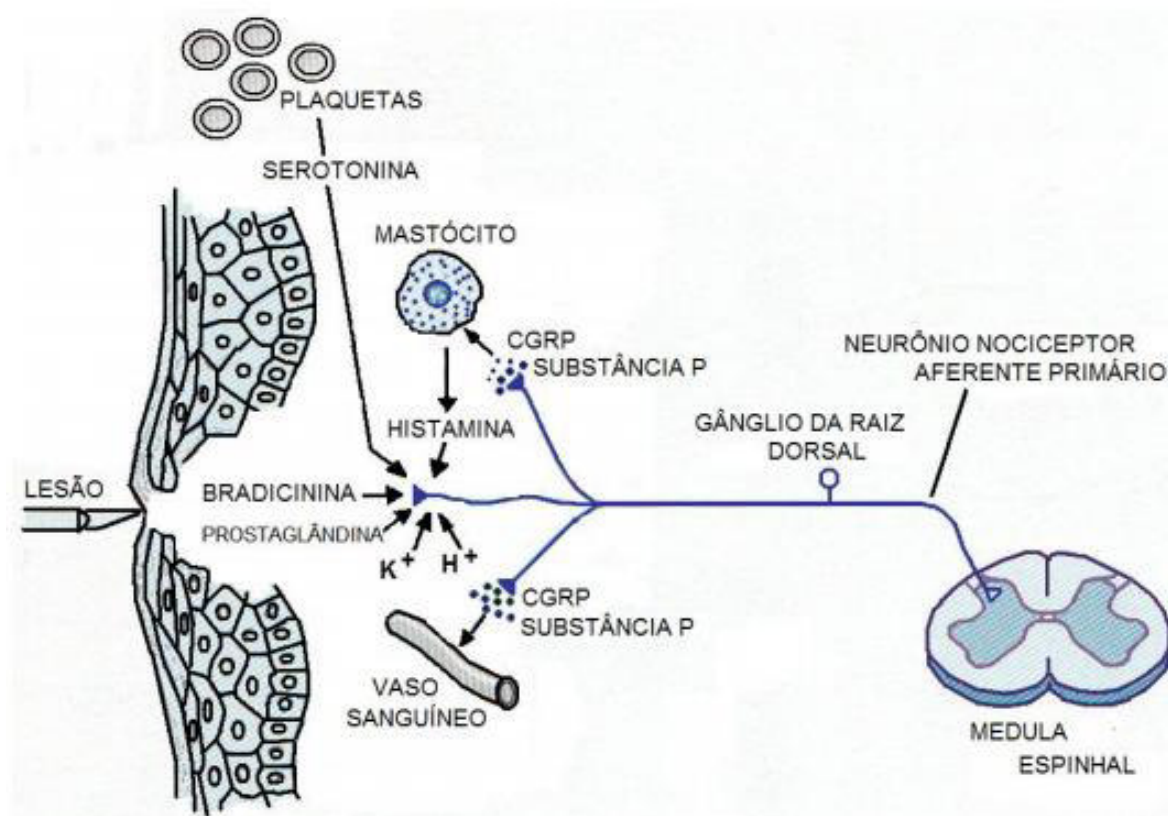
1 INTRODUÇÃO

1.1 Tratamento da inflamação e da dor: aspectos farmacológicos e efeitos adversos

A inflamação se trata de um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN *et al.*, 2006). O estímulo inflamatório induz a formação e a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, capazes de gerar mudanças na morfologia e integridade das células endoteliais. São fatores solúveis, como histamina e cininas, que promovem alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular. Várias células têm sido responsabilizadas por iniciar a cascata de eventos dos processos inflamatórios. Entre elas, destacam-se os mastócitos, que são células que sintetizam e estocam no interior dos seus grânulos mediadores inflamatórios, como a própria histamina, leucotrienos, prostaglandinas e proteases. Além desses, ocorre produção e liberação de citocinas do tipo IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14, TNF- α e de quimiocinas como MIP-1 α , MCP-1 e linfotaxinas (BERNOIST e MATHIS, 2002), que irão participar do recrutamento inicial dos leucócitos. A visão geral do processo inflamatório está esquematizada na **figura 1**.

A inflamação é iniciada após a lesão tecidual e desencadeia uma cascata de reações bioquímicas que prepararam o sistema nervoso para a detecção da dor. O processo inflamatório envolve a ocorrência de fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos quatro sinais cardeais da inflamação: calor, rubor (eritema), tumor (edema) e dor, descritos por Cornelius Celsus no início do século (*“Signa inflammationis quatuor sunt: Rubor et Tumor, cum Calor et Dolor”*) (LUENGO, 2005). Mais tarde foi introduzido, como o quinto sinal, a perda de função do tecido ou órgão lesado (ARSATI *et. al.*, 1999). Além disso, a inflamação de longo prazo reforça mudanças adaptativas no sistema nervoso que podem causar a sensação de dor e atingir estágio exagerado ou inadequado (HEALTH CONCERNS, 2015).

Figura 01 – Visão geral do processo inflamatório



Fonte: NESTLER *et al.*, 2001.

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) a dor é definida como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Ainda, a dor é uma experiência subjetiva, onde cada indivíduo sente de formas diferentes, sendo intensamente influenciada pelo estado emocional. Assim, pode ser interpretada como a soma de um componente sensorial e de um componente emocional (GIESECKE *et al.*, 2005; LOESER e TREEDE, 2008). Pode ser ainda, diferenciada entre dor aguda e crônica. A dor aguda é fundamental para a preservação da integridade do indivíduo, esta alerta para a ocorrência de lesões no organismo. Antagonista a ela, está a dor crônica que por não apresentar este valor biológico é uma importante causa de incapacidade (TEIXEIRA, 2001).

O processo inflamatório e a dor exercem um importante papel fisiológico: o primeiro representando a necessidade de um reparo tecidual ou trauma, e o segundo atuando como um sistema de alerta, o qual salienta a existência de um perigo iminente no ambiente que nos cerca (WOOLF e SALTER, 2000). Sendo assim, a inflamação e a dor são processos

fisiológicos essenciais à vida, pois nos ensinam a evitar situações danosas, desencadeando reflexos para que ocorra a retirada do corpo ou de parte dele para longe de um estímulo nocivo, além de induzir o repouso em regiões já lesionadas (ROBBINS, 2010).

Apesar de serem fundamentais para a nossa sobrevivência, essas respostas podem provocar sofrimento e reações emocionais negativas, reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos (CHAPMAN e GAVRIN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001), tornando-se claro que as reações inflamatórias ou imunológicas inadequadas formam um componente significativo de muitas, se não da maioria, das doenças encontradas na clínica (RANG & DALE, 2008). Consequentemente, o controle da dor e inflamação é uma das grandes prioridades terapêuticas.

Assim, os fármacos anti-inflamatórios são extensamente empregados em todos os ramos da medicina (RANG e DALE, 2008). Existem dois grandes grupos de anti-inflamatórios em uso clínico: os anti-inflamatórios estereoidais (AIEs), representados pelos glicocorticóides, que agem bloqueando a síntese e a secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios; e os anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs), que agem inibindo a síntese de prostanóides (RANG e DALE, 2008; BOOTHE, 2001).

Os glicocorticóides inibem tanto as manifestações precoces quanto as manifestações tardias da inflamação, ou seja, não apenas os sinais cardeais da inflamação, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparação da lesão, e as reações proliferativas observadas na inflamação crônica. Os glicocorticóides ligam-se a receptores intracelulares que, em seguida, sofrem dimerização, migram para o núcleo e interagem com o DNA para modificar a transcrição gênica. Entretanto, seu uso prolongado pode levar a efeitos adversos como supressão renal, alterações dos fêneros, ossos e tecido conjuntivo, dentre outros (PEDERSEN e O'BYRNE, 1997).

As ações dos AINEs fundamentam-se na supressão da síntese de prostanóides em células inflamatórias através da inibição das isoformas da ciclooxigenase (COX), sem, no entanto, reduzir o acúmulo de células inflamatórias e, portanto, sem conter a progressão da doença (RANG e DALE, 2008). Eles inibem as ciclooxigenases (COX), que são enzimas responsáveis pela degradação do ácido araquidônico e formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (CHAHADE *et al*, 2008).

Nos últimos anos, tem sido questionada a segurança do uso dos anti-inflamatórios na prática clínica, particularmente dos inibidores seletivos da COX-2 em presença de determinadas condições e doenças, o que levou à retirada de alguns desses fármacos do mercado em várias partes do mundo (Rofecoxib em 2004; Vioxx em 2004; Bextra em 2005; Arcoxia em

2008; Ibuprofen em 2015; Nimesulida em 2015). Pode-se dizer que se sobressaem como possíveis efeitos adversos ações no sistema cardiovascular (propensão à trombose e risco de aterogênese focal em locais de bifurcação vascular, elevação da pressão arterial média) e efeitos renais (diminuição da perfusão renal total, isquemia medular e, em certas condições insuficiência renal aguda) (BATLOUNI, 2010), fazendo com que pesquisadores, cada vez mais, busquem fontes de compostos com efeitos terapêuticos para disponibilizar mais opções efetivas e seguras de tratamento da inflamação e da dor.

Tal como observado para os anti-inflamatórios, o uso de substâncias analgésicas também pode ocasionar efeitos adversos consideráveis. Dependência, lesões hepáticas, espasmos musculares e problemas respiratórios compõem a lista de alguns dos efeitos potencialmente observáveis e justificam a busca cada vez mais frequente por agentes analgésicos mais potentes e seguros do ponto de vista farmacológico.

1.2 Utilização de plantas medicinais em estratégias de *Drug Discovery*

Planta medicinal é toda e qualquer planta que tenha em qualquer de suas partes ou órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins de tratamento ou prevenção de enfermidades, sendo amplamente utilizadas pela medicina alternativa (AMOROZO, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). A obtenção de substâncias com propriedades terapêuticas é uma das aplicações mais tradicionais e consolidadas da biodiversidade, datando de milhares de anos. Antes da revolução da medicina moderna, inúmeros povos ao longo da história descobriram o uso de plantas com propriedades curativas, práticas até hoje comuns em diversos países, inclusive no Brasil (CDB, 2015). Produtos naturais têm desempenhado um papel fundamental na pesquisa farmacêutica, já que muitos medicamentos são ou produtos naturais ou seus derivados (JACOB, 2009).

De acordo com Oliveira (2005), os produtos naturais não só complementam moléculas sintéticas, eles também exibem características relevantes insuperáveis por qualquer composto sintético. Uma característica chave dos produtos naturais é a sua enorme diversidade estrutural e química. Vale ressaltar que os produtos naturais são uma fonte de novos compostos com arranjos estruturais diversificados que possuem atividades biológicas interessantes e, assim, desempenharam e continuam a desempenhar um papel inestimável no processo de descoberta de drogas (BRAHMACHARI, 2012).

Medicamentos à base de plantas, inicialmente distribuídos sob a forma de fármacos brutos, tais como tinturas, emplastos, chás, pós, e outras formulações à base de plantas, agora

servem como base a descoberta de drogas novas. O conhecimento indígena à base de plantas foi passado de geração em geração em várias partes do mundo ao longo de sua história e tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de diferentes sistemas tradicionais de medicina (BRAHMACHARI, 2012).

O conceito de um receptor molecular ou alvo no interior do corpo que é especificamente modulado por um fármaco administrado exogenamente é bastante recente. As origens de todo desenvolvimento de drogas remontam a história humana à seleção de tentativa e erro de produtos vegetais com propriedades benéficas (CHAPLAN *et al.*, 2010).

Numerosos métodos têm sido utilizados para adquirir os compostos para a descoberta de drogas, incluindo o isolamento a partir de plantas e outras fontes naturais, a química sintética, química combinatória e modelagem molecular (LEY e BAXENDALE, 2002, GEYSEN *et al.*, 2003 e LOMBARDINO e LOWE, 2004). Apesar do recente interesse em modelagem molecular, química combinatória, e outras técnicas de química sintética por empresas farmacêuticas e organizações de financiamento, produtos naturais de plantas medicinais continuam sendo uma importante fonte de novas drogas, novas pistas de drogas e novas entidades químicas (NEQ) (NEWMAN *et al.*, 2000, NEWMAN *et al.*, 2003 e BUTLER, 2004).

Histórias de sucesso iniciais na descoberta de novas drogas vieram de invenções na química medicinal, o que levou à necessidade de desenvolvimento de maior número de bibliotecas químicas através da química combinatória. Esta abordagem, no entanto, mostrou ser menos eficaz em termos de taxa de sucesso global. A segunda fonte de NEQ para uso potencial como moléculas de drogas tem sido os produtos naturais de origem vegetal. Existem vários exemplos de desenvolvimento de novos fármacos a partir das fontes vegetais (KATIYAH *et al.*, 2012), dentre os de maior impacto podem ser citados: o ácido acetilsalicílico (sintetizado em 1897 por Kolbe a partir da salicina, a substância ativa da *Salix Alba L.* – salgueiro -); as pílulas contraceptivas femininas (obtidas a partir de saponinas isoladas de cactus mexicanos *Dioscorea macrostachya* (DJERASSI, 1970); a morfina (um potente analgésico opióide isolado da *Papaver somniferum* por Setürner em 1806); a vincristina e a vinblastina (antineoplásicos obtidos da *Vinca rosea* (NOBLE, ET. al., 1958; JOHNSTON, et. al., 1986; ROWINSKY et. al., 1995)); e, ainda, a cocaína (*Erytroxylon coca*), a tubocurarina (*Chondodendron tomentosum*) e a atropina (*Atropa belladonna*), cujas descobertas permitiram à terapêutica atual o conhecimento dos anestésicos locais, bloqueadores neuromusculares e anticolinérgicos, respectivamente (SIMÕES, 2001). A biologia molecular tornou-se essencial para a descoberta

de medicamentos de plantas medicinais através da determinação e implementação de testes de rastreio adequados direcionados para alvos moleculares fisiologicamente relevantes.

De acordo com KATIYAH *et al.* (2012), o desenvolvimento da nova droga é um processo demorado, complexo e caro. O tempo gasto desde a descoberta de um novo medicamento para a sua tomada a clínica é de cerca de 12 anos, envolvendo mais de 1 bilhão de dólares de investimentos no contexto de hoje (**Figura 02**). Essencialmente, a descoberta de novas drogas envolve a identificação de novas entidades químicas (NEQ), tendo a característica necessária de “*druggability*” e química medicinal. Estas NEQ podem ser obtidas através de síntese química ou através de isolamento a partir de produtos naturais.

Muitas espécies de plantas são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança e dessa forma, considera-se esse um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (FOGLIO *et al.*, 2006).

Figura 02 – Processo de desenvolvimento de drogas (*drug-discovery*)



Fonte: ACRO, 2016

1.2.1 Potencial terapêutico de proteínas e peptídeos de plantas

Os produtos naturais constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e vêm sendo utilizados em muitas partes do mundo ao longo de décadas, despertando o interesse de vários pesquisadores (ARAÚJO e ONOFRE, 2011). Para se ter uma ideia, uma grande fração dos fármacos aprovados para consumo nos últimos 30 anos tem sua origem na natureza, principalmente nas áreas de câncer e doenças infecciosas onde mais de 60 % e 75 % destes fármacos, respectivamente, tem origem natural (Newman *et al.*, 2003; Newman e Cragg, 2012). Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Mais especificamente, a aplicação das proteínas e peptídeos, como moléculas terapêuticas, é de grande importância para o tratamento de várias doenças devido à alta especificidade e atividade que apresentam em concentrações relativamente pequenas, quando comparadas aos fármacos convencionais (WANG, 1999). Muitos trabalhos mostram o potencial dessas proteínas para serem aplicadas na saúde.

Estudos anteriores mostraram, por exemplo, que lectinas vegetais que possuem como açúcares ligantes *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e glucose-manose foram capazes de interferir em parâmetros importantes da resposta inflamatória como a infiltração neutrofílica e liberação de mediadores químicos (MATSUDA *et al.*, 1994; ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2009).

Outros trabalhos, já considerados clássicos, pela literatura, destacam o papel quimiopreventivo de inibidores de proteases em modelos de carcinogênese experimental, particularmente de moléculas capazes de inibir a quimiotripsina e enzimas *quimiotripsina-like*, tal como tem sido descrito para o inibidor de Bowman-Birk isolado a partir de sementes de soja (KENNEDY, 1998).

Dados da literatura também mostraram que proteínas do látex da planta *Calotropis procera*, apresentaram efeitos farmacológicos quando testadas em diferentes modelos experimentais justificando o seu uso medicinal para tais finalidades (SILVA *et al.*, 2010). Pereira *et al.* (2011) mostraram que as sementes de *Moringa oleifera* apresentam uma proteína ligante à quitina (*Mo*-CBP₄) capaz de inibir de forma significativa na dose de 10 mg/kg (via i.p. e também via oral) as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo experimental de dor inflamatória tradicionalmente utilizado como ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes analgésicos. Entretanto, apesar de trabalhos mostrarem o efeito promissor de proteínas com efeitos terapêuticos, uma parcela mínima

prolonga estudos que visem a aplicação real desses compostos ativos no mercado, por diferentes motivos e limitações.

Segundo HAMMOND E COCKBURN (2013), praticamente todas as proteínas são polímeros compostos por diferentes combinações e permutações dos mesmos 20 monômeros de aminoácidos comuns. Existem milhões de proteínas com estruturas e funções diversas encontrados na natureza e que são compostas de alguns ou de todos estes 20 aminoácidos. Aminoácidos, por sua vez, tem baixa toxicidade oral e são essenciais para a vida humana e nutrição. A massa molecular (MM) de proteínas pode variar de 10.000 (~ 50 aminoácidos) para mais de um milhão (> 3000 aminoácidos). As proteínas são ordens de magnitude maiores do que produtos químicos de baixa massa molecular, o que reduz sua absorção sistêmica potencial através das membranas celulares do trato gastro intestinal (GI). Proteínas ingeridas são submetidas à digestão de polipeptídeos, peptídeos, aminoácidos e pela ação combinada do baixo pH, da pepsina no estômago e várias outras proteases produzidas pelo o trato intestinal. A perda da estrutura quaternária e terciária da proteína durante a digestão resulta na perda da integridade estrutural e, geralmente, a perda da função bioquímica. As proteínas produzidas em células de mamíferos podem ter efeitos fisiológicos e farmacológicos importantes quando injetadas por via intravenosa para aplicações terapêuticas, mas estes efeitos não são geralmente aparentes quando estas proteínas são ingeridas devido à desnaturação e degradação rápida no trato GI. Já as moléculas de baixo peso molecular têm pesos moleculares que variam geralmente de cerca de 200-800 MW. A absorção no trato gastrointestinal (GI) varia dependendo das propriedades estruturais da molécula de baixo peso molecular. Por exemplo, a solubilidade em lipídeos pode aumentar significativamente a absorção sistêmica a partir do trato gastrointestinal.

Um estudo da absorção sistêmica de peptídeos (3 a 51 aminoácidos) mostrou que peptídeos maiores do que 10 aminoácidos de comprimento foram fracamente absorvidos intactos a partir do trato GI (ROBERTS, 1999). Outros relataram que a absorção gástrica está inversamente relacionada ao tamanho da molécula de modo que as pequenas são mais facilmente absorvidas do que as maiores (FRICKER e DREWE, 1996).

Uma série de estudos de alimentação animal com produtos derivados da biotecnologia tem investigado a digestibilidade e absorção sistêmica potencial de proteínas introduzidas intactas em vários tecidos e amostras de sangue usando ensaios imunológicos sensíveis (YONEMOCHI, 2002; ASH, 2003; CALSAMIGLIA *et al*, 2003; JENNINGS, 2003). Estes relatórios publicados confirmam que as proteínas, incluindo aquelas introduzidas em produtos derivados da biotecnologia, são digeridas e têm biodisponibilidade oral insignificante. Reconhece-se que, para proteínas estáveis à digestão, quantidades mínimas podem ser levadas

intactas por placas de Peyer que revestem o trato GI, ou podem passar através das células intestinais por meio de fagocitose ou permeação entre as junções de células epiteliais. Um exemplo é o alérgeno ovalbumina, que é estável à digestão em fluido gástrico simulado durante pelo menos 60 minutos. A maioria das proteínas vegetais comuns, em contraste, são digeríveis em menos de 15 segundos, em fluido gástrico simulado (HAMMOND e COCKBURN, 2013).

Como os peptídeos e proteínas são prontamente degradados dentro do corpo humano, que está equipado com aproximadamente 600 proteases diferentes (LOPEZ-OTIN e MATRISIAN, 2007), essa classe de bioquímicos não têm sido primeira escolha para o desenvolvimento de drogas, por ser considerada inferior a moléculas pequenas (metabólitos secundários). Apesar de tal negligência, uma série de avanços tecnológicos recentes tem suscitado grande interesse em seu uso, tanto como diagnóstico e como terapêutica. Em particular, os métodos analíticos modernos, facilitaram a descoberta e a identificação de novos peptídeos com potencial farmacêutico. Além disso, a química combinatória atual proporciona os meios para modificá-los e criar variantes completamente artificiais e alternativas. Em combinação com estudos avançados da biologia de peptídeos, (bio)tecnologias atuais têm o potencial para gerar um amplo espectro de drogas peptídicas eficazes e seguras (UHLIG *et al.*, 2014). Comparada com drogas típicas de pequenas moléculas que ainda dominam o mercado farmacêutico, peptídeos e proteínas são altamente seletivos por possuírem múltiplos pontos de contato com seu alvo. O fato de uma molécula ser mais seletiva, deve também resultar na diminuição dos possíveis efeitos colaterais e tóxicos gerados por sua administração (CRAIK *et al.*, 2013).

Há pouco mais de trinta anos a insulina humana recebeu a aprovação dos EUA (1982) como o primeiro fármaco à base de proteínas geneticamente manipuladas. Desde então, as drogas a base de proteínas tornaram-se uma força importante na indústria (bio)farmacêutica. Com base nas vendas mundiais, oito dos 20 principais produtos biofarmacêuticos em 2012, foram drogas à base de proteínas (CARROLL, 2012).

O mercado de drogas a base de peptídeos e proteínas é estimado em mais de US\$ 40 bilhões por ano, ou 10% do mercado farmacêutico. Esse mercado está crescendo muito mais rapidamente que o das pequenas moléculas e irá ter uma proporção ainda mais acentuada no futuro. Existem em torno de 100 peptídeos terapêuticos aprovados no mercado, com maioria sendo formada por menos de 20 aminoácidos (CRAIK *et al.*, 2013).

De acordo com LEADER *et al.* (2008), as proteínas terapêuticas podem ser divididas em grupos por função e aplicação. O grupo I se refere às proteínas terapêuticas com atividade enzimática ou reguladora, atuantes no tratamento distúrbios endócrinos e

metabólicos, terapias que aumentam as vias hematológicas e endócrinas e respostas imunes, tratamento de doenças com terapias com fator de crescimento e modificação na fisiopatologia de doenças humanas (insulina, fator VIII, antitrombina III, proteína C, interferon- α 2b). O grupo II abrange as proteínas terapêuticas com atividade em alvos especiais, como a ligação específica bloqueando moléculas ou organismos estimulando a destruição ou sinalização, entrega de compostos a um local específico (bevacizumabe, rituximabe). O grupo III abrange as vacinas de proteínas, geralmente proteínas recombinantes, atuantes no tratamento de doenças autoimunes, câncer, proteção contra agentes infecciosos (antígeno hepatite B, vacina HPV). O grupo IV está relacionado às proteínas como diagnósticos, que é uma classe que afeta poderosamente a tomada de decisões nas questões clínicas (glucagon, secretina, antígeno HIV).

O aumento do uso das proteínas terapêuticas na indústria farmacêutica tem salientado questões como a sua estabilidade durante o período de estocagem e a liberação eficaz de forma a evitar a ocorrência de efeitos adversos. Modificações químicas controladas tais como substituições, acilação e peguilação têm cumprido algumas, mas não todas as suas promessas, enquanto sistemas poliméricos podem desempenhar um papel importante (FROKJAER e OTZEN, 2005; SANTOS e FIALHO, 2007).

1.3 Testes de estabilidade e segurança farmacológica para futuros medicamentos

Nos últimos anos, o mercado de medicamentos tem apresentado expressivo crescimento. Segundo dados de 2014, apurados pelo Instituto Brasileiro de Planejamento e Tributação (IBPT), os laboratórios farmacêuticos faturaram R\$ 47,65 bilhões, para todos os canais de comercialização, inclusive exportações, excluídos os valores referentes aos descontos comerciais concedidos.

Estima-se que o mercado biofarmacêutico nacional movimente cerca de R\$ 15 bilhões por ano, incluídos nessa conta os anticorpos monoclonais terapêuticos, insulinas e diversos outros medicamentos biológicos importantes (IPDFARMA, 2015). Isto é compreensível, pois os produtos derivados da biotecnologia moderna têm mostrado surpreendente eficácia em doenças intratáveis pela terapia convencional, como câncer e doenças autoimunes (PFIZER, 2014). O valor desses fármacos é alto em função do alto conteúdo tecnológico envolvido no desenvolvimento e na produção, e é pensando nessa conta que existem várias iniciativas focadas na área. Porém, em se tratando especificamente dos biofármacos, o Brasil ainda representa apenas de 2 a 3% do mercado global desses medicamentos (IPDFARMA, 2015). Esse fato que deixa o país totalmente dependente de

biofármacos importados, movimentando cifras de R\$ 10 bilhões, sendo que aproximadamente 60% desse montante é desembolsado diretamente pelo Governo Federal.

Medicamentos biológicos ou biofármacos são produzidos ou extraídos de seres vivos por meio de processos biotecnológicos. São, em geral, proteínas, moléculas grandes, de alta complexidade e fundamentalmente muito diferentes das moléculas sintéticas, muito menores e mais simples. A molécula da aspirina, um medicamento tipicamente sintético, tem 21 átomos, enquanto que a molécula do Etanercepte, um medicamento biológico usado no tratamento da artrite reumatoide, por exemplo, tem mais de sete mil átomos (PFIZER, 2014). A **tabela 01** mostra alguns biofármacos já comercializados.

Os medicamentos sintéticos tradicionais são moléculas pequenas, bem conhecidas, sintetizadas a partir de precursores bem definidos e, por isso, facilmente reprodutíveis. Os biofármacos, ao contrário, são moléculas grandes, com milhares de átomos, em alguns casos com estrutura apenas parcialmente conhecida e, por consequência, são dificilmente reprodutíveis.

Tabela 01 – Alguns biofármacos comercializados.

Produtos		Indicação Principal	Princípio Ativo
Oncológicos	Bevacizumabe (Avastin®)	Câncer colorretal	Anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado
	Cetuximabe (Erbix®)	Câncer colorretal	Anticorpo IgG1 monoclonal quimérico
	Rituximabe (Rituxan®), Mabthera®)	Linfoma não-Hodgkin	Anticorpo monoclonal quimérico
	Trastuzumabe (Herceptin®)	Câncer de mama	Conjugado anticorpo-droga (CAD)
Imunológicos	Adalimumabe (Humira®)	Artrite reumatóide	Anticorpo monoclonal humano recombinante
	Infliximabe (Remicade®)	Artrite reumatóide	Anticorpo monoclonal IgG1 homem-murino quimérico
	Golimumabe (Simponi®)	Artrite reumatóide	Anticorpo monoclonal IgG1κ humano
	Natalizumabe (Tysabri®)	Esclerose múltipla	Anticorpo recombinante humanizado da anti-α4-integrina
	Omalizumabe (Xolair®)	Asma	Anticorpo monoclonal humanizado
Proteínas de Fusão	Etanercepte (Enbrel®)	Artrite reumatóide	Proteína de fusão do recetor p75 Fc do fator de necrose tumoral humano
	Abatacepte (Orencia®)	Artrite reumatóide	Proteína de fusão
	Alefacepte (Amevive®)	Psoríase	Proteína de fusão dimérica imunossupressora

Fonte: Pfizer – Manual de Medicamentos Biológicos e Biossimilares, 2014.

Com a finalidade de regular o uso de medicamentos por seres humanos, os diferentes países estabeleceram critérios mínimos de segurança para a liberação de uma nova droga no mercado. As agências reguladoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) na Europa, são responsáveis pela elaboração de normas técnicas e pela avaliação das novas solicitações de uso específico, pela fiscalização e acompanhamento do uso destes medicamentos dentro de suas indicações (GOLDIM, 2007).

Para que uma nova droga seja liberada para uso assistencial são exigidos inúmeros estudos que geram as informações necessárias para comprovar a sua segurança e eficácia. Os estudos podem ser classificados em duas etapas: pré-clínica e clínica, sendo a primeira realizada em modelos celulares e animais e a segunda em seres humanos (GOLDIM, 2007). O caminho para a autorização da comercialização tem muitos obstáculos e ao lado de eficácia e tolerabilidade, novas drogas candidatas têm de cumprir vários outros requisitos. Além da farmacodinâmica, farmacocinética, toxicidade, e questões de segurança, também fatores econômicos são vitais, incluindo produtividade, concorrência de mercado, propriedade intelectual, entre outros. É por isso que em um processo de desenvolvimento de drogas típico de hoje, mais de 90% dos candidatos a drogas não são colocados no mercado (UHLIG *et al*, 2014).

Em 1962 a FDA estabeleceu que antes do uso clínico ou da realização de propaganda de um novo medicamento, o fabricante deveria provar, não somente a sua eficácia, mas principalmente a sua segurança. De acordo com a Resolução Nº 251 em vigor do Conselho Nacional de Saúde (CNS, 07 DE AGOSTO DE 1997), a pesquisa pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos, como a caracterização bioquímica e biofísica e avaliação funcional de sua atividade em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os relatos dos estudos experimentais devem especificar o método utilizado, os modelos celulares, teciduais ou animais utilizados, os testes laboratoriais, os dados de farmacocinética e toxicologia. Os resultados pré-clínicos devem permitir demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso. A avaliação toxicológica pré-clínica de uma nova droga pode ser subdividida em quatro estágios, de acordo com o tempo de exposição: toxicidade aguda, de doses repetidas, sub-crônica e crônica. Esses ensaios são realizados com o objetivo de documentar informações de eficácia, segurança e características farmacológicas que antecedem a realização de testes clínicos com seres humanos.

A OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) é a organização mais respeitada ao propor guias mundialmente aceitos para verificar a segurança de determinada substância e outros usos relacionados com a proteção da saúde humana e do meio ambiente. As diretrizes da OECD são uma ferramenta única para avaliar os efeitos potenciais de produtos químicos na saúde humana e no ambiente. Aceito internacionalmente como métodos padrão para testes de segurança, as orientações são usadas por profissionais da indústria, academia e governo envolvidos na experimentação e avaliação de produtos químicos.

As macromoléculas, como as proteínas e polissacarídeos (açúcares complexos), são imunogênicas e podem desencadear resposta imune. As regiões de uma macromolécula onde estão os pontos de identificação são chamadas de epítomos. Uma macromolécula pode ter vários epítomos e a estrutura tridimensional da proteína, o dobramento da molécula sobre si mesma, pode expor ou ocultar epítomos. Os medicamentos biológicos, constituídos de macromoléculas são, por natureza, imunogênicos e é mandatória uma cuidadosa avaliação clínica da imunogenicidade durante o desenvolvimento destes produtos (PFIZER, 2014).

A monitorização da estabilidade dos medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante a validade. A segurança e a eficácia também podem ser avaliadas, através do monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica ou toxicidade (CARVALHO, 2005). Os estudos na fase de pré-formulação incluem a estabilidade no estado sólido do fármaco isolado e a estabilidade na presença dos excipientes. Estas etapas são realizadas para reduzir ou prevenir a ocorrência de deterioração devido à hidrólise, oxidação, entre outros processos (ANVISA, 2005; MAMEDE, 2006).

Para o procedimento dos ensaios de estabilidade, as indústrias farmacêuticas seguem a Resolução - RDC N° 45, de 09 de agosto de 2012 da ANVISA que define três estudos:

Estudo de Estabilidade Acelerada: estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, são usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

Estudo de Estabilidade de Longa Duração: estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.

Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: estudo realizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

O uso de métodos indicadores de estabilidade, seletivos aos princípios ativos e seus produtos de degradação, são altamente recomendados para acompanhamento de resultados provenientes de estudos de estabilidade de medicamentos (ANVISA, 2008). No entanto, poucos trabalhos existentes em farmacopeias incluem metodologias para análise de produtos de

degradação, e poucos fabricantes conhecem e desenvolvem metodologias validadas para detecção e quantificação desses produtos. Para o desenvolvimento e validação de metodologias indicativas de estabilidade, preconiza-se a realização de testes de estresse, para obtenção de padrões, para fim de análise (BAKSHI e SINGH, 2002; BOUDREAU *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Este teste mostra-se como uma tendência dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto (SILVA *et al.*, 2009). Demonstrando-se assim, que o conhecimento do comportamento químico pode ser usado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada (REYNOLDS *et al.*, 2002; AULTON, 2005).

Um dos principais objetivos a serem atingidos através desse teste é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação. Estes também fornecem informações sobre as rotas de degradação e dos produtos formados, que poderiam ser produzidos durante o período de armazenamento (REYNOLDS *et al.*, 2002).

O estudo de degradação forçada inclui os efeitos causados pela variação da temperatura, umidade quando apropriado, oxidação, fotólise e suscetibilidade à hidrólise por extensa variação dos valores de pH, que são condições típicas de degradação de fármacos. Vários estudos vêm sendo realizados para a obtenção de produtos de degradação de muitos fármacos utilizados na terapêutica, utilizando diferentes métodos de obtenção e identificação (KAPOOR *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2008; BEDSE *et al.*, 2009). Contudo, não existe um padrão na realização desses estudos. Apesar de existirem órgãos rigorosos fiscalizadores para comprovação da estabilidade e segurança de fármacos, eles entendem que cada estudo (molécula) possui suas particularidades, permitindo adaptações na condução das análises.

1.4 *Morinda citrifolia* L.

1.4.1 Visão geral

Noni é o nome comum de *Morinda citrifolia* L., também chamada de Indian mulberry, Ba Ji Tian, nono, fruta queijo e nhau dependendo da cultura de cada país e região (SCOT, 2003; WANG *et al.*, 2002). É uma árvore pequena, originária do Sudeste da Ásia, tendo sido difundida pelo homem através da Índia até as ilhas da Polinésia Francesa, onde a planta tem sido consumida há séculos para fins medicinais (WANG *et al.*, 2002; BUI *et al.*, 2006).

Morinda citrifolia L. é uma planta perene, de clima tropical e temperado, frequentemente cresce em áreas florestais e em regiões costeiras, com cerca de 400 metros acima do nível do mar (LUBECK e HANNES, 2001; McCLATHEY, 2002; WANG *et al.*, 2002). Segundo Correia *et al.* (2011), o cultivo do noni no Brasil é relatado nos Estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe, Ceará, dentre outros.

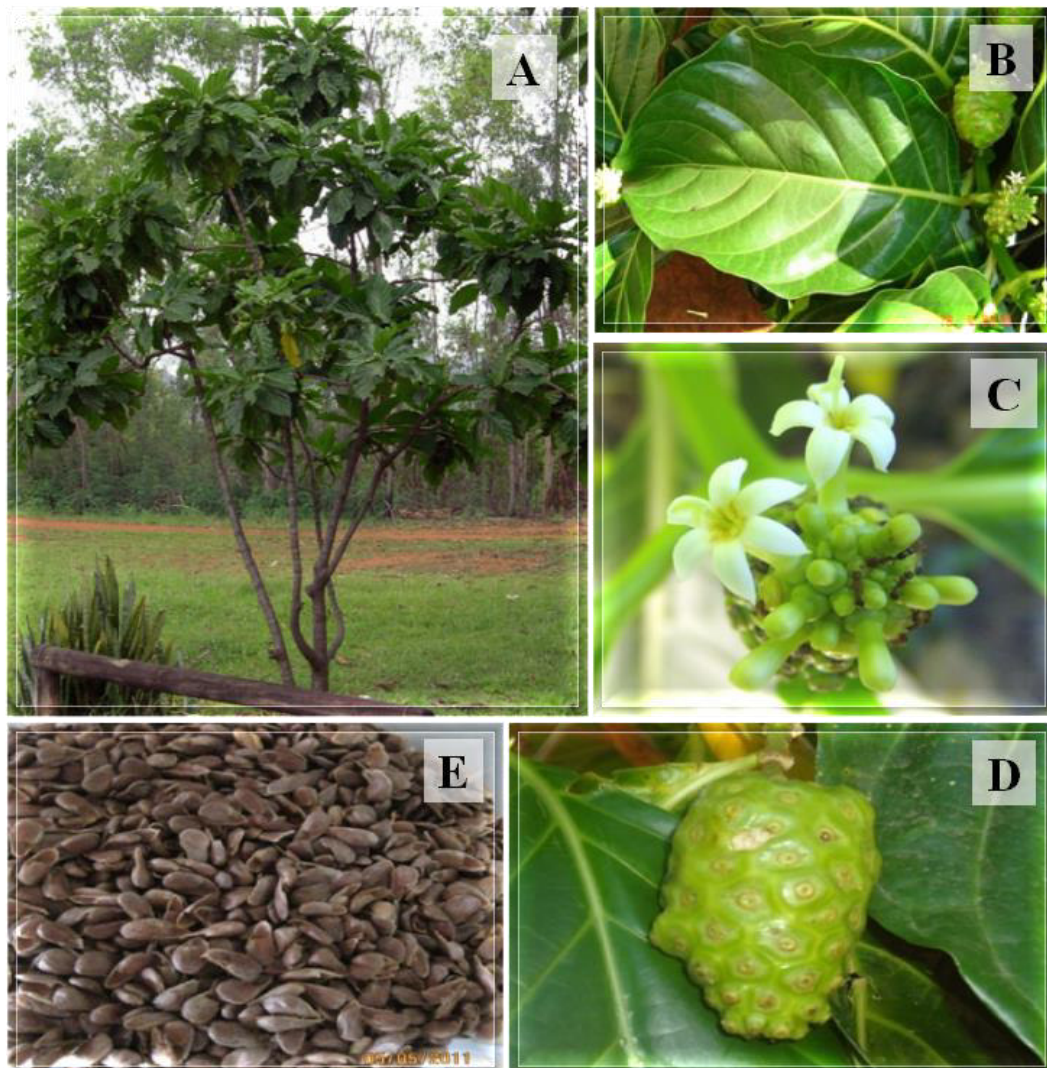
O noni tem um porte pequeno, arbustivo ou arbóreo, medindo geralmente cerca de 3 a 4 metros de altura, podendo chegar até 10 metros. Possui folhas grandes e elípticas, com 5-17 cm de comprimento e 10-40 cm de largura. Possui flores pequenas, tubulares e brancas, agrupadas e inseridas em pedúnculo (MORTON, 1992; ELKINS, 1998; ETKIN, 1999).

O fruto de *M. citrifolia* L. tem formato oval, com 4 a 10 cm de comprimento e 2 a 6 cm de largura. Sua cor é dependente do seu estágio de maturação: à medida que o fruto avança para o estágio final, sua cor varia de verde, passando por amarelo e finalmente apresentando um tom branco (McCLATHEY, 2002; WANG *et al.*, 2002). Sua polpa é carnosa, suculenta, de sabor e aroma desagradáveis, devido ao ácido butírico exalado por esse órgão (VEIGA *et al.*, 2005). Os frutos cultivados no Havaí apresentam, aproximadamente, 260 sementes por fruto (2,5% do peso seco dos frutos) e são necessários em torno de 10 kg de fruta para obter 250 g de sementes secas.

No Ceará, a EMBRAPA Agroindústria Tropical estabeleceu o cultivo de noni através da propagação assexuada, aquela que utiliza a semente. Em adição, trabalhos desenvolvidos pela empresa são realizados a fim de empregar tratamentos pré-germinativos para abreviar o tempo, aumentar e uniformizar a germinação das sementes de noni (SOUSA, 2010). Os frutos produzidos pela EMBRAPA no município de Trairí (Ceará) possuem o peso médio de 166 g, o comprimento médio de 101 mm e a largura média de 56 mm. O rendimento de polpa foi em torno de 80% e de sementes, 4%. Dessa forma, em um quilo de fruto, foram obtidos, aproximadamente, 40 g de sementes, com peso variando de 0,023 g até 0,044 g, ou

seja, com peso médio de 0,033 g por semente. Portanto, para cada quilo de fruto, foram obtidas em torno de 1.200 sementes (SOUSA, 2010). As sementes de *Morinda citrifolia* L. têm aproximadamente entre 4 e 9 mm de comprimento, possuem coloração marrom, com formato oblongo triangular, semelhante à semente de maçã (NELSON, 2005). O aspecto geral das principais partes de *Morinda citrifolia* L. é mostrado na **Figura 03**.

Figura 03 – Aspectos gerais das partes de *Morinda citrifolia* L.



(A) Visão geral da planta de *Morinda citrifolia* L., bem como de suas folhas (B), sementes (C), flores (D) Aspecto geral dos frutos. Fontes: Nelson, 2005; Reserthealth.com, 2012; Mountain-nsea.blogspot.com, 2012.

Nos últimos anos, tem sido verificado o crescente interesse e uso popular deste pequeno arbusto, pois têm sido difundidas informações sobre a sua capacidade de cura de diversas enfermidades, inclusive o câncer. Alguns desses estudos chegam a afirmar que o fruto alcança mais de 120 problemas de saúde que podem ser tratados, e até curados, com a planta e seus extratos (RODRIGUEZ, 2004). Experimentos *in vitro* e *in vivo* com o suco, extrato ou compostos isolados demonstram que o noni pode conferir benefícios à saúde por promover efeito antimicrobiano (JAYARAMAN *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2012; SAGHIRI *et al.*, 2013), atividade anticancerígena (LV *et al.*, 2011; NUALSANIT *et al.*, 2012), antioxidante (LIN *et al.*, 2013; MATSUDA *et al.*, 2013; KRISHNAIAH *et al.*, 2015), antifúngica (JAYARAMAN *et al.*, 2008; no sistema cardiovascular, antimicrobiana e anti-sepse (JAYARAMAN *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2012), anti-inflamatória (SU *et al.*, 2001; DUSSOSSOY *et al.*, 2011; PALU *et al.*, 2012, FLETCHER *et al.*, 2013), analgésica (YOUNOS *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 2002;).

A atividade anti-inflamatória atribuída não apenas ao suco, mas às outras partes do noni, tem sido associada à presença de compostos secundários, já isolados e identificados, não apenas no noni, mas também em outras plantas medicinais. Dentre os compostos já descobertos podemos citar: quercetina (presente nas sementes e no suco dos frutos; MASUDA *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2008), escopoletina (YU *et al.*, 2008; presente no suco dos frutos) e o ácido ursólico (presente em sementes e folhas; MASUDA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009).

Além do efeito anti-inflamatório, estudos já mostraram o potencial analgésico do noni. YOUNOS *et al.*, (1990) mostraram que o extrato aquoso da raiz do noni administrado pela via intraperitoneal (800 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções abdominais em camundongos. Esse efeito foi antagonizado por naloxona o que indicou um efeito central tipo morfínico.

Apesar dos efeitos farmacológicos relatados devido aos metabólitos secundários, muitos são os trabalhos que têm ressaltado que o consumo indiscriminado de produtos dessa espécie, sem o conhecimento prévio de seus princípios ativos e efeitos tóxicos pode ocasionar problemas graves de saúde.

Millonig *et al.* (2005) descreveram o primeiro caso de hepatotoxicidade relacionado ao consumo de suco de noni. Um homem de 45 anos foi encaminhado à Divisão Clínica de Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Médica de Insbruke, Áustria, por apresentar níveis elevados de transaminases. A anamnese conduzida revelou que o paciente não utilizava medicamentos e bebidas alcoólicas de forma regular e os exames conduzidos descartaram as prováveis causas patológicas do aumento das transaminases. Posteriormente, o paciente admitiu

que estava ingerindo diariamente, nas últimas semanas, um copo de suco de noni. O relato sugeriu uma reação de hepatotoxicidade por drogas, o que foi confirmado por uma biopsia hepática. O paciente interrompeu imediatamente o consumo do produto e em um mês os níveis de transaminases estavam normalizados.

Stadlbauer *et al.* (2005) relataram mais dois casos de hepatotoxicidade associados ao consumo de suco de noni. Um homem de 29 anos com histórico de hepatite aguda após tratamento de uma infecção respiratória com paracetamol foi readmitido após um ano com um quadro de insuficiência hepática aguda. O paciente relatou ter consumido 1,5 litros do suco Tahitian Noni® Juice (TNJ) nas três semanas anteriores, além de ter ingerido diariamente nos últimos nove dias cerca de sete gramas de uma mistura de ervas chinesas. Outras causas potenciais de insuficiência hepática foram descartadas e os autores classificaram como “possível” a relação de causalidade entre o consumo suco de noni e a doença hepática, segundo critério internacional de avaliação.

Moraes *et al.*, (2016) mostraram que o extrato aquoso dos frutos de *Morinda citrifolia*, a 5 e 10 mg/kg, predominantemente, induz hepatotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade no fígado, medula óssea e células de sangue periférico de ratos. Estes resultados sugerem efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos e instabilidade genética ativada por *M. citrifolia*, o que indica precauções quanto ao consumo de formulações de medicamentos ou preparações populares baseadas nessa substância.

Apesar de estudos acerca de moléculas com potencial terapêutico, os estudos com proteínas do noni ainda representam uma parcela mínima quando comparada a pequenas moléculas. Dessa forma, nosso laboratório iniciou a investigação bioquímica e farmacológica das proteínas das sementes visando identificar compostos bioativos promissores para o tratamento da inflamação e da dor.

1.4.2 McLTP₁: Morinda citrifolia Lipid Transfer Protein 1

De modo geral, as proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) são assim chamadas por conta da habilidade de se ligar e transportar moléculas hidrofóbicas (CARVALHO *et al.*, 2007). Estão em toda parte na natureza e geralmente envolvidas no papel genérico de transferência de lipídeos entre as membranas. Segundo Sels *et al.* (2008), várias LTPs estão localizadas na parede celular dos vegetais.

As LTPs de plantas são moléculas pequenas, de ponto isoelétrico básico (8 -10) e são codificadas por uma família multigênica (KIRUBAKARAN, 2008; CARVALHO & GOMES,

2007; KADER 1996). São divididas em dois grupos principais diferenciados pela massa molecular: LTP do tipo 1 com massa de 9 kDa e LTP do tipo 2 com massa molecular de 7 kDa (KALLA *et al.*, 1994). As LTPs do tipo 1, são compostas por aproximadamente 90-95 resíduos de aminoácidos, dos quais oito são cisteínas em posições conservadas ao longo da estrutura primária (EDSTAM *et al.*, 2011). Essas oito cisteínas estão ligadas entre si de modo a formar quatro pontes dissulfeto que auxiliam na estrutura terciária do peptídeo (HAN *et al.*, 2001 e SALCEDO *et al.*, 2007) conferindo estabilidade estrutural. O desenho estrutural de uma LTP de *Triticum aestivum* está representado pela **Figura 04**.

Figura 04 – Estrutura de uma LTP de *Triticum aestivum*.



Fonte: *The Protein Model Portal* (PMP, 2016).

Em plantas, foram propostas funções relacionadas principalmente com a defesa contra bactérias e fungos patogênicos, assim como a resposta ao estresse abiótico (KADER, 1996 e WANG *et al.*, 2012). A literatura mostra que as proteínas transferidoras de lipídeos são moléculas capazes de ativar o sistema de defesa de plantas e apresentam frequentemente atividades antimicrobianas *in vitro* (CRUZ *et al.*, 2010; CHEN, *et al.*, 2011).

Além disso, várias LTPs já foram identificadas como alérgenos vegetais (SALCEDO *et al.*, 2004). Tais peptídeos foram relatados em frutos da família Rosaceae, como pêssego, damasco e cereja; Vitaceae, como as uvas, bem como em outras espécies de plantas como *Asparagus officinalis*, *B. oleraceae* var. *capitata* e *Z. mays* (DÍAZ-PERALES *et al.*, 2002; PASTORELLO *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2003; PALACÍN *et al.*, 2006; VAN REE, 2002). As características físico-químicas estáveis das LTPs sugerem que estas mantêm seus motivos alergênicos e imunogênicos após a passagem pelo trato gastrointestinal, e pode interagir com o sistema imune epitelial para induzir sensibilização e sintomas sistêmicos (SALCEDO *et al.*, 2007).

Um trabalho publicado recentemente em nosso grupo de pesquisa (Campos *et al.*, 2016) relata o isolamento de *McLTP₁*, uma proteína transferidora de lipídeos do tipo 1 isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. Estruturalmente, essa proteína apresenta duas isoformas com massas de 9,45 e 9,46 kDa estimadas por espectrometria de massas e um rendimento de 6,12% do extrato proteico bruto. Os primeiros 33 resíduos aminoácidos obtidos de *McLTP₁* (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) mostraram similaridade com outras proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) de outras espécies (*Triticum aestivum*, *Aegilops tauschii* e *Vigna radiata*) incluindo quatro dos oito resíduos de cisteína conservados em outras LTPs.

Em relação às atividades terapêuticas, *McLTP₁* apresentou efeito nociceptivo dependente da dose quando administrada pela via intraperitoneal e oral, chegando a inibir em 81,39%, e 86,05%, respectivamente, o número de contorções abdominais utilizando o modelo do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético na dose de melhor efeito (8 mg/kg).

No modelo de nocicepção induzida por formalina, o pré-tratamento com a *McLTP₁* (8 mg/kg) por via intraperitoneal ou oral, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a fase neurogênica e a fase inflamatória, sendo as suas ações parcialmente revertidas após o tratamento com a naloxona, um antagonista de receptores opioides. A atividade biológica observada foi mantida mesmo após o aquecimento da proteína por 30 minutos a 80 °C e *McLTP₁* não foi digerida com a pepsina quando incubada em fluido gástrico simulado.

No teste do campo aberto foi verificado que *McLTP₁* não interferiu no desempenho motor dos animais, em relação ao controle. Campos (2013) mostrou que a proteína exibe atividade anti-edematogênica e foi capaz de inibir a migração leucocitária para a cavidade intraperitoneal, pelas duas vias de administração (i.p. e v.o.) utilizando modelos inflamatórios induzidos pela carragenina (Cg) em camundongos. Em todos os testes realizados para verificar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *McLTP₁*, o efeito foi observado também pela via oral, mostrando que a proteína é capaz de resistir às proteases naturais do trato gastrointestinal e atingir o sítio que desencadeia o efeito terapêutico, sem a necessidade de administração por outras vias menos interessantes, como a indovenosa.

Souza (2016) mostrou o efeito antimicrobiano *in vitro* sobre fungos, efeito antimicrobiano sobre bactérias e anti-sepse. O trabalho mostrou que além de inibir o crescimento do fungo do gênero *Candida*, foi capaz de potencializar o efeito do antibiótico anfotericina B. O efeito antibacteriano foi observado em bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus* spp. E, adicionalmente, ser capaz de reduzir a atividade de fatores de virulência bacterianos e de modular o efeito do antibiótico oxacilina. Em tratamentos profiláticos e terapêuticos na dose de 8 mg/kg por ambas as vias intraperitoneal e oral, *McLTP₁* aumentou a sobrevivência dos animais com sepse.

Em contrapartida, Lutif (2015) realizou alinhamentos com a sequência N-terminal de *McLTP₁* que mostrou similaridade com alérgenos de trigo, amendoim e kiwi. De fato, LTPs fazem parte de um grupo de alérgenos significativos (BUHLER *et al*, 2015) por serem capazes de ultrapassar o trato gastro intestinal pelo fato de sua estrutura compacta conferir elevada resistência ao calor, desnaturação (GAIER *et al*, 2008; SANCHO *et al*, 2005; SCHEURER *et al.*, 2004) e digestão proteolítica (ASERO *et al*, 2001; CAVATORTA *et al.*, 2010), que auxiliam na manutenção da capacidade alergênica após a ser absorvida (RAMAZZINA *et al.*, 2012).

Diante dos efeitos promissores relatados para *McLTP₁* pela via oral e da busca por novas moléculas bioativas contra a dor e a inflamação, a proteína torna-se um forte candidato a um futuro biofármaco. Entretanto, há evidências experimentais que apontam para reações adversas e, por isso, além de testes que comprovem a estabilidade de *McLTP₁*, são necessários testes de toxicidade que sugiram a segurança pré-clínica dessa proteína.

Sendo assim, as perguntas subsequentes guiaram o desenvolvimento dessa dissertação:

- Considerando que *McLTP₁* apresenta efeito antinociceptivo e anti-inflamatório promissores, essa proteína se mantém íntegra sem que haja mudanças em sua estrutura e perda de efeito após ser submetida a condições de armazenamento?
- A administração oral de *McLTP₁* promove toxicidade *in vivo* e *in vitro*?
- Após ser administrada pela via oral, *McLTP₁* é absorvida e disponibilizada na circulação?
- Por quanto tempo o efeito antinociceptivo de *McLTP₁* é observado?

Diante de tais perguntas, elaborou-se a seguinte hipótese:

“*McLTP₁* mantém sua estrutura e atividade biológica estáveis mesmo após ser armazenada em diferentes condições e não apresenta toxicidade *in vitro* e *in vivo*, dando bases para comprovação de sua segurança farmacológica”

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar a estabilidade de *McLTP*₁ em diferentes condições de armazenamento, realizar testes de toxicidade pré-clínica em camundongos e correlacionar a manutenção do efeito terapêutico após a absorção da proteína.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar testes de avaliação da estabilidade (estrutural e de atividade biológica) da proteína isolada e armazenada por até seis meses em diferentes temperaturas.
- Determinar por qual período a atividade antinociceptiva se mantém em camundongos.
- Verificar, por imunodeteção, a presença de *McLTP*₁ na circulação de camundongos após administração oral.
- Avaliar, segundo os protocolos estabelecidos pela OECD, a toxicidade de *McLTP*₁ em dose única e doses repetidas em camundongos.
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de *McLTP*₁.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

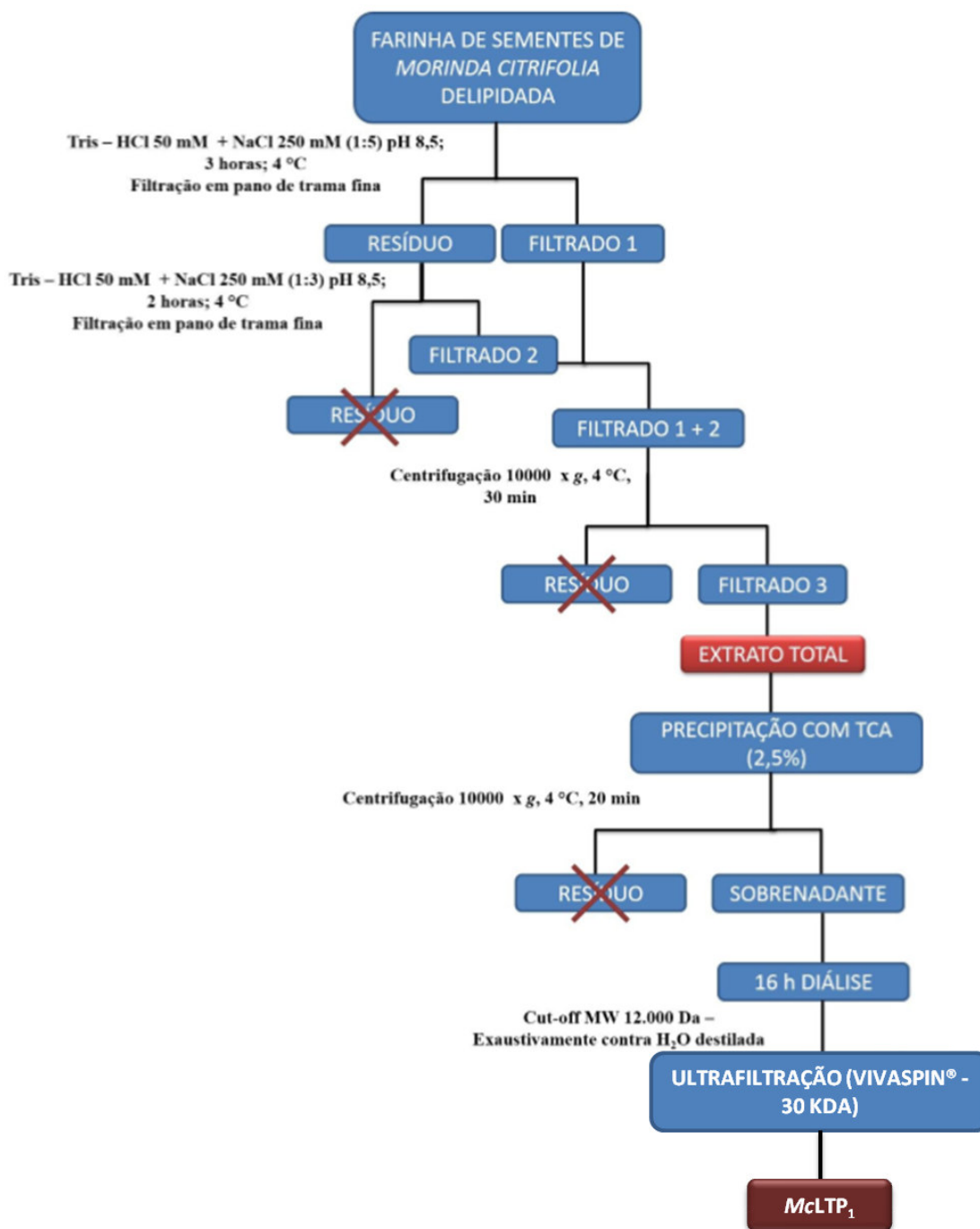
As sementes de *Morinda citrifolia* L. foram doadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT-EMBRAPA), Fortaleza – Ceará. O plantio da espécie está localizado na Fazenda Antônio Alberto (latitude: 3°19'54.59"S/longitude: 39°18'50.89"O), no município do Trairi - Ceará. As sementes foram utilizadas para a produção de uma farinha fina em liquidificador e moinho elétrico de café. A farinha foi tratada com éter de petróleo (1:10 (m/v)), à temperatura ambiente, para a completa remoção dos lipídeos e posteriormente, armazenadas à 4 °C até sua utilização.

3.2 Isolamento de *McLTP*₁

*McLTP*₁ foi purificada de acordo com a metodologia descrita por Campos *et al.* (2016) com as modificações introduzidas por Souza (2016). Para obtenção do extrato total, a farinha delipidada das sementes de noni foi suspensa em tampão de extração Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, contendo NaCl 250 mM na proporção de 1:5 (m/v). A suspensão foi mantida sob contínua agitação por 3 horas (4 °C) e após esse intervalo foi filtrada em pano de trama fina. O material retido no tecido de filtração foi ressuspensionado no tampão de extração na proporção de 1:3 (m/v) e re-extraído por 2 horas sob as mesmas condições sendo, em seguida, filtrado. Os filtrados foram combinados e centrifugados a 10.000 x g (30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976). O extrato obtido foi posto em contato com ácido tricloroacético (TCA) 2,5 %, sob agitação, à temperatura ambiente e armazenado a -20 °C por 30 minutos para precipitação das proteínas. O material foi centrifugado a 10.000 x g (30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante submetido a uma diálise exaustiva contra água destilada (*cut-off* 3 kDa), a 4 °C, sob agitação moderada.

Amostras (14 mL) da fração solúvel em TCA 2,5 % foram submetidas à ultrafiltração (Vivaspin®/cut off 30 kDa) a 8.000 x g (30 minutos, 4 °C), sendo liofilizadas para análise de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). *McLTP*₁ liofilizada foi utilizada nas demais etapas desse trabalho para avaliar sua estabilidade e toxicidade em camundongos. O esquema de purificação de *McLTP*₁ está representado na **figura 05**.

Figura 05 – Esquema de isolamento de *McLTP₁* a partir de sementes de *Morinda citrifolia* L.



3.3 Bloco 01 – Avaliação da estabilidade de *McLTP*₁

3.3.1 *Delineamento experimental*

A estabilidade de *McLTP*₁ foi avaliada a partir do delineamento de um protocolo experimental tomando como base orientações e diretrizes da *Food and Drug Administration* (FDA, 2008), *European Medicines Agency* (EMA, 1995, 2003), de reconhecimento internacional, e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005), reconhecida nacionalmente. Em linhas gerais, os protocolos objetivaram analisar a estabilidade da proteína em estudo, frente a possíveis alterações estruturais e de efeito biológico, quando armazenada em diferentes temperaturas e tempos. Os testes levaram em consideração condições variadas de temperatura e luminosidade, bem como características intrínsecas do produto (da proteína purificada), não sendo comparados aspectos gerais de embalagem. Neste trabalho, *McLTP*₁ liofilizada foi considerada como produto de partida, sendo obtida a partir de três partidas de purificação, as quais foram consideradas como lotes.

Amostras de *McLTP*₁ liofilizada foram utilizadas como materiais de partida, sendo armazenadas quantidades iguais de proteínas (100 mg) em frascos de vidro de penicilina hermeticamente fechados. Foram utilizados materiais provenientes de três partidas de purificação, consideradas como lotes. Cada amostra foi armazenada por 1, 3 e 6 meses nas temperaturas de 25 °C (estudo acelerado), 4 °C (*real time*) e -20 °C (*long-term*), quando comparada à proteína não-armazenada (T0 - tempo zero). Um teste para verificar a influência da incidência de luz sobre a amostra foi realizado armazenando-se a mesma quantidade citada para as condições anteriores por 1 mês a 25 °C sem proteção do frasco contra a luz. Após atingir o período de estocagem, a proteína (amostras armazenadas em cada condição) foi solubilizada em água ultrapura livre de pirógenos (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25°C) autoclavada de modo a perfazer a concentração de 1 mgP/mL e foram avaliados parâmetros como aparência (cor e aspectos gerais), solubilidade, quantificação de proteínas, perfil eletroforético, estrutura secundária e potência farmacológica pela via oral. Os resultados obtidos foram comparados entre si e com a proteína não-armazenada.

3.3.2 Aparência, solubilidade e quantificação de proteínas

A aparência da proteína submetida a diferentes condições de armazenamento foi avaliada de forma qualitativa através da análise de imagens fotográficas obtidas nas mesmas condições de luminosidade. *McLTP₁* liofilizada e em solução (1mg/mL) foi utilizada para análise de aparência. Para avaliar a solubilidade da *McLTP₁* nas diferentes condições de armazenamento, as soluções reconstituídas da proteína (1 mg/mL) foram submetidas à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 280 nm. O valor da absorbância foi utilizado para cálculo da concentração de proteína solúvel através do uso do coeficiente de extinção molar de *McLTP₁* ($\epsilon = 12,85$). Após a leitura inicial, as soluções da proteína foram armazenadas em microtubos por 24 horas e, então, centrifugadas a 1000 rpm, por 1 minuto, sendo novamente realizada a quantificação das proteínas solúveis por absorbância em 280 nm (HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; McCLEMENTS, 2006). A concentração de proteínas foi também estimada em amostras imediatamente reconstituídas utilizando o método de Bradford (1976). Todas as análises foram feitas em triplicata para os lotes de proteína armazenados.

3.3.3 Perfil eletroforético e análise densitométrica

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) 15% de *McLTP₁* armazenada nas diferentes condições foi realizada em condições desnaturantes e não- redutoras seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970) e utilizando soluções (2:1) de *McLTP₁* preparadas com tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 contendo 4,0 % de SDS, 20 % de glicerol e 0,02 % de azul de bromofenol). As bandas proteicas foram reveladas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Após a inspeção visual, análises semi-quantitativas foram realizadas por varrimento densitométrico dos géis de poliacrilamida para verificar existência de mudanças que indicassem degradação proteica. Os géis foram escaneados e a quantificação da intensidade média das bandas de interesse foram analisadas utilizando o software de análise de imagem de eletroforese GelAnalyser 2010a. Os perfis obtidos foram comparados entre si e com a proteína não-armazenada.

3.3.4 Determinação dos espectros de dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular de *McLTP*₁ foi obtido em espectropolarímetro JASCO J-815 utilizando comprimentos de onda de 190 - 260 nm. A proteína (0,06 mg/mL) obtida das diferentes condições de armazenamento citadas anteriormente foi solubilizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 e colocada em cubeta de quartzo retangular com 0,1 cm de passo óptico. Todas as medidas foram realizadas com 3 scans sucessivos, com velocidade de varredura de 50 nm/min e tempo de resposta de 2 segundos, cuja média foi utilizada para análise. No intuito de quantificar os elementos de estrutura secundária de *McLTP*₁ submetida às diferentes condições de armazenamento foi utilizado o software K2D3 server (Louis-Jeune, 2012).

3.3.5 Potência de efeito farmacológico

3.3.5.1 Animais experimentais

As atividades foram realizadas utilizando camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas nulíparas não-grávidas, com massa corpórea variando entre 25 e 30 gramas fornecidos pelo Biotério Central da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, receberam água e ração *ad libitum* e foram aclimatados a 25 ± 2 °C, com média de 65% de umidade relativa, em ciclo claro/escuro de 12 horas antes da realização dos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados através da inalação por halotano. As carcaças dos animais foram coletadas (após agendamento) pela empresa 13 Engenium (<http://www.engenium.com.br>) sendo, por fim, incineradas. Os experimentos foram realizados em conformidade com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONCEA, 2013), e submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (CEUA – UFC n. 37/13).

3.3.5.2 Atividade antinociceptiva

A potência de efeito farmacológico de *McLTP*₁ armazenada em diferentes condições foi avaliada utilizando o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos seguindo a metodologia de Collier *et al.* (1968) que consiste em observar contorções abdominais, acompanhadas por extensão dos membros inferiores 20 minutos após injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 1,0%. O teste foi realizado com camundongos machos separados em grupos (n=6/grupo), sendo um grupo controle tratado pela via oral com NaCl 150 mM e dez grupos experimentais que receberam, pela via oral: *McLTP*₁ 8 mg/kg não-armazenada e armazenada por 1, 3 e 6 meses nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C. Trinta minutos após a administração de NaCl 150 mM e uma hora após a administração de *McLTP*₁ as contorções abdominais foram induzidas através da administração do ácido acético 1% (0,1 mL/10 g de massa corpórea, via i.p) e as contorções foram imediatamente contadas durante 20 minutos acompanhadas por extensão dos membros inferiores. Posteriormente, os animais foram sacrificados por inalação com halotano. Os dados experimentais obtidos foram expressos como a média do número de contorções abdominais ± desvio padrão de 6 animais e o grau de inibição foi expresso pela diferença verificada entre a resposta obtida nas doses de *McLTP*₁ e o grupo controle, sendo esses valores mostrados em termos percentuais.

3.4 Bloco 02 – Avaliação da biodisponibilidade, acompanhamento do efeito farmacológico e toxicidade de *McLTP*₁

3.4.1 Avaliação da biodisponibilidade de *McLTP*₁ por imunodeteção

Para avaliação da biodisponibilidade após a administração oral, camundongos machos de massa corporal entre 25 e 30 g foram tratados (n=30, no total) com *McLTP*₁ 8 mg/kg. Após a administração, foram coletadas em tubos do tipo eppendorf amostras de sangue (50 µL) do plexo retro-orbital nos tempos de 0, 2, 4, 8 e 12 h. Antes das coletas os animais foram submetidos a anestesia oftálmica tópica (gotas de tetracaína) de modo a evitar sofrimento e complicações associadas ao procedimento. Com o objetivo de evitar coletas repetidas no mesmo animal, foram utilizados 06 animais para cada intervalo de tempo determinado.

Após a coleta as amostras de sangue foram deixadas em geladeira (4 °C) por 3 a 4 h até a completa coagulação e contração do coágulo, de modo a se obter uma amostra de soro. Para a separação do soro, o material (sangue coagulado) foi centrifugado por 5 min, 3.000 x g e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C em tubos de microcentrífuga até a realização dos imunoenaios.

A imunodeteção de *McLTP*₁ no soro de camundongos foi realizada através da utilização do método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto segundo a metodologia descrita por Madruga *et al.* (2001) utilizando anticorpos policlonais anti-*McLTP*₁ produzidos em coelho de acordo com Lutif (2015). Para tanto, as placas de microtitulação (placas de EIA Costar 9018; Corning, Cambridge, MA, EUA) foram revestidas em triplicata com 150 µL de amostras de soro reunidas e diluídas 4x em tampão antígeno (NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6) a 4 °C durante 20 h. Foram utilizadas amostras de soro de todos os tempos testados. Após o bloqueio dos locais de ligação livres com leite desnatado 5% solubilizado em tampão PBS (KH₂PO₄ 3 mM, K₂HPO₄ 7 mM e NaCl 500 M, pH 7,3) a 37 °C por 3 h, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, foram adicionados 150 µl do anticorpo primário (anti-*McLTP*₁ produzidos em coelho) diluído na proporção de 1:1000 (diluição produzida a partir de uma solução de 1 mg/mL de anti-*McLTP*₁) e a placa foi incubada durante 2 h a 37 °C. Após sucessivas lavagens com tampão PBS, 150 µL de anticorpo IgG de coelho conjugado com peroxidase produzido em cabra (1 µl/16 µl de tampão PBS; Sigma; A1949) foram adicionados e incubados durante 2 h a 37 °C. Lavada a placa novamente, 150 µL da solução de substrato 4-nitrofenilfosfato de sódio (pNPP) contendo Na₂CO₃ 0,05 M, NaHCO₃ 0,05 M e MgCl₂ 0,01 M foram adicionados e a placa incubada

durante 30 min a 25 ° C no escuro. A densidade óptica foi determinada a 450 nm com um leitor de placas de microtitulação (ELX800; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Diluições em série com *McLTP*₁ pura (0,625 – 20 µg) foram feitas com o tampão de ensaio para produzir a curva de calibração. A concentração de *McLTP*₁ no soro dos animais foi expressa como µg/µL.

3.4.2 Acompanhamento do efeito antinociceptivo

No intuito de verificar o comportamento da atividade biológica em relação ao tempo após a administração de *McLTP*₁, foi realizado o ensaio da cinética de decaimento utilizando a atividade antinociceptiva como parâmetro. Para isso, a atividade antinociceptiva foi realizada seguindo a metodologia de Collier *et al.* (1968), assim com descrito anteriormente. Os animais foram divididos em grupo de 06 e após a administração de *McLTP*₁ na dose de 8 mg/kg pela via oral foi contado o número de contorções abdominais após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. Os dados experimentais obtidos foram expressos como a média do número de contorções abdominais ± desvio padrão de 06 animais e o grau de inibição foi expresso pela diferença verificada entre a resposta obtida nas doses de *McLTP*₁ e o grupo controle, sendo esses valores mostrados em termos percentuais.

3.4.3 Toxicidade oral em dose única

O teste de toxicidade em dose única foi delineado de acordo com o Guideline 423 (2001) da OECD. Para tanto, o estudo foi realizado com fêmeas nulíparas e não-grávidas com massa corporal variando entre 25 e 30 g. Três fêmeas foram tratadas por gavagem única vez com o veículo (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 contendo NaCl 0,15M) ou com *McLTP*₁ na dose de 8 ou 80 mg/kg de animal. Antes da administração do veículo ou da dose-teste, os animais foram deixados em jejum por um período de 3 – 4 h e a ração foi disponibilizada apenas 1 – 2 h depois da gavagem. Após a administração, os animais foram observados durante os primeiros 30 minutos e periodicamente pelas próximas 24h, com uma atenção especial para as primeiras 4 h. O período de observação se estendeu por 14 dias, sendo registradas as massas corporais dos animais em dias alternados e possíveis sinais de toxicidade como tremores, convulsões, mudanças no pelo e nos olhos, diarreia, letargia, sono e coma. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por inalação com halotano e submetidos à necropsia visando identificar alterações macroscópicas em órgãos internos.

3.4.4 Toxicidade oral em doses repetidas

Para o teste de toxicidade oral em doses repetidas (OECD Guideline 407, 2008), foram utilizados 10 animais com massa corporal entre 25 e 30 g, sendo 5 machos e 5 fêmeas, mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente. Os animais foram tratados por gavagem diariamente por 28 dias com *McLTP*₁ na dose de 8 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Tris-HCl 0,050 M, pH 8,5 contendo NaCl 0,15 M) e os animais foram observados diariamente (pelo menos uma vez) para detecção de sinais de toxicidade, morbidade e mortalidade. Ao longo do experimento, os animais foram pesados e avaliados quanto ao consumo de água e ração a cada 2 dias. No vigésimo oitavo dia, os animais foram anestesiados para retirada de sangue (submetido a análises bioquímicas e hematológicas) sendo em seguida, eutanasiados através de perfuração no diafragma. Além de sangue, foram também retirados o fígado, rins, pulmões, pâncreas, estômago, coração e intestino os quais foram analisados quanto à presença de alterações macroscópicas, pesados para determinação do seu peso fresco relativo e submetidos a análises histopatológicas.

3.4.4.1 Análise hematológica

Amostras de sangue foram coletadas em diferentes tubos com o anticoagulante heparina. As análises hematológicas foram feitas usando um analisador automático hematológico (scil Animal Care Company, Gurnee, IL, USA) dos seguintes parâmetros: leucócitos, eritrócitos, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), contagem de plaquetas (PLT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

3.4.4.2 Análise bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas em diferentes tubos sem o anticoagulante e foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos para separação do soro. Os parâmetros clínicos mensurados incluem: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (AP), glicemia (GLI), creatinina (CRE), proteína total (PRO), ácido úrico (UAC); colesterol (COL) e triglicerídeos totais (TRI).

3.4.4.3 Avaliação macroscópica dos órgãos

Órgãos vitais incluindo rins, coração, pâncreas, fígado, intestino, pulmões e estômago foram pesados individualmente e o peso relativo de cada órgão foi calculado e estimado em g/10g. Os estômagos foram lavados e examinados por um observador que desconhecia o protocolo de tratamento para verificar possíveis lesões macroscópicas da mucosa.

3.4.4.4 Hispatologia

Dois animais de cada grupo de tratamento foram escolhidos aleatoriamente para análise histológica. Órgãos vitais extraídos dos animais experimentais e fixados em folmol-salina (10%) foram desidratados em etanol puro, embebidos em parafina e cortados em seções de 4-5 μm de espessura. Hematoxilina-eosina foi utilizada para corar os órgãos cortados para as avaliações fotomicroscópicas. As visualizações das lâminas histológicas foram feitas com lente objetiva com aumento de 200x.

3.4.5 Citotoxicidade de *McLTP*₁ utilizando o teste do MTT

A análise da citotoxicidade de *McLTP*₁ foi realizada em parceria com o Laboratório de Genética coordenado pelo Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani da Universidade Estadual de Londrina. O ensaio foi realizado utilizando o teste do MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] foi baseado no protocolo descrito pela primeira vez por Mossmann (1983). Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3A) adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro, livre de micoplasma. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Life Technologies), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Life Technologies) e mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Neste procedimento, cada poço (placa de 96 poços) foi semeado com 10⁴ células e as concentrações de *McLTP*₁ testadas foram de 20, 40, 80, 160, 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essas concentrações foram baseadas nas doses usadas nos testes de toxicidade em dose única e doses repetidas, extrapolando-se exponencialmente duas concentrações acima e duas abaixo da concentração de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 μL de MTT (0,167 mg/mL) em

cada poço. As células foram incubadas a 37 °C por 4 horas. Em seguida, a solução de MTT foi retirada por completo dos poços e foram adicionados 200 µL de DMSO/poço para diluir os cristais de formazan e cada amostra da placa de 96 poços foi utilizada para realizar a leitura em espectrofotômetro de leitor de placa a 540 nm. De cada concentração testada, foi verificada a viabilidade celular e comparadas ao grupo controle.

3.5 Análise estatística

Neste trabalho os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão da média. Para comparação das médias aritméticas, empregaram-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, usando o software Prisma 4.0 (GraphPad). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Nos ensaios *in vitro* a análise estatística foi realizada por Teste de Dunnett ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

BLOCO 01 - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE *McLTP*₁

Aparência, Solubilidade e Quantificação de Proteínas

Tomando como base protocolos mundialmente (FDA e EMEA) e nacionalmente (ANVISA) reconhecidos, o estudo da estabilidade da *McLTP*₁ foi conduzido. Para isso, amostras de cem miligramas de um mesmo lote da proteína liofilizada foram armazenadas durante os períodos de 1, 3 e 6 meses (T1, T3 e T6, respectivamente). Para todos os períodos de armazenamento, a proteína foi testada em diferentes temperaturas: -20 °C, 4 °C e 25 °C. Todas as condições de armazenamento avaliadas foram comparadas com amostras da proteína não-armazenada (tempo zero, T0).

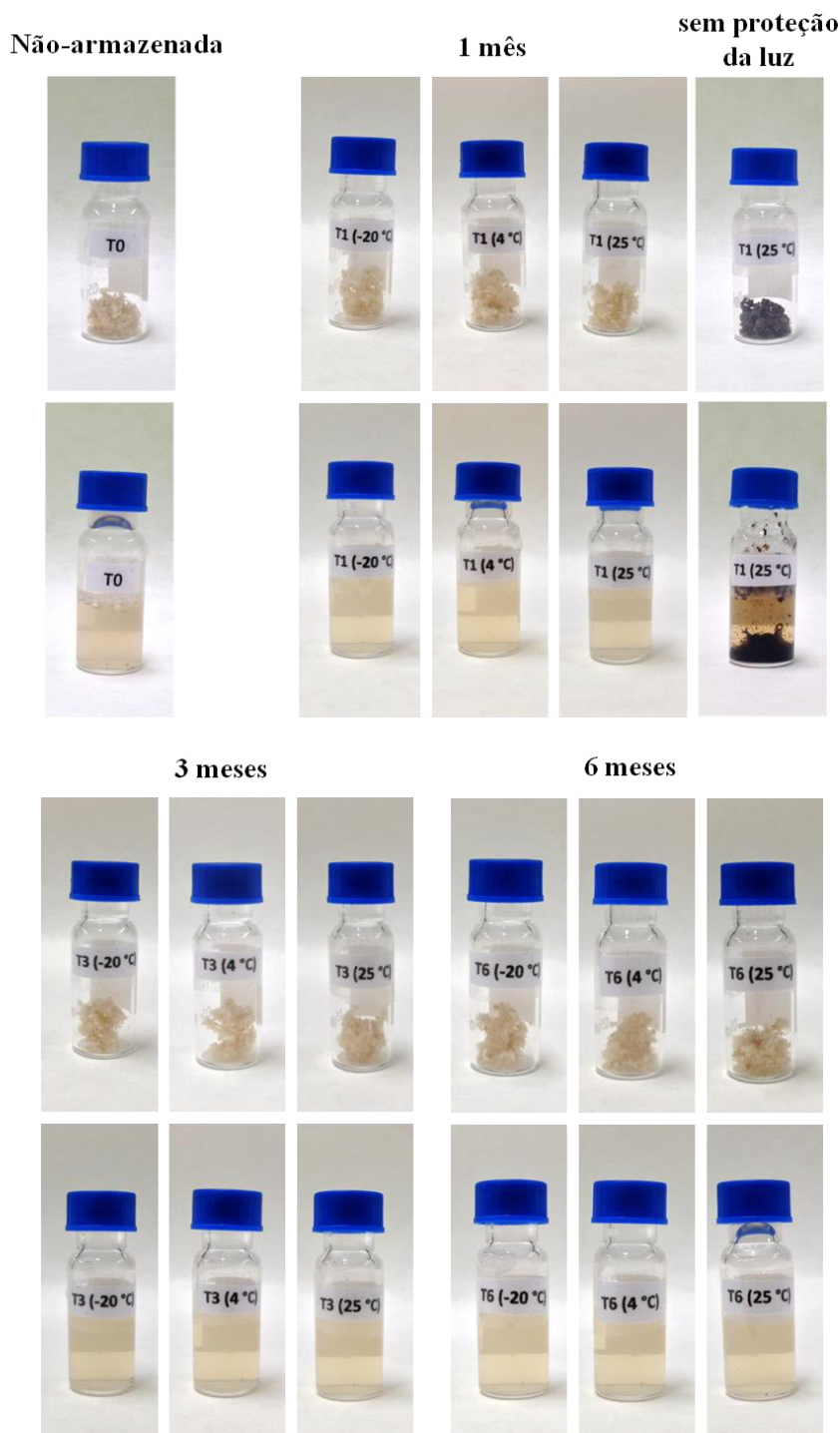
Primeiramente, foi avaliada a cor da proteína liofilizada nas diferentes condições de armazenamento. Foi observado que em todas as condições de armazenamento com proteção contra incidência de luz, a proteína manteve a mesma coloração observada para a proteína não armazenada. A manutenção da cor foi observada em todos os tempos e temperaturas de armazenamento mesmo após os seis meses de estocagem. Após a reconstituição em água destilada de modo a perfazer soluções de 1 mgP/mL, *McLTP*₁ manteve também o mesmo aspecto (cor), quando comparada à proteína não armazenada. A manutenção da cor foi observada para todos os tempos e temperaturas de armazenamento.

Diferentemente do observado para a proteína protegida da luz, quando *McLTP*₁ foi armazenada sem proteção de incidência luminosa, houve um escurecimento no material liofilizado, já no primeiro mês de armazenamento, para a temperatura de 25 °C.

Considerando o parâmetro solubilidade (ou suspendabilidade), observou-se que *McLTP*₁ foi facilmente reconstituída em água destilada em todas as condições de armazenamento citadas, não sendo observados aspectos como agregados proteicos ou precipitação de proteínas após a reconstituição. A dissolução de proteína foi imediata, sendo produzidas soluções homogêneas e sem partículas em suspensão. Embora não tenham sido avaliados aspectos relativos à contaminação microbiológica, em exame macroscópico não foram observados sinais da presença de fungos ou deterioração do material. A **figura 06** traz imagens da proteína não armazenada e armazenada nas diferentes condições, com e sem proteção da luz. As soluções de 1 mg/mL de *McLTP*₁

foram também apresentadas para demonstrar o aspecto geral do material obtido, após a reconstituição.

Figura 06 – Aparência de *McLTP*₁ liofilizada não-armazenada e armazenada pelos períodos de 1, 3 e 6 meses em diferentes condições.



As imagens mostram a avaliação da aparência de *McLTP*₁ armazenada por 1, 3 e 6 meses nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C, respectivamente, protegidas ou não da incidência de luz. As imagens superiores mostram o aspecto da proteína liofilizada e as inferiores mostram o aspecto da proteína nas condições citadas após a reconstituição em H₂O destilada de modo a perfazer 1 mgP/mL.

Utilizando o coeficiente de extinção, anteriormente determinado para *McLTP*₁ ($\epsilon = 12,85 \text{ (mg.mL.cm)}^{-1}$) foi possível calcular o teor de proteínas solúveis em mg/mL com base na absorbância em 280 nm. A **tabela 02** mostra que as soluções de 1 mg/mL de *McLTP*₁ apresentaram, de fato, a concentração de proteína esperada, não sendo observadas diferenças significativas nas concentrações obtidas, para todos os tempos e temperaturas de armazenamento. Entretanto, para a proteína estocada por um mês na temperatura de 25 °C sem proteção da luz, houve um aumento na absorbância em 280 nm, desviando o cálculo da quantidade de proteínas para valores significativamente maiores do que aqueles observados para a proteína não-armazenada.

Quando as soluções de proteína foram mantidas em repouso, por 24h, e submetidas novamente à quantificação de proteínas tal como descrito, observou-se que no tempo zero, houve uma redução de 12% na quantidade de proteína solúvel. Entretanto, essa redução não foi significativa ($p > 0,05$, teste de Tukey). As concentrações de proteína de *McLTP*₁ armazenada nas condições citadas anteriormente com proteção da luz após 24h da reconstituição, não foram significativamente diferentes daqueles obtidos para o tempo zero também mantido em repouso por 24 h ($p > 0,05$, Teste de Tukey). Todavia, na condição testada sem proteção da luz foi observada redução significativa no teor de proteínas determinado 24h após a reconstituição de 39,09% (**Tabela 02**). Utilizando como parâmetro a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), as alterações observadas para *McLTP*₁ imediatamente reconstituída seguiram o mesmo padrão (**Tabela 03**).

Tabela 02 – Teores de *McLTP*₁ solúvel em água após o armazenamento por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.

Tempo de armazenamento (meses)	Temperatura de armazenamento	<i>McLTP</i>₁ (mg/mL) após a reconstituição	<i>McLTP</i>₁ (mg/mL) 24 h após a reconstituição
Não-armazenada	-	1,25 ± 0,04	1,10 ± 0,01
1 mês	-20 °C	1,33 ± 0,01	0,85 ± 0,01
	4 °C	1,28 ± 0,03	0,85 ± 0,03
	25 °C	1,25 ± 0,07	0,98 ± 0,03
3 meses	-20 °C	1,18 ± 0,07	1,24 ± 0,05
	4 °C	1,24 ± 0,05	1,36 ± 0,03
	25 °C	1,29 ± 0,02	1,12 ± 0,03
6 meses	-20 °C	1,23 ± 0,08	1,01 ± 0,04
	4 °C	1,33 ± 0,03	1,11 ± 0,06
	25 °C	1,11 ± 0,07	0,99 ± 0,06
1 mês (sem proteção da luz)	25 °C	1,90 ± 0,05*	0,67 ± 0,04*#

Os valores representam a quantidade de proteína solúvel calculada usando o coeficiente de extinção de *McLTP*₁ ($\epsilon = 12,85 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). *Representa grupos que diferiram do grupo da proteína não-armazenada pelo teste de Tukey. #Representa grupos que apresentaram perda significativa pelo teste de Tukey, após 24 horas, em relação ao grupo que foi imediatamente reconstituído.

Tabela 03 – Teores de *McLTP*₁ solúvel em água estimada pelo método de Bradford (1976) após o armazenamento por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.

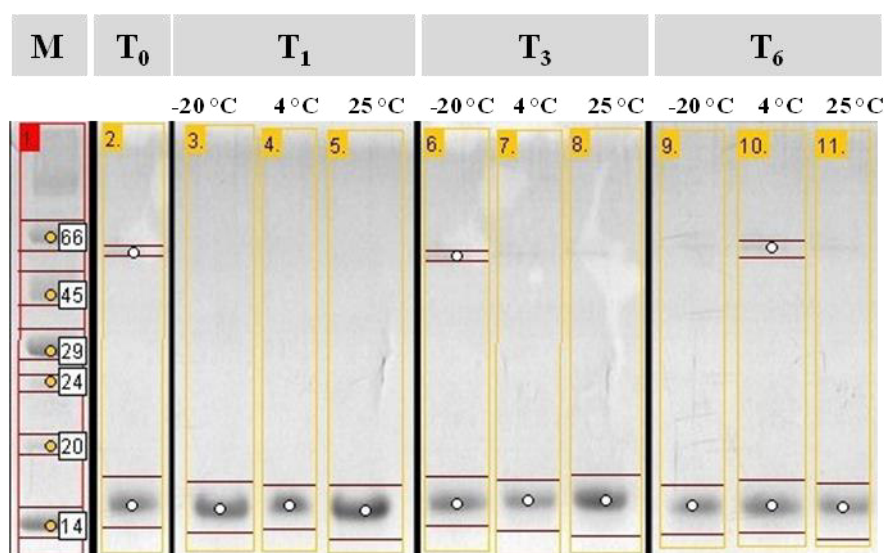
Tempo de armazenamento (meses)	Temperatura de Armazenamento	<i>McLTP</i>₁ (mg/mL) após a reconstituição
Não-armazenada	-	1,02 ± 0,07
1 mês	-20 °C	0,83 ± 0,02
	4 °C	0,87 ± 0,04
	25 °C	0,94 ± 0,08
3 meses	-20 °C	0,88 ± 0,04
	4 °C	0,95 ± 0,05
	25 °C	0,99 ± 0,06
6 meses	-20 °C	0,96 ± 0,09
	4 °C	0,93 ± 0,09
	25 °C	1,04 ± 0,11
1 mês (sem proteção da luz)	25 °C	2,60 ± 0,06*

Teores de *McLTP*₁ solúvel em água estimada pelo método de Bradford (1976) após o armazenamento por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas. *Representa grupos que diferiram do grupo da proteína não-armazenada pelo teste de Tukey.

Perfil Eletroforético e Densitometria

A **figura 07** mostra o perfil eletroforético de *McLTP*₁ armazenada nos diferentes tempos e condições de temperatura. Em meio não-redutor, para todas as condições testadas, não foi observada a formação de agregados de massas moleculares maiores do que aquela observada para *McLTP*₁ (15,13 kDa) ou ainda produtos de hidrólise, mesmo na condição mais extrema de armazenamento, por 6 meses a 25 °C. Não foram observadas também mudanças no padrão de migração eletroforética da proteína.

Figura 07 – Análise eletroforética de *McLTP*₁ armazenada por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.

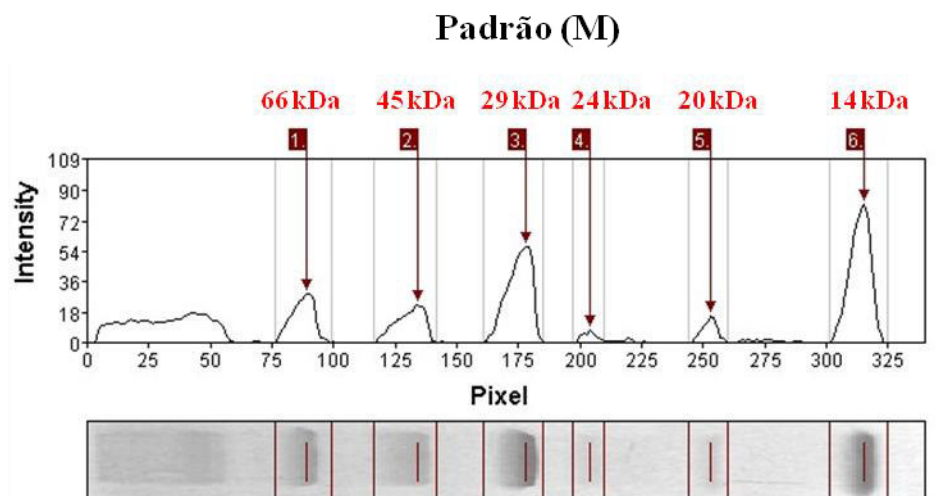


As análises foram feitas por SDS-PAGE 15% em condições não-redutoras. M - Marcador de massa molecular (kDa). T0 – *McLTP*₁ não-armazenada; T1 – *McLTP*₁ armazenada por 1 mês; T3 – *McLTP*₁ armazenada por 3 meses; T6 – *McLTP*₁ armazenada por 6 meses. As temperaturas de armazenamento foram exibidas logo abaixo dos tempos citados. Para as análises, foram aplicados 8 µg de *McLTP*₁ em cada poço e os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) com o perfil de todas as condições de armazenamento de *McLTP*₁ foi utilizada para análise densitométrica através de varredura de cada banda e comparada com a proteína não-armazenada. O programa utilizado foi o GelAnalyser e o marcador de massa molecular foi utilizado como padrão (**Figura 08A**). Os perfis obtidos pela análise mostraram intensidades máximas para *McLTP*₁ semelhantes em todas as condições testadas, com variação de intensidade de 60 a 90 em torno de 295 pixels. Ao se comparar a massa da banda proteica referente à *McLTP*₁ com o marcador, a proteína não-armazenada apresentou massa aproximada de 15 kDa, valor que se manteve para todas as condições testadas (**Figura 08B**).

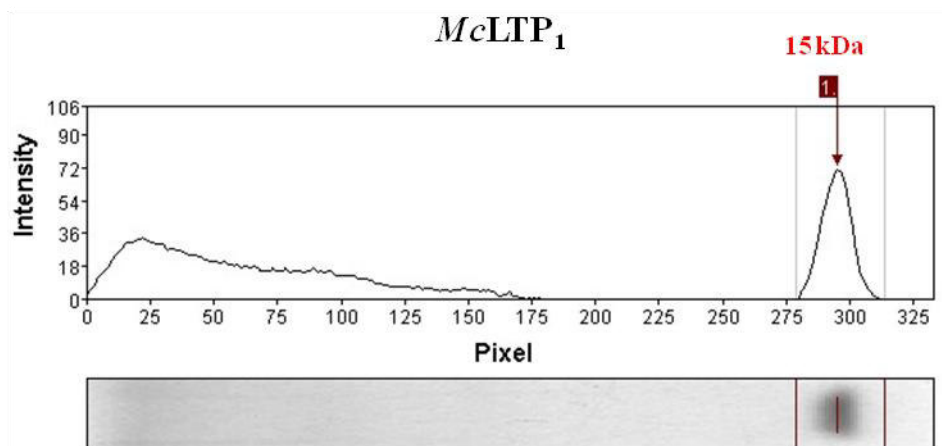
Figura 08 – Análise densitométrica de *McLTP₁* não-armazenada e armazenada por 1, 3 e 6 meses em diferentes temperaturas.

(A)



As análises foram feitas com o programa GelAnalyser. (A) Perfil de densitometria da banda referente ao marcador de massa molecular (M) que foi utilizado como padrão. O eixo das abscissas representa a nitidez e o eixo das ordenadas representa a intensidade da banda proteica.

(B)



As análises foram feitas com o programa GelAnalyser. (B) Perfil de densitometria da banda referente à *McLTP₁*. O eixo das abscissas representa a nitidez e o eixo das ordenadas representa a intensidade da banda proteica.

Determinação dos Espectros de Dicroísmo Circular

O espectro de dicroísmo circular (CD) UV-distante de *McLTP₁* caracteriza-se por apresentar por mínimos de elipticidade molar em 208 e 222 nm e um máximo positivo observado a 195 nm, rico em α -hélices (**Figura 09A**). Ao se analisar o perfil da estrutura secundária da proteína armazenada por um mês, o perfil permanece o mesmo, quando comparado ao tempo 0 (**Figura 09B**). O mesmo resultado foi obtido em todas as temperaturas de armazenamento por três meses (**Figura 09C**). Após seis meses de armazenamento, nas temperaturas de 4 e 25 °C o perfil se manteve idêntico àquele obtido para a proteína não armazenada. Porém, na temperatura de -20 °C, o espectro de CD de *McLTP₁* foi alterado apresentando elipticidade molar menor no comprimento de onda de 195 nm, como mostrado na **figura 07D**. As porcentagens de estrutura secundária (α -hélices e folhas- β) estão sumarizadas na **tabela 04**, que mostra um padrão de 90-95% de α -hélices e de 1-3% folhas- β , exceto na condição de armazenamento por 6 meses a -20 °C que apresentou um padrão de 85,08% de α -hélices e 0,06% de folhas- β .

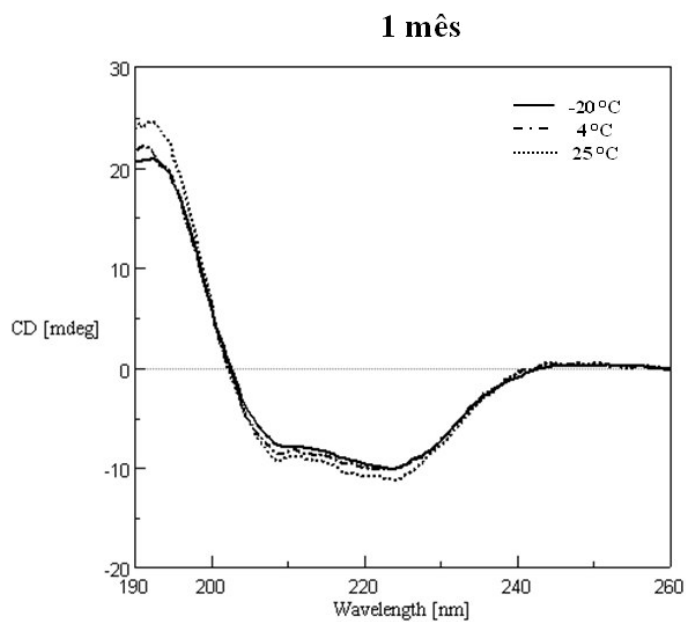
Figura 09 – Espectro de Dicroísmo Circular de *McLTP*₁ não armazenada (tempo 0) liofilizada e reconstituída em H₂O destilada.

(A)



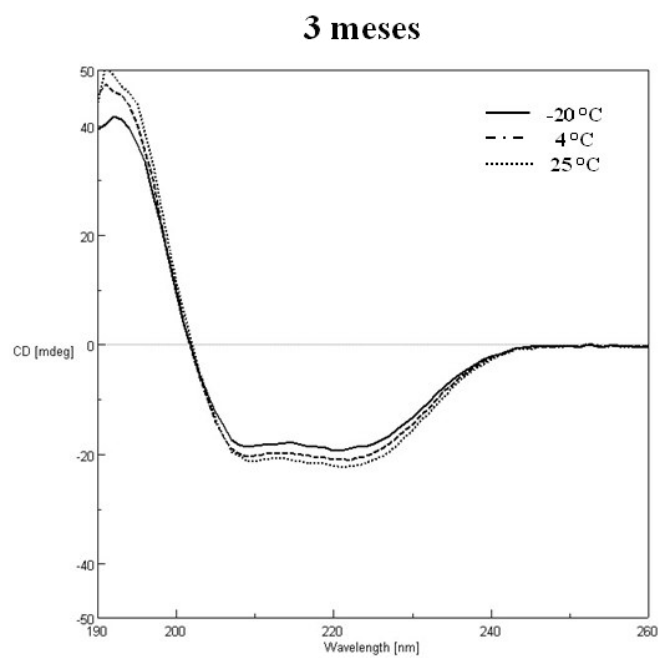
Espectro de dicroísmo circular de *McLTP*₁ (0,06 mg/mL) não-armazenada (T0) em água, pH 7,0, usando cubeta cilíndrica de quartzo de 0,1 cm.

(B)



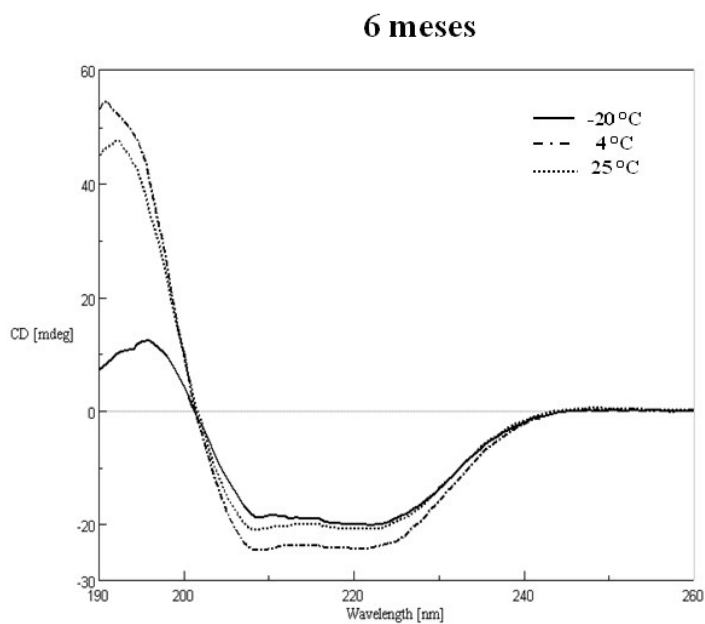
Espectro de dicroísmo circular de *McLTP*₁ (0,06 mg/mL) armazenada por 1 mês a -20 °C, 4 °C e 25 °C pH 7,0, usando cubeta cilíndrica de quartzo de 0,1 cm.

(C)



Espectro de dicroísmo circular de *McLTP1* (0,06 mg/mL) almacenada por 3 meses a -20 °C, 4 °C e 25 °C pH 7,0, usando cubeta cilíndrica de cuarzo de 0,1 cm.

(D)



Espectro de dicroísmo circular de *McLTP1* (0,06 mg/mL) almacenada por 3 meses a -20 °C, 4 °C e 25 °C pH 7,0, usando cubeta cilíndrica de cuarzo de 0,1 cm.

Tabela 04 - Padrões de distribuição da estrutura secundária presentes em McLTP1, determinados a partir do espectro de dicroísmo circular.

Tempo de armazenamento (meses)	Temperatura de Armazenamento	Estrutura Secundária (%)	
		α -Hélices	Folhas- β
Não-armazenada	-	95,01	0,19
1 mês	-20 °C	90,02	0,26
	4 °C	91,08	0,18
	25 °C	93,02	0,2
3 meses	-20 °C	95,02	0,16
	4 °C	94,99	0,22
	25 °C	95,00	0,17
6 meses	-20 °C	85,08*	0,06*
	4 °C	95,00	0,17
	25 °C	95,24	0,17

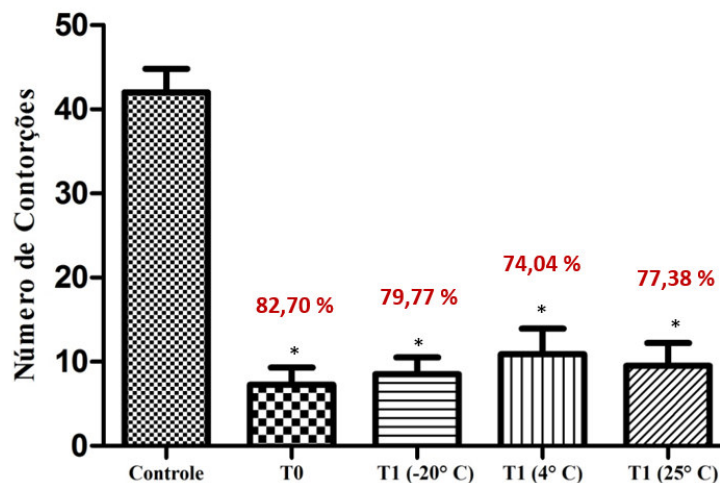
Os valores representam a porcentagem α -hélice e folha- β gerados a partir de espectro de dicroísmo circular de McLTP1 (0,06 mg/mL) não-armazenada e armazenada por 1, 3 e 6 meses a -20 °C, 4 °C e 25 °C pH 7,0, usando cubeta cilíndrica de quartzo de 0,1 cm. Em todas as condições, a proteína foi armazenada protegida da incidência de luz. *Representa grupos que diferiram do grupo da proteína não-armazenada pelo teste de Tukey.

Potência de Efeito Farmacológico

*McLTP*₁ recém-liofilizada (T0) foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$, Teste de Tukey) o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 82,70 %. O armazenamento da proteína por 1 e 3 meses nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C não promoveu alterações significativas na potência de efeito farmacológico observada para a proteína em estudo. Após o período de 6 meses de armazenamento nas temperaturas de -20 e 4 °C, *McLTP*₁ também foi capaz de manter a mesma potência de efeito observado para a proteína não-armazenada, com inibições de 88,50% e 82,38%, respectivamente. Entretanto, ao se armazenar a proteína pelo mesmo período na temperatura ambiente (25 °C), a inibição do número de contorções foi de 61,90%, que representa uma perda de efeito de 25,15% quando se compara à proteína não-armazenada como mostrado nas **figuras 10 (A, B e C)**.

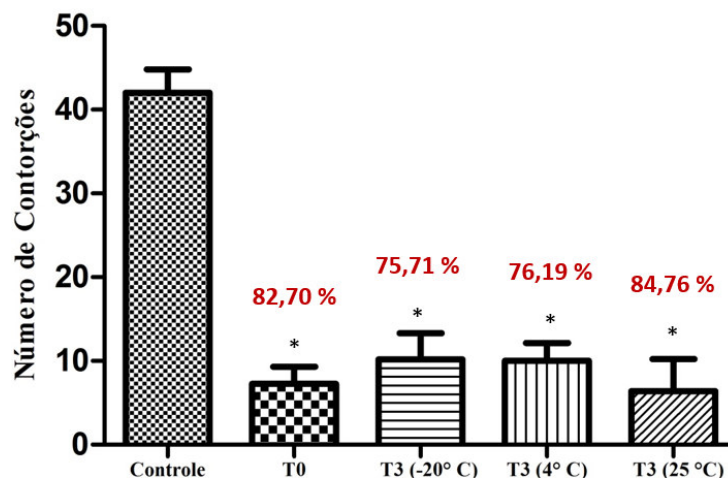
Figura 10 – Atividade antinociceptiva de *McLTP*₁ (8mg/kg, v.o.) armazenada nos tempos 1, 3 e 6 meses, em diferentes temperaturas, em camundongos.

(A)



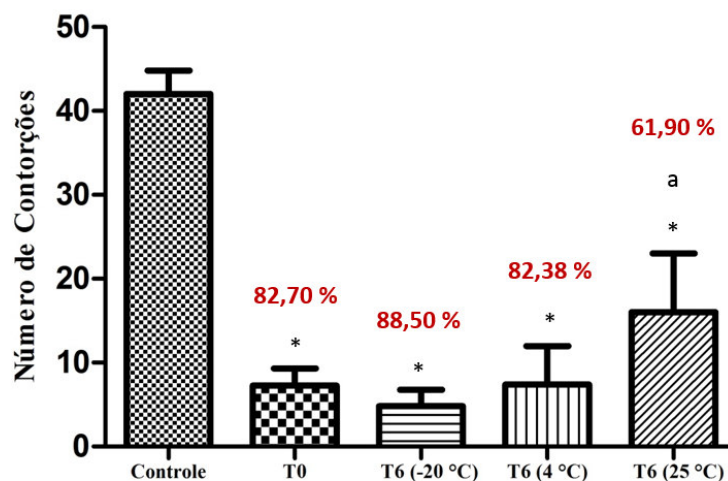
O eixo das ordenadas representa o número de contorções abdominais visualizadas num período de 20 minutos, contadas imediatamente à administração do ácido acético 1% (100 µL/10 g). O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução salina 0,15 M (controle) ou *McLTP*₁. (A) *McLTP*₁ armazenada por 1 mês nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C. As colunas representam a média ± desvio-padrão da média de 6 animais. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

(B)



O eixo das ordenadas representa o número de contorções abdominais visualizadas num período de 20 minutos, contadas imediatamente à administração do ácido acético 1% (100 μ L/10 g). O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução salina 0,15 M (controle) ou *McLTP*₁. (B) *McLTP*₁ armazenada por 3 meses nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média de 6 animais. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

(C)



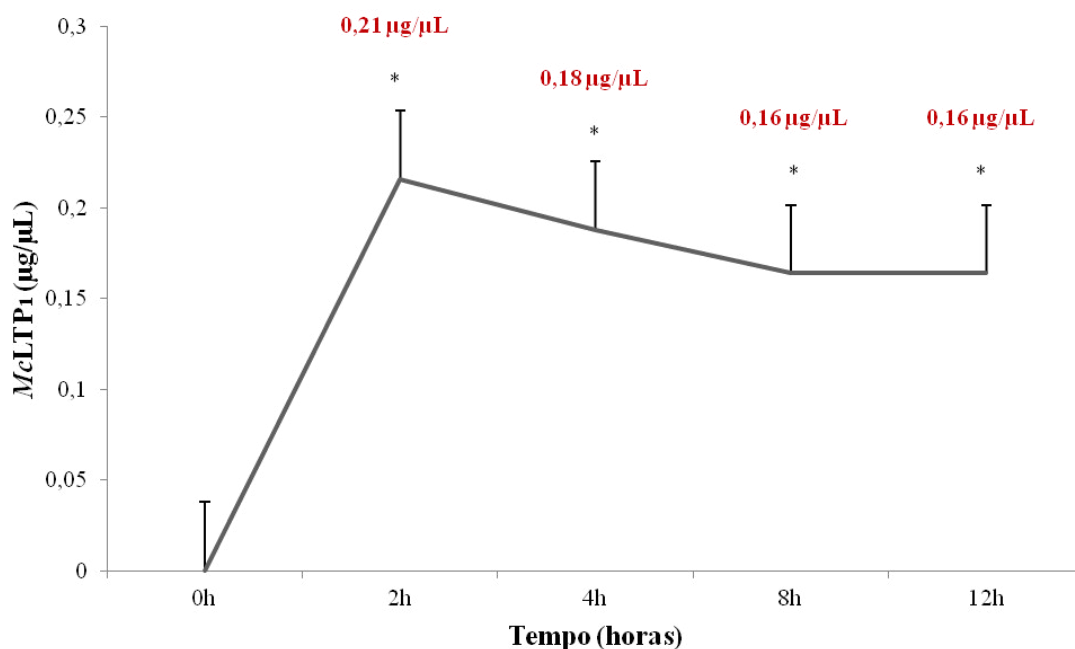
O eixo das ordenadas representa o número de contorções abdominais visualizadas num período de 20 minutos, contadas imediatamente à administração do ácido acético 1% (100 μ L/10 g). O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução salina 0,15 M (controle) ou *McLTP*₁. (C) *McLTP*₁ armazenada por 6 meses nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média de 6 animais. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). Letras diferentes representam diferenças significativas entre as diferentes condições de armazenamento.

Bloco 02 – Avaliação da biodisponibilidade, acompanhamento do efeito farmacológico e toxicidade de *McLTP*₁

Imunodeteção de *McLTP*₁ no plasma de camundongos após administração oral

Para verificar a quantidade de *McLTP*₁ administrada que entra na circulação sistêmica, foi verificado se existe, por imunodeteção, *McLTP*₁ no plasma dos animais tratados com a proteína. A **figura 11** representa a disponibilidade da proteína na corrente sanguínea, mostrando que após duas horas de administração há um pico de concentração $0,21 \pm 0,09 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ circulante, chegando a $0,16 \pm 0,00 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ mesmo após 12 horas. Em nenhum dos tempos analisados houve diferenças significativas, mostrando que a quantidade de proteína circulante permanece constante por até 12 horas após administração de *McLTP*₁.

Figura 11 – Imunodeteção de *McLTP*₁ no soro de camundongos tratados com a dose de 8 mg/kg pela via oral.

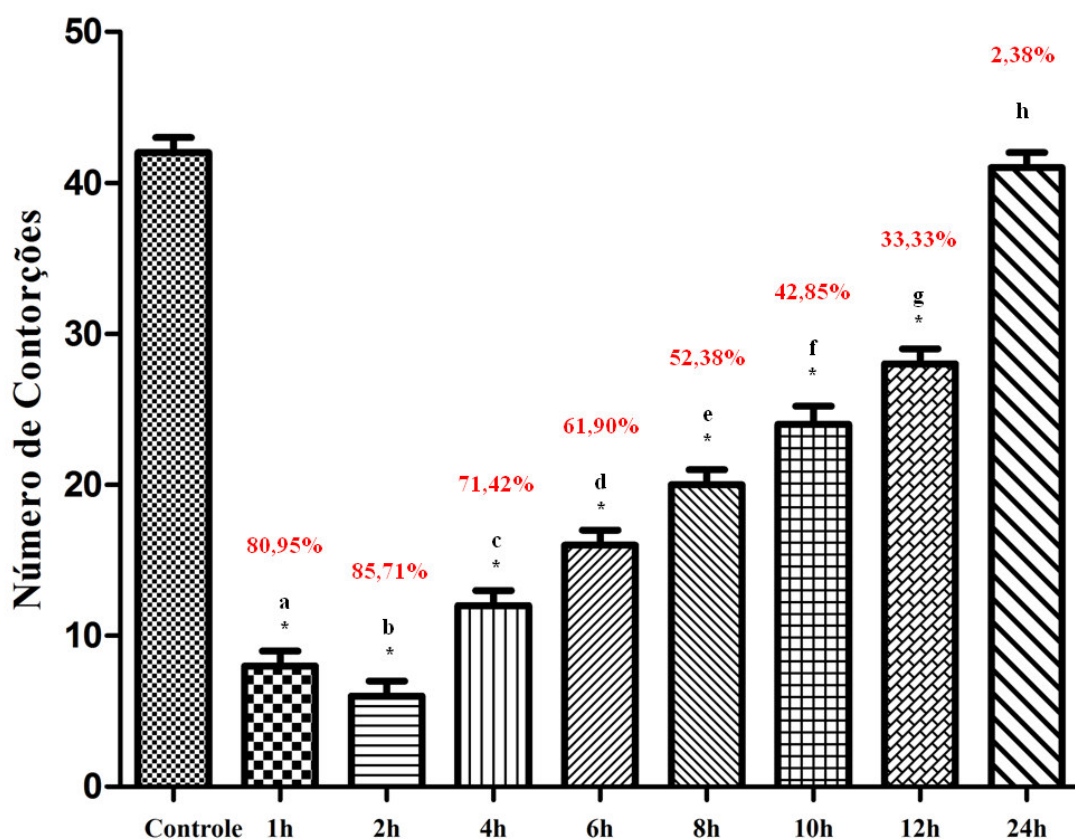


Resultados expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (0h; Teste de Tukey).

Acompanhamento da atividade antinociceptiva de *McLTP*₁

Utilizando o modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético, foi verificado o efeito de *McLTP*₁ pelo tempo após sua administração pela via oral. A **figura 12** mostra que o efeito antinociceptivo da proteína é diminuído com o passar do tempo, entretanto, após 2 horas de administração, foi observado o efeito mais potente *McLTP*₁ chegando a inibir em 85,71% o número das contorções abdominais. Após 10 horas da administração intragástrica foi observada perda de 50% do efeito de *McLTP*₁, e após 12 horas, ainda foi observado efeito antinociceptivo de 33,33%, efeito esse que foi estatisticamente igual ao do grupo controle após 24 horas da administração, indicando a completa metabolização de *McLTP*₁.

Figura 12 – Acompanhamento do efeito antinociceptivo de *McLTP*₁ (8 mg/kg) após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 horas de administração pela via oral.



O eixo das ordenadas representa o número de contorções abdominais visualizadas num período de 20 minutos, contadas imediatamente à administração do ácido acético 1% (100 µL/10 g). O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução salina 0,15 M (controle) ou *McLTP*₁ após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, e 24 horas da administração oral. As colunas representam a média ± desvio-padrão da média de 6 animais. * p<0,05 vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tempos observados.

Toxicidade Oral em Dose Única e Doses Repetidas

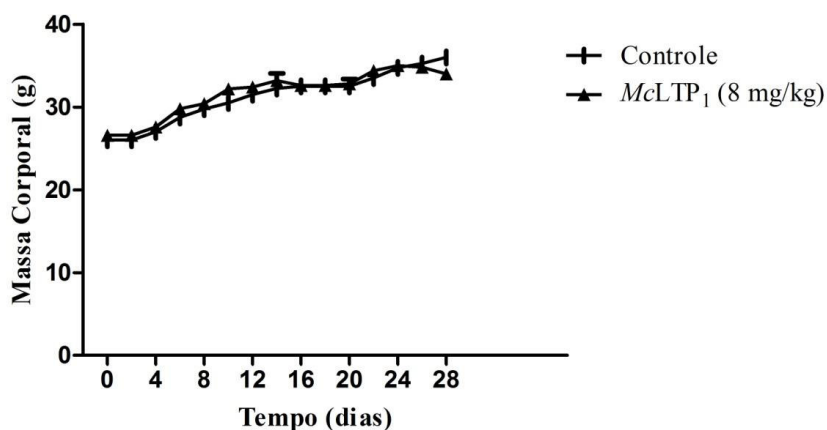
Seguindo protocolo da OECD (Guideline 423) para avaliar a toxicidade em dose única de *McLTP*₁, os animais foram tratados com uma dose de 8 mg/kg (dose de melhor efeito antinociceptivo, segundo Campos *et al.*, 2016) ou 80 mg/kg (10 x superior à dose de maior efeito antinociceptivo) da proteína pela via oral. Os animais foram observados por 14 dias após a administração de *McLTP*₁ e não houve mortalidade de nenhum dos animais, bem como alterações no consumo de água e ração tanto em camundongos machos como em fêmeas. O perfil de comportamento dos animais não se mostrou alterado quando comparado com o grupo controle e não foi observada: alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade. Os órgãos coletados, como estômago, coração, pulmões e rins, ao final do experimento não apresentaram diferenças macroscópicas dos grupos tratados com *McLTP*₁ em relação ao grupo controle.

Para avaliar a toxicidade em doses repetidas de *McLTP*₁ (Guideline 407, OECD), a proteína foi administrada pela via oral diariamente, por 28 dias, na dose de 8 mg/kg. Não houve mortalidade ou alterações comportamentais de nenhum animal tratado durante o período experimental. A massa corporal dos animais tratados apresentou os mesmos índices de variação, quando comparadas àquelas do grupo controle (**Figura 13A e 13B**). Os parâmetros hematológicos avaliados nos animais tratados com a proteína se mostraram dentro dos padrões normais e não foram significativamente diferentes dos valores encontrados para o controle, com exceção da quantidade de plaquetas que sofreu significativa queda no grupo dos machos, mas permaneceu inalterada nas fêmeas (**Tabela 05**). Também não foram registradas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos do grupo tratado em relação ao grupo controle (**Tabela 06**). O peso fresco relativo dos órgãos coletados (rim, coração, pâncreas, fígado, intestino delgado, pulmões, estômago) não apresentou diferenças em relação ao grupo controle, tendo somente o intestino do grupo dos machos, alterações observadas no seu peso (**Tabela 07**), porém as análises histológicas mostraram que não houve alterações na arquitetura dos órgãos avaliados, inclusive o intestino (**Figura 14**). Nos rins, a proteína não promoveu alterações histológicas e não foram encontrados focos de inflamação ou fibrose, congestão ou áreas de hemorragia. O pâncreas apresentou características histológicas normais e o tecido cardíaco permaneceu intacto, sem nenhuma infiltração inflamatória, edema ou degeneração fibrilar. O pulmão não apresentou desestruturação alveolar nem presença de fibrose e brônquios dentro dos padrões normais. A histologia do fígado não revelou alterações importantes de atipias celulares, indicando ausência de lesão neste órgão. O tratamento subcrônico com

*McLTP*₁ não alterou a arquitetura lobular, com hepatócitos normais isomorfos, além de ausência de vacuolização, congestão ou processo inflamatório. O estômago também manteve sua arquitetura dentro da normalidade, indicando que *McLTP*₁, mesmo administrada diariamente, não ocasionou lesões no tecido.

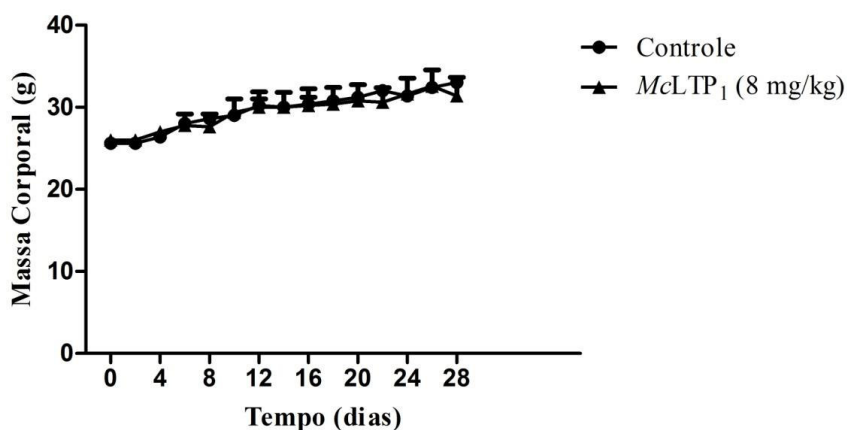
Figura 13 – Massa corpórea dos animais de ambos os sexos tratados com *McLTP*₁ 8 mg/kg no teste de toxicidade em doses repetidas.

(A)



(A). Variação média por grupo por dia da massa corporal nos camundongos machos tratados com a dose de 8 mg/kg de *McLTP*₁. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média. Não foram observadas diferenças significativas entre as massas dos animais tratados com a proteína e o veículo ($p > 0,05$, teste de Tukey).

(B)



(B). Variação média por grupo por dia da massa corporal nas fêmeas tratadas com a dose de 8 mg/kg de *McLTP*₁. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média. Não foram observadas diferenças significativas entre as massas dos animais tratados com a proteína e o veículo ($p > 0,05$, teste de Tukey).

Tabela 05 – Análises hematológicas dos camundongos de ambos os sexos tratados com *McLTP*₁ no teste toxicidade em doses repetidas.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Controle	<i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg/dia)	Controle	<i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg/dia)
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	3,38 ± 1,07	3,78 ± 0,87	3,96 ± 0,83	4,82 ± 2,13
Eritrócitos (x10 ⁶ /mm ³)	8,41 ± 0,03	9,22 ± 0,87	8,61 ± 0,83	8,25 ± 0,75
HGB (g/dL)	13,93 ± 0,39	14,66 ± 1,15	14,68 ± 1,13	14,54 ± 0,78
HCT (%)	41,85 ± 1,27	45,00 ± 4,58	44,46 ± 4,74	42,38 ± 5,04
PLT (x10 ³ /mm ³)	718,12 ± 72,44	585,40 ± 186,78*	584,00 ± 64,15	649,2 ± 110,22
VCM (µm ³)	49,87 ± 1,54	49,00 ± 1,41	51,80 ± 1,92	51,20 ± 3,27
HCM (pg)	16,75 ± 0,44	15,90 ± 0,33	17,12 ± 0,81	17,64 ± 0,99
CHCM (g/dL)	33,30 ± 1,25	32,66 ± 1,00	33,12 ± 1,14	34,44 ± 2,41

Hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), plaquetas (PLT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular celular (MCHC). Resultados expressos em média ± desvio padrão. * indica diferenças significativas ($p > 0,05$, teste de Tukey) quando comparado ao grupo controle.

Tabela 06 – Parâmetros bioquímicos em camundongos tratados com *McLTP*₁ no teste toxicidade em doses repetidas.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Controle	<i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg/dia)	Controle	<i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg/dia)
AST (U/L)	59,33 ± 12,85	76,00 ± 56,51	65,00 ± 12,51	62,80 ± 33,09
ALT (U/L)	50,50 ± 5,44	88,20 ± 44,96	47,80 ± 1,64	79,80 ± 43,72
AP (U/L)	363,50 ± 102,72	416,00 ± 110,39	337,2 ± 75,13	414,40 ± 135,82
GLU (mg/dL)	176,66 ± 4,04	171,80 ± 31,45	124,8 ± 45,48	166,40 ± 35,27
CRE (mg/dL)	0,32 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,52 ± 0,43	0,34 ± 0,05
PRO (mg/dL)	5,75 ± 0,25	5,48 ± 0,60	5,60 ± 0,46	5,00 ± 0,24
ACU (mg/dL)	2,97 ± 1,71	4,20 ± 5,99	2,14 ± 0,96	1,46 ± 0,54
COL (mg/dL)	119,50 ± 9,03	149,80 ± 24,15	90,80 ± 21,58	104,60 ± 23,70
TRI (mg/dL)	234,00 ± 56,00	152,4 ± 67,00	182,6 ± 23,02	148,80 ± 48,79

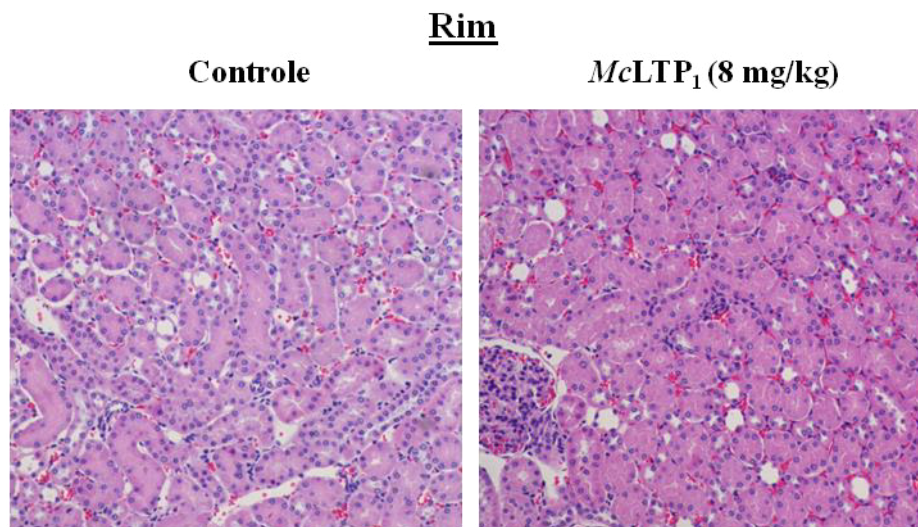
Aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (AP), glicemia (GLI), creatinina (CRE), proteínas totais (PRO), ácido úrico (ACU), colesterol total (COL) e triglicérides (TRI). Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 07 – Peso fresco relativo dos órgãos (g/10 g) de camundongos de ambos os sexos tratados com *McLTP*₁ no teste toxicidade em doses repetidas.

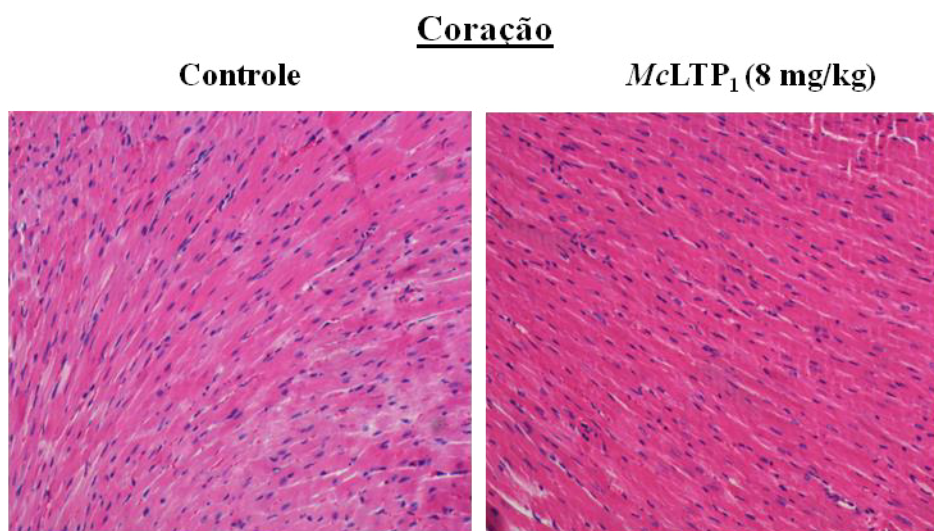
Órgão	Machos		Fêmeas	
	Controle	<i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg/dia)	Controle	<i>McLTP</i> ₁ (8 mg/kg/dia)
Rins	1,97 ± 0,08	1,78 ± 0,11	1,53 ± 0,16	1,51 ± 0,26
Coração	0,68 ± 0,09	0,53 ± 0,05	0,53 ± 0,25	0,63 ± 0,05
Pâncreas	0,47 ± 0,04	0,55 ± 0,13	0,57 ± 0,25	0,71 ± 0,16
Fígado	5,79 ± 0,39	6,09 ± 0,43	5,23 ± 0,40	5,62 ± 1,00
Intestino delgado	6,76 ± 0,57	5,24 ± 0,19*	7,29 ± 0,62	6,37 ± 1,65
Pulmões	0,755 ± 0,09	0,76 ± 0,09	0,65 ± 0,10	0,79 ± 0,10
Estômago	1,11 ± 0,12	1,23 ± 0,07	1,32 ± 0,20	1,34 ± 0,15

Resultados expressos em média ± desvio padrão da média. * p<0,05, teste de Tukey.

Figura 14 – Análise histológica dos órgãos de camundongos tratados com *McLTP*₁ (8 mg/kg) no teste toxicidade em doses repetidas.



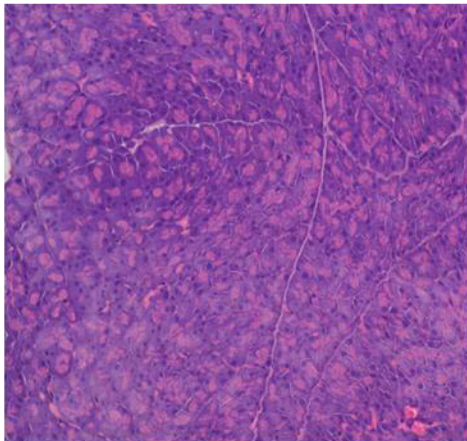
As microfotografias mostram os cortes histológicos do rim dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.



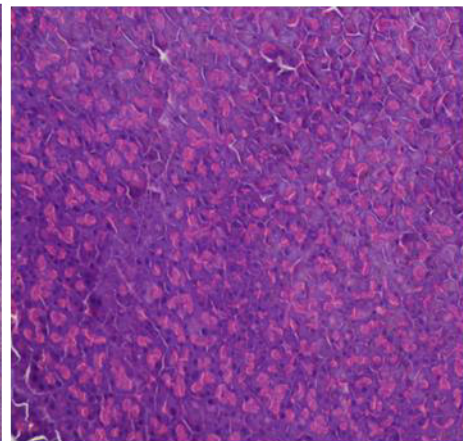
As microfotografias mostram os cortes histológicos do coração dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.

Pâncreas

Controle



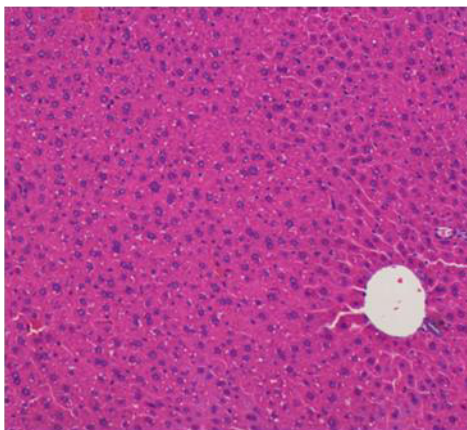
***McLTP*₁ (8 mg/kg)**



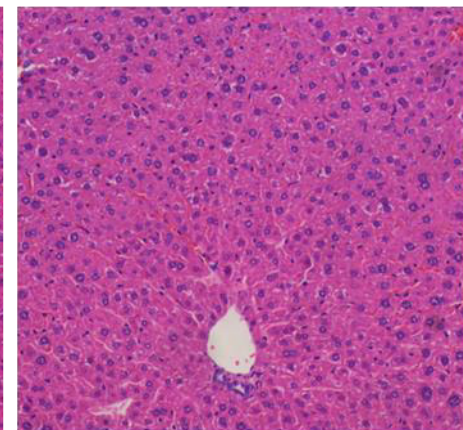
As microfotografias mostram os cortes histológicos do pâncreas dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.

Fígado

Controle



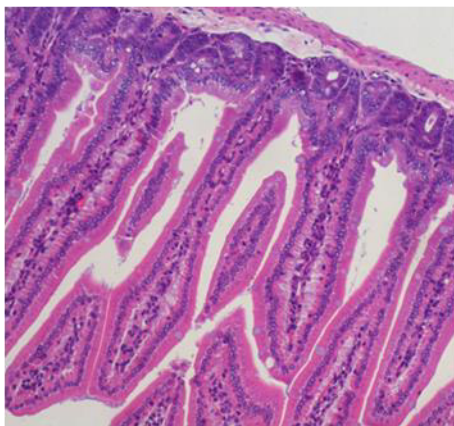
***McLTP*₁ (8 mg/kg)**



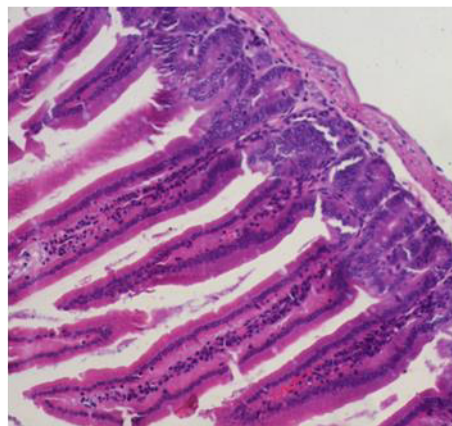
As microfotografias mostram os cortes histológicos do fígado dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.

Intestino

Controle



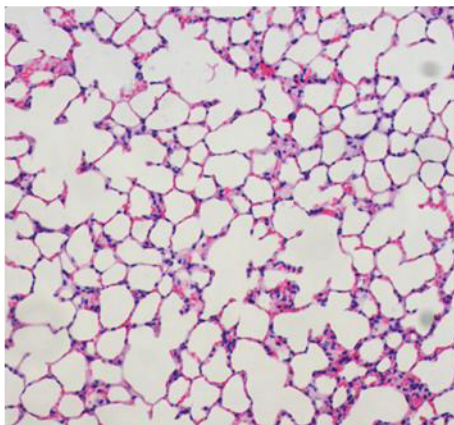
***McLTP*₁ (8 mg/kg)**



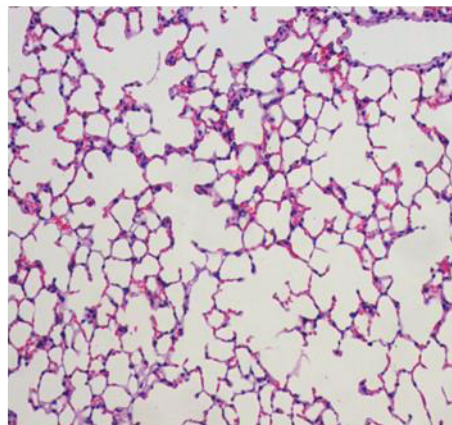
As microfotografias mostram os cortes histológicos do intestino delgado dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.

Pulmão

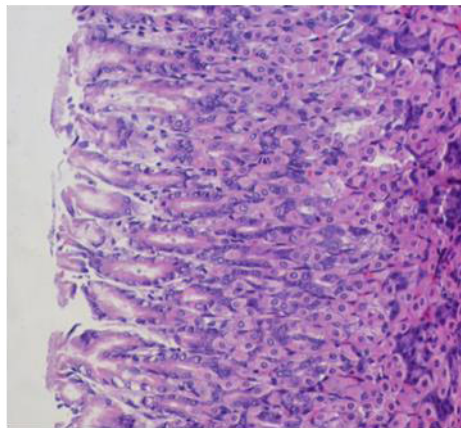
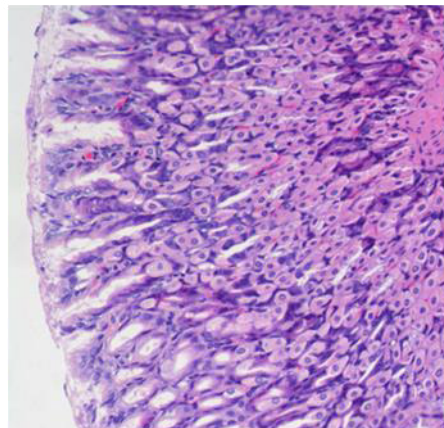
Controle



***McLTP*₁ (8 mg/kg)**



As microfotografias mostram os cortes histológicos do pulmão dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.

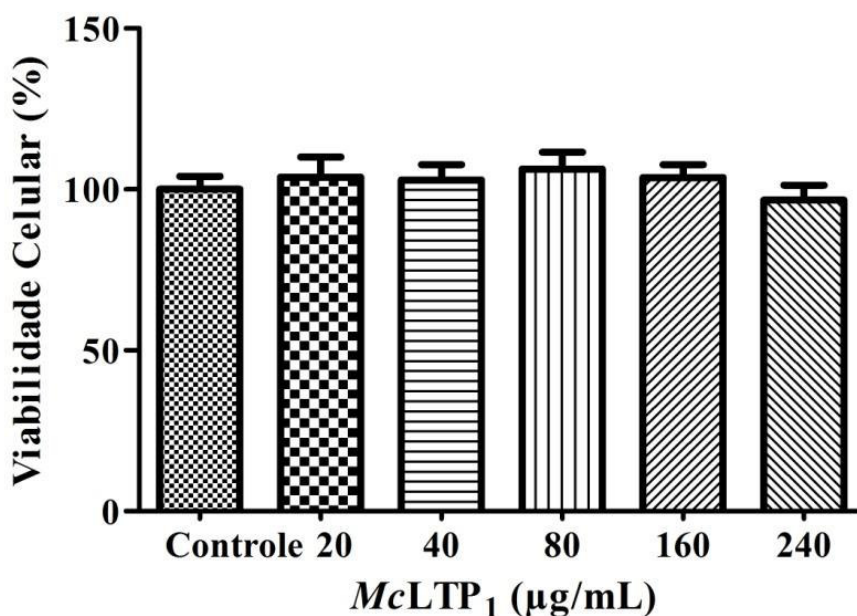
Estômago**Controle*****McLTP*₁ (8 mg/kg)**

As microfotografias mostram os cortes histológicos do pulmão dos camundongos que receberam administração intragástrica diária de solução salina (controle) ou *McLTP*₁ 8 mg/kg na toxicidade subaguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Lente objetiva com aumento de 200x.

Avaliação da Citotoxicidade de *McLTP*₁ Utilizando o Teste do MTT

A citotoxicidade de *McLTP*₁ foi verificada pelo teste do MTT, utilizando linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano. Não foi detectado nenhum sinal de toxicidade na linhagem celular, visto que na máxima concentração testada (240 µg/mL), a absorbância a 595 nm foi semelhante à da água (controle negativo), mantendo-se a viabilidade celular em torno de 100% mesmo na maior concentração de *McLTP*₁ testada, como pode ser observado na **figura 15**.

Figura 15 - Avaliação da citotoxicidade de *McLTP*₁ em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3a) após 24 horas de estabilização celular.



A análise estatística foi realizada por Dunnett's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Apesar de um grande arsenal de medicamentos já existentes, o grande número de efeitos colaterais ainda prevalece. Dentre essas drogas se destacam os analgésicos e anti-inflamatórios, que são também os campeões no quesito auto-medicação. Dessa forma, há a necessidade de novos fármacos analgésicos e antiinflamatórios com menos efeitos adversos, o que direciona estudiosos a intensificar as pesquisas para a descoberta de novos compostos.

Diversos estudos já relataram o potencial terapêutico de *Morinda citrifolia* L. fazendo com que nos últimos anos, tenha sido verificado o crescente interesse e uso popular desse pequeno arbusto, por serem difundidas informações sobre a sua capacidade de cura de diversas enfermidades, inclusive o câncer. Alguns chegam a afirmar que o fruto alcança mais de 120 problemas de saúde que podem ser tratados e até curados, com a planta e seus extratos (MANDUKHAIL, 2010; NAYAK e MENGI, 2010; MURATA, 2014; KANNAN, 2014; GARCIA-VILAS, 2015; HUANG, 2015). Sabe-se que essas atividades estão associadas à ação dos metabólitos secundários, que além dos efeitos benéficos, já se sabe serem causadores de efeitos tóxicos, geralmente ligados à hepatotoxicidade, o que levou à proibição da comercialização de produtos a base de noni pela ANVISA (nº. 25, de 29 de maio de 2007), até que sejam realizados estudos conclusivos de segurança farmacológica.

Por conta dos relatos de toxicidade atribuídos a metabólitos secundários derivados do noni, nosso laboratório iniciou a investigação bioquímica e farmacológica das proteínas das sementes dessa espécie visando identificar compostos bioativos promissores para o tratamento da inflamação e da dor. Dados recentes e publicados por Campos *et al* (2016) mostraram que nas sementes dessa espécie há uma proteína transferidora de lipídeos, denominada de *McLTP₁*, com atividades antinociceptiva e antiinflamatória pela via oral.

Considerando as ações farmacológicas promissoras desencadeadas por *McLTP₁* em camundongos, bem como os fatos apresentados anteriormente acerca da necessidade por novos fármacos eficazes e com menos efeitos adversos, este trabalho objetivou analisar a estabilidade dessa proteína frente a diversas condições de armazenamento, bem como avaliar a sua potência de efeito nessas condições, visando criar bases científicas para o desenvolvimento de um fármaco contra a dor e a inflamação. Em adição aos estudos de estabilidade, testes de toxicidade pré-clínica foram também realizados visando avaliar a possível efeito tóxico de *McLTP₁*.

O primeiro bloco desse trabalho consistiu em avaliar a estabilidade de *McLTP₁* adaptando-se às diretrizes nacionais (ANVISA) e internacionais (FDA e EMEA) para novas drogas. A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou

mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquele que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (TABORIANSKI, 2003; VEHABOVIC *et al.*, 2003; SILVA, 2009). A EMEA (2003) estabelece que finalidade dos testes de estabilidade seja proporcionar provas sobre como a qualidade de uma substância ativa ou do produto acabado varia com o tempo, sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, e para estabelecer um período de reteste para a substância ativa ou o prazo de validade do produto acabado, a fim de estabelecer as condições de armazenagem recomendadas.

Para realização dos testes de estabilidade, *McLTP*₁ foi submetida a condições consideradas amenas ou extremas para o estoque de produtos farmacêuticos. Foram feitas simulações de armazenamento da proteína na prateleira pelos seguintes períodos de 1, 3 e 6 meses. Aos períodos foram combinadas as temperaturas de -20 ± 2 °C (*real-time*), 4 ± 3 °C (*long-term*) e 25 ± 2 °C (*accelerated*). Segundo a ANVISA, os estudos de estabilidade de acompanhamento (*real-time*) são realizados para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os estudos iniciais realizados. Os estudos de estabilidade de longa duração (*long-term*) são projetados para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico, durante e depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar a vida média projetada e recomendar as condições de estocagem. Os estudos de estabilidade acelerada (*accelerated*) são projetados para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto farmacêutico pelo uso de condições de estocagem forçadas. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo, como podem ocorrer durante o transporte. Os resultados dos estudos acelerados nem sempre são indicativos de mudanças físicas. Em adição, o estudo de fotoestabilidade é projetado para detectar alterações significantes no produto após exposição à luz.

A amostra de *McLTP*₁ logo após a liofilização (tempo zero, T₀) apresentou uma coloração bege-clara e essa cor foi utilizada para comparação das amostras armazenadas. Foi observado que, ao proteger o frasco contendo a proteína da luz, a coloração se mantém estável,

mesmo quando armazenada por 6 meses na temperatura de 25 °C. A solubilização da proteína em água autoclavada foi facilmente realizada tanto na proteína não-armazenada quando em todas as condições testadas com a proteção contra a luz, apresentando solução com aspecto translúcido e sem partículas suspensas. Já quando armazenada sem proteção da luz, já no primeiro mês houve um escurecimento brusco, indicando que essa condição deve ser desconsiderada ao se armazenar *McLTP*₁. A solubilização da proteína nessa condição em água não foi possível de ser realizada em sua totalidade havendo a formação de precipitado e partículas suspensas.

Uma forma de disponibilizar um fármaco para sua absorção, no caso de sólidos, é dissolvê-lo, independente da forma farmacêutica e via de administração. Caso não ocorra solubilização do fármaco em uma forma farmacêutica, é necessário prévia dissolução no organismo para que ele seja absorvido. Isso ressalta a grande importância do conhecimento da solubilidade de um fármaco em água (PEIXOTO, 2010). Logo, o fato *McLTP*₁ ter se mostrado em sua totalidade solúvel em água, quando protegida da luz, confere uma maior capacidade de ser absorvida pelo organismo. Já essa absorção seria comprometida na condição de armazenamento sem proteção da luz, pela formação de partículas insolúveis em água.

É sabido que produtos farmacêuticos, especialmente de origem proteica, estão sujeitos a muitas variações (oxidação, desaminação, redução e hidrólise) durante seu armazenamento em recipientes fechados, as quais podem interferir na qualidade do produto (LINS e BRASSEUR, 1995; PATEL *et al.*, 2011). Neste trabalho, as amostras de *McLTP*₁ foram armazenadas em diferentes condições, sem controle relativo à atmosfera de oxigênio. Dessa forma, é possível que o escurecimento proteico observado esteja relacionado a um evento de foto-oxidação. De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os processos de foto-oxidação comuns são: 1) a perda de um ou mais elétrons a partir de uma espécie química, como resultado da foto-excitação; 2) a reação de uma substância com o oxigênio, sob a influência da luz. Quando o oxigênio permanece no produto neste último processo, também é chamado foto-oxigenação.

As alterações se mantiveram também quando se avaliou a quantidade de proteínas solúveis em cada condição de armazenamento. Utilizando a absorbância em 280 nm ou o método colorimétrico de Bradford (1976) foram obtidas concentrações de proteínas maiores do que àquelas observadas no armazenamento após o armazenamento por 1 mês na temperatura ambiente sem proteção da luz. Ou seja, não há, para essa condição um maior teor efetivo total de proteínas. Houve, na verdade, desvios nas absorbâncias obtidas culminando com uma superestimação de proteínas.

O fato de haver mudanças na estrutura do princípio ativo pode resultar, além da perda do efeito terapêutico, em casos de toxicidade. Um estudo recente (FUOCO, 2015) mostrou a influência da foto-oxidação em um fármaco comercializado conhecido e de segurança avaliada, a tetraciclina (TC), um antibiótico utilizado para o tratamento de várias doenças infecciosas. O efeito colateral primário conhecido de TC é devido à sua fototoxicidade. Eles aumentam a sensibilidade da pele à luz que pode levar à descoloração significativa (vermelho e manchas castanhas). Além disso, o dano pode por vezes, ser permanente e levar a problemas como o cancro da pele. De acordo com o estudo, as tetraciclinas utilizadas em concentrações terapêuticas, não tem toxicidade em células de mamífero, mas após a exposição UVA/UVB, eles mostram citotoxicidade. Esse comportamento é causado por seus produtos de fotodegradação e à sua natureza reativa. O mecanismo de danos celulares está associado com um aumento de oxidação em macromoléculas, tais como albumina (BSA) e RNase A. Em adição, ANVISA estabelece que se o produto não atende às especificações para aparência e propriedades físicas como cor, separação de fase, dureza, etc., o produto não está em condições para consumo ou um novo estudo deve ser realizado, por se tratar de uma mudança significativa numa condição acelerada.

Além das análises referentes à cor e suspendibilidade, *McLTP₁* foi também avaliada quanto à manutenção de sua integridade nas diferentes condições de armazenamento. Para isso, amostras da proteína em estudo, provenientes das diferentes condições de armazenamento foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida, visando a identificação de possíveis agregados proteicos ou produtos de hidrólise. Em todas as condições testadas, não foram observadas alterações no padrão de migração eletroforética, a formação de agregados ou mudanças que denotassem hidrólise de *McLTP₁*.

A análise densitométrica utilizando a eletroforese de poliacrilamida com a migração das proteínas nas condições testadas mostrou um perfil constante para todas as bandas. O densitômetro converte o padrão de bandas em picos, logo, cada banda do gel é analisada perpendicularmente e o gráfico é gerado de acordo com as intensidades.

Outra etapa importante deste trabalho consistiu nas análises espectroscópicas por dicroísmo circular de *McLTP₁* armazenadas nas condições de armazenamento citadas. O dicroísmo circular (CD) é uma técnica valiosa que atualmente tem se tornado cada vez mais útil no entendimento de parâmetros estruturais. A técnica de CD se baseia na absorção da luz circularmente polarizada por cromóforos que possuem quiralidade intrínseca ou são colocados em ambientes quirais (KELLY *et al.* 2005). As proteínas possuem vários cromóforos que podem dar origem a sinais de CD. Na região do UV distante (180-240 nm), que corresponde à

faixa de comprimentos de onda na qual ocorre a absorção por parte dos peptídeos, o espectro de CD pode ser analisado, fornecendo informações sobre conteúdo de estrutura secundária em relação à presença de α -hélices, folhas- β , voltas e estruturas não ordenadas. O espectro de CD na região do UV de 260 a 320 nm é utilizado para análises de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e, portanto, confere informações sobre a estrutura terciária da proteína (KELLY; PRICE, 2000). Essa técnica possibilita o estudo da estrutura da molécula na condição em que ela exerce sua atividade biológica.

Lutif (2015) mostrou que *McLTP*₁ apresenta um espectro de CD caracterizado por mínimos de elipticidade molar em 208 e 222 nm e um máximo positivo observado a 195 nm, com um total de 26 % de α -hélices. Ao analisar os espectros de CD da proteína armazenadas por 1 e 3 meses, nas diferentes temperaturas, foi observado um espectro semelhante ao da proteína não-armazenada, sendo o mesmo perfil obtido por Lutif (2015), com mínimos de elipticidade e máximos positivo nos comprimentos de onda mencionados. Em relação ao espectro de CD da proteína armazenada por 6 meses, na temperatura de 4 e 25 °C o perfil foi o mesmo ao das amostras anteriores, porém houve mudança no perfil da proteína armazenada a -20 °C. Apesar dessa alteração, mostrando elipticidade molar inferior ao da proteína no tempo zero a 195 nm, não se pode afirmar que essa condição é realmente inadequada para armazenar *McLTP*₁, já que a condição mais extrema testada (6 meses na temperatura ambiente), não foi capaz de promover alteração na estrutura secundária da proteína. Uma hipótese sugere que esse resultado seja devido a problemas na preparação da amostra.

Essa estabilidade encontrada para *McLTP*₁ é comum a outras LTPs descritas, que é explicada por suas estruturas compactas, estabilizadas por pontes dissulfeto sendo extremamente estáveis, resistindo à desnaturação térmica e à digestão enzimática (ASERO *et al.*, 2001; LINDORFF-LARSEN e WINTHER, 200; PASTORELLO *et al.*, 2003; SCHEURER *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004).

Um dado interessante é o fato de que biofármacos já disponibilizados no mercado, mais especificamente os que possuem proteínas como princípio ativo, são geralmente armazenados em condições amenas. Por exemplo, o Avastin® e Enberel®, utilizados para tratamento de câncer colorretal e artrite reumatoide, respectivamente, devem ser mantidos em refrigerador (2-8 °C) protegidos da luz até a utilização. Dessa forma, *McLTP*₁ confere característica relevante no processo de “*drug discovery*”, que é a capacidade de manter sua estrutura intacta ao ser armazenada por vários meses em condições extremas, fator considerado vantajoso para geração de um produto tendo uma proteína como princípio ativo.

Desde a década de 80 descreve-se que uma das principais limitações na utilização das proteínas na clínica se deve à dificuldade de administração por via oral. Atualmente, esta limitação ainda é estudada e discutida, sendo um assunto de intensa pesquisa. A via oral é a rota de administração de medicamentos de primeira escolha e a mais utilizada. No entanto, a instabilidade inerente das proteínas ao trato gastrointestinal, assim como a baixa permeabilidade através das membranas biológicas, devido à alta massa molecular e à superfície polar características, impossibilitam o uso desta via (FROKJAER e OTZEN, 2005; JORGENSEN *et al.*, 2006; SANTOS e FIALHO, 2007), sendo empregadas outras vias, que são mais inconvenientes ao paciente, como a parenteral. A estabilidade química e física das proteínas deve ser avaliada para a escolha do método de preparação da formulação, pois pode ser comprometida por fatores ambientais presentes nos processos de produção, como pH, temperatura, alta pressão, solventes não aquosos, íons metálicos e agitação, que podem levar a perda da atividade da proteína (SINHA e TREHAN, 2003; ALMEIDA e SOUTO, 2007). Assim, mesmo que a proteína ou peptídeo se mantenham intactos durante o armazenamento, testes *in vivo* são necessários para verificar se o efeito terapêutico se mantém estável. Nesse estudo, foi utilizado o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos para verificar a estabilidade do efeito antinociceptivo de *McLTP₁* frente às diferentes condições de armazenamento.

Como relatado por Campos *et al.* (2016), o efeito antinociceptivo de *McLTP₁* no tempo zero reduz significativamente o número de contorções abdominais em 82,70%, mesmo efeito observado para a proteína armazenada por 1 e 3 meses em todas as temperaturas avaliadas neste trabalho. Os dados de Campos *et al.* (2016) também mostraram a termoestabilidade da proteína, que foi capaz de manter 100% do efeito antinociceptivo mesmo após aquecida por 1 hora a 80 °C. Essa estabilidade de efeito antinociceptivo também foi observada por 6 meses, com exceção da proteína armazenada na temperatura ambiente (25 °C) por esse período, condição que gerou queda de mais de 25% do efeito. A ANVISA e EMEA consideram que uma mudança já é significativa quando há perda de 5% na potência em relação ao valor inicial do lote. Logo, essa condição não é considerada eficaz para o armazenamento de produto tendo *McLTP₁* como princípio ativo, havendo necessidade de mais testes com a adição de agentes estabilizantes.

A disponibilidade biológica de um fármaco depende de vários fatores incluindo as características físicas e químicas do fármaco, da forma de dosagem (por exemplo a natureza dos ingredientes adicionais que compõem a formulação farmacêutica), e o método de confecção do fármaco. A área de estudo que lida com as propriedades dos fármacos e as formas de

dosagem que influenciam a liberação do fármaco para exercer atividade biológica é a biofarmacêutica. O termo biodisponibilidade refere-se à fração da dose de fármaco administrada que entra na circulação sistêmica numa forma não alterada. Após a administração de um medicamento, amostras sanguíneas podem ser recolhidas do paciente em intervalos de tempo específicos, e o seu conteúdo em fármaco analisado. Os dados resultantes podem ser apresentados de modo a obter um gráfico da concentração do fármaco no sangue (ou plasma) em função do tempo (PAIVA e DUARTE, 2011).

Após a administração de *McLTP*₁ (8 mg/kg) pela via oral, houve um pico do efeito antinociceptivo após 2 horas de administração, tempo também em que foi observado um pico de detecção da proteína de $0,21 \pm 0,09 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($C_{\text{máx}}$), havendo uma queda sutil que não foi considerada significativa nesse estudo nos tempos subsequentes. Mesmo após 12 horas, ainda existe proteína disponível na circulação em quantidade significativa, que foi corroborado pela detecção de proteína no plasma dos animais tratados após 12 horas da administração. Foi possível também estimar que após 10 horas da administração de *McLTP*₁ houve queda de 50% do efeito farmacológico e após 24 horas não se detecta mais atividade alguma.

Dados sugerem que proteínas resistentes à digestão, conseguem ser absorvidas por meio de fagocitose ou por permeação entre as junções das células epiteliais (HAMMOND e COCKBURN, 2013). Campos *et al* (2016) sugere que *McLTP*₁ poderia exercer efeito antinociceptivo através da possível interação com receptores presentes no TGI (trato gastrointestinal), dessa forma, foi mostrado neste trabalho que a proteína consegue ultrapassar as barreiras do TGI e atingir a circulação sistêmica.

Tomando como base outros fármacos, como o ibuprofeno (Advil®), este atinge pico de concentração sérica ($C_{\text{máx}}$) de 39,03 mcg/mL em 47,4($\pm 28,8$) minutos ($T_{\text{máx}}$). A meia vida de eliminação já é detectada após 2 horas e a excreção é virtualmente completa 24 horas após a última dose. A sua ação se inicia em cerca de 10 a 30 minutos após a administração, com duração da ação analgésica e antitérmica de até 8 horas.

Os candidatos a fármacos que passam com sucesso pelos procedimentos iniciais de triagem e estabelecimento do perfil farmacológico devem ser cuidadosamente avaliados quanto aos riscos potenciais, antes e no decorrer dos testes clínicos. Esses riscos são monitorados por meio de testes pré-clínicos (BERKOWITZ, 2006). Os ensaios toxicológicos pré-clínicos representam a fase onde se identificam os perigos e se avalia o risco. A identificação dos perigos corresponde ao grau de severidade do novo composto no organismo bem como o potencial de reversibilidade ou irreversibilidade, ou seja, determina o tipo e o grau de toxicidade, estabelece a relação dose-resposta, fornece informação sobre a função da nova entidade química (NCE)

no órgão alvo e, na maioria das vezes, o modo de toxicidade. Findada a identificação dos perigos e a avaliação do risco, inicia-se a extrapolação dos dados para o ser humano (DENNY e STEWART, 2013). Nossos resultados mostram, até o momento, que *McLTP₁* apresenta grande potencial para uso no tratamento da inflamação e da dor. Contudo, o uso dessa proteína depende de estudos que comprovem segurança, descartando efeitos adversos já observados para outros analgésicos e antiinflamatórios comercializados.

Essa estabilidade conferida da maioria LTPs, acredita-se também estar associada com a sensibilização primária mediada pela interação da proteína com o sistema imune do epitélio gastrointestinal, o que representa um fator importante que contribui para as reações sistêmicas graves, muitas vezes observados em pacientes alérgicos (RAMAZZINA *et al.*, 2012). Na verdade, já foi mostrado que as LTPs estão entre os alérgenos mais significativos (BUHLER *et al.*, 2015), pelo fato de serem capazes de sensibilizar através do trato gastrointestinal. Sua reatividade à IgE é frequentemente associada a sintomas sistêmicos graves, incluindo anafilaxia em indivíduos sensibilizados (EGGER, *et al.* 2010; ASERO e PRAVETTONI, 2013). O dobramento da estrutura compacta dessas proteínas confere uma elevada resistência à desnaturação pelo calor (GAIER *et al.*, 2008; SANCHO *et al.*, 2005; SCHEURER *et al.*, 2004) e a digestão proteolítica (ASERO *et al.*, 2001; CAVATORTA *et al.*, 2010), o que aumenta a capacidade imunogênica e alergênica após a passagem através do trato gastrointestinal (RAMAZZINA *et al.*, 2012).

Lutif (2015) mostrou que a sequência *McLTP₁* N-terminal mostrou semelhança *in silico* com alérgenos de trigo, amendoim e kiwi. Os resultados também mostraram que houve um aumento significativo na síntese de IgG anti-*McLTP₁* na resposta humoral secundária em camundongos. Além do que já foi exposto sobre as garantias de segurança requeridas aos fármacos e diante desse potencial alergênico observado para *McLTP₁*, testes de toxicidade foram conduzidos de modo a esclarecer os possíveis efeitos colaterais após sua administração.

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ANVISA, 2013). Nesse estudo, a administração intragástrica de *McLTP₁* nas doses de 8 mg/kg não promoveu alterações em parâmetros comportamentais ou mesmo mortalidade entre os animais testados. Além disso, não foram observados sinais de toxicidade, incluindo-se alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade. Não havendo alterações na dose anterior, foi testada a dose de 80 de mg/kg, 10 vezes superior a anterior, assim como

sugerido pelo Guideline 423 da OECD. Nessa dose, também não foi observado qualquer sinal de toxicidade, indicando que, até o momento, *McLTP₁* está inserida na categoria 02 do Sistema de Classificação Harmonizado Global, ou seja, a dose oral letal média (DL50) está acima de 80 mg/kg.

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas (ANVISA, 2013). No teste de toxicidade em doses repetidas, *McLTP₁* foi administrada pela via oral na dose terapêutica (8 mg/kg). Essa dose foi escolhida por limitações de material de partida para purificar a proteína, já que uma dose 10 vezes superior administrada diariamente em todos os animais iria requerer uma quantidade excessiva de *McLTP₁*.

Após 28 dias de administração diária da proteína, não houve mortalidade ou qualquer alteração comportamental nos animais tratados. Também não foram observadas alterações anormais no ganho de peso e consumo de água e ração em relação ao grupo controle. Além de parâmetros comportamentais, foram avaliadas também mudanças em parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de camundongos. O tratamento com *McLTP₁* 8 mg/kg por 28 dias (v.o.) não provocou alterações nos parâmetros avaliados, exceto a contagem de plaquetas que ficaram abaixo do observado no grupo controle nos animais machos, entretanto, os valores encontrados ainda estavam de acordo com os valores de referência para camundongos (DINIZ, *et al.*, 2006).

Em relação aos órgãos vitais (rins, coração, pâncreas, fígado, intestino, pulmões e estômago) analisados no após os 28 dias de observação, não foram detectadas alterações no peso relativo dos mesmos, exceto o intestino dos machos tratados com a proteína em relação ao grupo controle, entretanto, a análise histopatológica não detectou alteração no intestino dos animais, tanto no grupo controle quanto ao tratado com o *McLTP₁*. Os rins, pâncreas, pulmões, fígado também se mantiveram dentro da normalidade. Sabe-se que inúmeras etiologias levam à formação de ulcerações gástricas, principalmente alterações sistêmicas, como as lesões diretas causadas pela ingestão de corpos estranhos e ação de fármacos, principalmente da classe de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) (CARNEIRO *et al.*, 2014), logo, a administração diária de *McLTP₁* não foi capaz de induzir lesões no estômago, normalmente causadas pelo uso dos AINES, os quais geram um desequilíbrio da secreção gástrica e do muco protetor estomacal, por redução da síntese das prostaglandinas pela inibição seletiva das COX1 e COX2. Sendo assim, em um processo de *drug discovery*, *McLTP₁* apresenta vantagens em relação aos

fármacos anti-inflamatórios já citados, por, até o momento, não ter apresentado sinais toxicidade bem como não gerar efeitos adversos comuns a esses fármacos.

Quando no organismo, a molécula ativa passará por diversos processos químicos de biotransformação que possivelmente originarão um ou mais produtos, sendo que alguns destes podem ser ou tornarem-se tóxicos. O estudo biológico do princípio ativo deve iniciar a partir da observação do mecanismo de ação dos componentes citotóxicos presentes na molécula e os testes *in vitro* são os eleitos para iniciar este tipo de avaliação (ROGERO *et al.*, 2003). Os estudos com cultura de células são passíveis de determinar efeitos citotóxicos dos materiais que permanecerão em contato com tecidos humanos e devem ser feitos através de técnicas rápidas, reprodutíveis e monitorados os efeitos ao longo do tempo experimental (SCHMALZ, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2006).

O teste do [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] (MTT) é baseado na propriedade de conversão deste sal solúvel e de coloração amarela em um composto (formazan) insolúvel e de coloração azul escuro. Tal reação ocorre somente em células viáveis e é geralmente atribuída à atividade das mitocôndrias, uma vez que a quantidade de formazan gerado depende do nível de atividade metabólica da célula (MOSSMANN, 1983) sendo assim, este teste pode ser utilizado para avaliação de alguns parâmetros como a viabilidade celular, proliferação de células vivas e também em análises de citotoxicidade. O teste do MTT proposto por Mosmann em 1983, trata-se de uma análise quantitativa colorimétrica uma vez que a quantidade de formazan formada pode ser diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), o que permite a leitura das amostras em espectrofotômetro. Cultura de hepatócitos humanos tem sido amplamente empregada como modelo *in vitro* em estudo de metabolismo de fármaco e toxicidade. Os motivos para a popularidade deste modelo incluem fatores éticos e econômicos, além do desenvolvimento de técnicas de cultura e isolamento de hepatócitos (DÁVILA, *et al.*, 1998). Dentre os modelos *in vitro* atualmente empregados, a cultura de hepatócitos é considerada a melhor aproximação da situação *in vivo* devido ao fato de preservar muitas características observadas no organismo humano. Utilizando o modelo mencionado, mesmo na concentração mais elevada (240 µg/mL), *McLTP₁* não foi capaz de causar citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3a) após 24 horas de estabilização celular. Entretanto, Lutif (2015) mostrou que a proteína mostrou atividade citotóxica seletiva contra células de câncer de ovário (IC₅₀: 16,6 µg/mL). Diante desses dados, seria interessante avançar nos testes citotóxicos e verificar o efeito em células normais.

Este estudo mostra uma perspectiva inicial de ensaios conduzidos no sentido de fornecer bases para a produção de um fármaco eficaz e seguro tendo *McLTP₁* como princípio

ativo. Entretanto, há um longo caminho até que se chegue à um patamar de efetiva segurança farmacológica. Novos testes de eficácia e toxicidade como toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (administração, distribuição, metabolismo e excreção – ADME), devem ser realizados assim como sugerem os órgãos regulamentadores.

O trabalho aqui apresentado, além da relevância para *McLTP₁*, pode servir de base para estudos subsequentes, tendo em vista que a condução dos experimentos aqui apresentados pode ser expandida para uma gama de moléculas com a ideia central de gerar perspectivas de aplicação como novas drogas.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que *McLTP₁* purificada das sementes de *Morinda citrifolia* L., a primeira LTP relatada com efeito contra inflamação e dor, apresenta estabilidade quando armazenada protegida da luz por até 06 meses, sob refrigeração, e na temperatura ambiente por até 3 meses, definindo-se assim um protocolo de estocagem desse princípio ativo. Além disso, a proteína não é capaz de gerar efeitos tóxicos, indicando que pode ser segura gerando perspectivas para produção de uma formulação.

Demonstrou-se, com ineditismo e originalidade que é possível viabilizar o uso de proteínas vegetais que tenham se mostrado seguras do ponto de vista toxicológico, além de promissoras considerando o seu efeito farmacológico, criando bases científicas para a inovação na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, republicada em 20 de junho de 2000. Regulamento técnico parafixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acesso em 10/02/2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Consulta Pública nº 43, de 7 de julho de 2004. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B7760-1-0%5D.PDF>. Acesso em: 25 ago. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Informe Técnico nº. 25, de 29 de maio de 2007, atualizado em 18 de junho de 2008. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda citrifolia*. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25_290507.htm. Acesso em: 14/05/2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2013.
- ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107-113, 1999.
- ALMEIDA AJ, SOUTO E. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems for peptides and proteins. **Adv Drug Del Rev.** 59(6):478-90. 2007.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Bot. Bras.** Volume. 16, número 2, p.189-203, 2002.
- ARAÚJO, D.; ONOFRE, S. Ação do extrato hidroalcoólico de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt. (Amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. América do Norte, 61 04, 2011.
- ARSATI, F. & VEIGA, M.C.F.A. Efeito do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido pelo óleo de mostarda na ATM de ratos. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. (1999).
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIER MF, CIURANA CLF. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. **Int Arch Allergy Immunol.** 124:67–9. 2001.
- ASERO, R., PRAVETTONI, V. Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** 13(4):379-85. 2013.

ASH, J., NOVAK, C., SCHEIDELER, S.E. The fate of genetically modified protein from Roundup Ready Soybeans in laying hens. **J Appl Poultry Res.** v. 12, p. 242 – 245, 2003.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

AULTON, M. E. Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas. **Artmed**; p. 6772 ed. Porto Alegre. 2005.

BAKSHI M, SINGH S. Development of validated stability indicating assay methods: critical review. **J Pharm Biomed Anal.** P. 28:1011– 40. 2002.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais - Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arq Bras Cardiol**, v. 94(4): 556-563, 2010.

BERNOIST, C.; MATHIS, D. Progress Mast cells in autoimmune disease. **Nature.** v. 420, p. 875-878 , 2002.

BEDSE, G., KUMAR, V., SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MS. **J Pharm Biomed Anal.** 2009; 49:55-63.

BERKOWITZ, B.A. Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.5, p.53-61. 2006.

BOOTHE, D. M. Anti-inflammatory drugs. In: BOOTHE, D.M. Small Animal Clin. Pharmacol Ther, Philadelphia: W.B. **Saunders Company**, p. 281-311, 2001.

BOUDREAU S. P.; MCELVAIN J.S.; MARTIN L.D.; DOWLING T.; FIELDS S.M. Method validation by phase of development an acceptable analytical practice. **Pharm Technol.** 28(11): 54-66. 2004.

BRAHMACHARI, G. Natural products in drug Discovery: impacts and opportunities – an assessment. cap. 1, pg 1-10. Universidade Visva-Bharati, Índia, 2012.

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.

BRETT J. WEST, STEPHEN K. PALMER, SHIXIN DENG, AFA K. PALU. Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. **Curr. Res. J. Biol. Sci.** v. 4, n. 1, p. 52–54, 2012.

BUHLER, S.; TEDESCHI, T.; FACCINI, A.; SFORZA, S. Isolation and full characterization of a potentially allergenic lipid transfer protein (LTP) in almond. **Food Additives & Contaminants: Part A**. V. 32 (5), p. 648-656. 2015.

BUI, A. K. T; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Pollysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1271-1275, 2006.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug Discovery. **Journal of Natural Products**. 67 (12) (2004), pp. 2141–2153, 2004.

CALSAMIGLIA, S.; HERNANDEZ, B.; HARTNELL, G. F.; PHIPPS, R.H. Effects of feeding corn silage produced from corn containing MON810 and GA21 genes on feed intake, milk production and composition in lactating dairy cows. **J Dairy Sci** 86(Suppl. 1):62(Abstr 247), 2003.

CAMPOS, D.C.O.; COSTA, A.S.; LIMA, A.D.; SILVA, F.D.; LOBO, M.D.P.; MOREIRA, A.C.O.M; MOREIRA, R. A.; LEAL, L.K.A.M.; MIRONC, D.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, D.H. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 71-79. 2016.

CARNEIRO, F. M.; da SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARROLL, J. D. The 15 best-selling drugs of 2012. **Fierce Pharma**. <http://www.fiercepharma.com/special-reports/15-best-selling-drugs-2012>. 2012.

CARVALHO J.P.; SANTOS A.S.; SÁ A.S.; TEIXEIRA C.S.; NOGUEIRA M.S. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. **Rev Farm Med.** ; V. 34(6), P. 22-7. 2005

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. **Peptides**. 28: 1144-1153, 2007

CAVALCANTI BC, COSTA-LOTUFO LV, MORAES MO, BURBANO RR, SILVEIRA ER, CUNHA, KMA et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil. **Food Chem Toxicol**. 44:388–92. 2006.

CAVATORTA, J.; PEREZ, K.; GRAY, S. M.; ECK, J. V.; YEAM, I.; JAHN, M. Engineering virus resistance using a modified potato gene. **Plant Biotechnology Journal**. V. 9 (9). p. 1014–1021. 2011.

CDB – CONVENÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA. Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, United Nations, 2015.

CHAHADE, W. H.; GIORGI, R. D. N.; SZAJUBOK, J. C. M. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**. 6ª ed. Supl 1, 2008.

CHAPLAN, S. R. Drug Discovery and development for pain. Cap. 18. 2010

CHAPMAN, C. R.; J. GAVRIN. **Suffering: the contributions of persistent pain**. Lancet, v.353, n.9171, Jun 26, p.2233-7, 1999.

CHEN, D.Y; STERN, S.A.; GARCIA-OSTA, A.; SUANIER-REBORI, B.; POLLONINI, G.; BAMBA-MUKKU, D.; BLITZER, R.D.; ALBERINI, C.M. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. **Nature**. 469:491-497.

COLLIER, H. O. J., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse.Br. **J. Pharmac. Chemother**, 1968. v. 32, p. 295-3 10.

CORREIA, A. A. S.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v. 22 (4), p. 609-615, 2011.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRAIG, D.; GOLDBERG, F.W., PETT, R. W., THOLEN, N. T. H.; WHITE A. J. P. Aziridine-based concise synthesis of (+/-)-alstonerine. **Chemical Communications**. v. 49, p. 9275-9277. 2013.

CRUZ, L.P. Isolation and partial characterization of a novel lipid transfer protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. **Protein Pept Lett**. 17(3):311-8. 2010.

DÁVILA, J.C.; RODRIGUES, R.J.; MELCHERT, R.B.; ACOSTA, J.; D. predictive value of in vitro model systems in toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.38, p.63-96. 1998.

DENNY, K.H.; STEWART, C. W. Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In Faqi, A, S. A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development. 1ª Edição. Amesterdã. **Editora Elsevier**. pp. 87-104. 2013.

DIAZ-PERALES, A. BLANCO, C.; SANCHES-MONGE, R. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) Ig-E-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 112 (5),1002-1007. 2003.

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.

Haematological and Biochemical Parameter Standardization of Swiss Mice and Wistar Rats. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. Volume 10 Número 2 Páginas 171-176. 2006

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

DJERASSI, C. Birth control after 1984. **Science**; 169:941., 1970.

DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* l.). **J. Ethnopharmacol.** v. 133, n. 1, p. 108–115, 2011.

EMA (European Medicines Agency). Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. 2003.

EMA (European Medicines Agency). Stability testing of new drug substances and products: Step 5. 2003.

EDSTAM MM, VIITANEN L, SALMINEN TA, EDQVIST J. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. **Mol Plant.** 4: 947–964. 2011.

FDA (Food and Drug Administration). Guidance for Industry S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. 2003.

FLETCHER, H.M.; DAWKINS, J.; RATTRAY, C.; WHARFE, G.; REID, M.; GORDON-STRACHAN, G. *Morinda citrifolia* (noni) as an anti-inflammatory treatment in women with primary dysmenorrhoea: a randomised double-blind placebo-controlled trial. **Obstet. Gynecol. Int.**, pp. 1–6. 2013.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. M. O., FERREIRA, L. A. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP, 2006.

FRICKER, G. e DREWE, J. Current concepts in intestinal peptide absorption. **J. Pept. Sci.** v. 2, p. 195, 1996.

FROKJAER, S.; OTZEN D. E. Protein drug stability: a formulation challenge. **Nat Rev Drug Discov.** 4(4):298-306. 2005.

FUOCO, D. Cytotoxicity Induced by Tetracyclines via Protein Photooxidation. **Advances in Toxicology**. Volume 2015, 10 pages. 2015.

GAIER, S., MARSH, J., OBERHUBER, C., RIGBY, N.M., LOVEGROVE, A., ALESSANDRI, S., BRIZA, P., RADAUER, C., ZUIDMEER, L., VAN REE, R., HEMMER, W., SANCHO, A.I., MILLS, C., HOFFMANN-SOMMERGRUBER K,

SHEWRY, P.R. Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. **Mol Nutr Food Res.** 52:S220-S229. 2008

GARCIA-VILAS JA, MEDINA MA, MELO FR, PEJLER G, GARCIA-FAROLDI G. Damnacanthal inhibits IgE receptor-mediated activation of mast cells. **Mol Immunol.** 65(1):86-93. 2015.

GIESECKE, T.; LOESER; TREEDE. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 5, p. 1577-1584, 2008.

GEYSEN , H.M., SCHOENEN, F., WAGNER, R. , WAGNER , D. Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2 (3) (2003), pp. 222–230, 2003.

GOLDIM, J. R. investigational new drugs and ethical review: the adequacy of clinical research phases. **Seção de Bioética.** 2007.

HAN, G.W., LEE, J.Y., SONG, H.K., CHANG, C., MIN, K., MOON, J., SHIN, D.H., KOPKA, M.L., SAWAYA, M.R., YUAN, H.S. Structural basis of nonspecific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **J. Mol. Biol.** 308:263–278. 2001.

HAMMOND, B. E COCKBURN, A. The Safety Assessment of Proteins Introduced into Crops Developed through Agricultural Biotechnology:A Consolidated Approach to Meet Current and Future Needs. **Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology.** Cap. 11, p. 260-259, 2013.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; McCLEMENTS, D. J. Characterization of b-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions. A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids.** Amsterdam, v. 20, n.5, p. 577-585, 2006.

HEALTH CONCERNS. Pain (Chronic) – Nociceptive Pain and Inflammation. 2016.

HUANG, H.L.; LIU, C.T.; CHOU, M.C.; KO, C.H.; WANG, C.K. Noni (*Morinda citrifolia* L.) Fruit Extracts Improve Colon Microflora and Exert Anti-Inflammatory Activities in Caco-2 Cells. **J Med Food.** Jun;18(6):663-76. 2015.

INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS (IPDFARMA). 9º ENIFarMed - Boletim nº 2: Brasil avança na produção de biofármacos. **IPDFARMA.** 2015

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). IASP taxonomy. Washington, D.C., 2012.

IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). Compendium of chemical terminology. 2 nd Ed. (the “Gold Book”). Compiled by McNaught, A.D e Wilkinson, A. Blackwell Scientific Publications. **Oxford.** 1997.

JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **Int. J. Integr. Biol.**, v.3, n. 1, p. 44. 2008.

JENNINGS, J. C.; ALBEE, L. D.; KOLWYCK, D. C.; SURBER, J. B.; TAYLOR, M. L.; HARTNELL, G. F.; LIRETTE, R. P.; GLENN, K. L. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer corn. **Poult Sci.** 82:371 – 380, 2003.

JOHNSTON, C.F., SHAW, C., BUCHANAN, K. D. Vincristine-induced abnormalities of gastrointestinal regulatory peptide cells of the rat. An immunocytochemical study. **Cell Tissue Res.**, v.239, n. 1, p. 29-33, 1985.

JORGENSEN L, MOELLER EH, VAN DE WEERT M, NIELSEN HM, FROKJAER S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. **Eur J Pharm Sci.** 29(3-4):174-82. 2006.

JULIUS, D. & A. I. BASBAUM. **Molecular mechanisms of nociception.** Nature, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.

KADER J.C., Lipid-transfer protein in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 627–654.

KALLA, SHIMAMOTO, R., K., POTTER, R., NIELSEN, P.S., LINNESTAD, C., OLSEN, O.A. The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic Rice **Plant J.**,v. 6, pp. 849–860, 1994.

KAPOOR, N., KHANDAVILLI, S., PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal.** V. 41, P. 761–5. 2006.

KATIYAH, C., GRUPTA, A., KANJILAL, S. e KATIYAH, S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu.** 33(1): 10–19. 2012.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacology e Therapeutics Journal**, v. 78, N° 3, p. 167-209, 1998.

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C.; How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta.** 1751(2):119-39. 2005.

KUMAR, V.; MALIK, S.; SINGH, S. Polypill for the treatment of cardiovascular diseases Part 2. LC–MS/TOF characterization of interaction/degradation products of atenolol/lisinopril and aspirin, and mechanisms of formation thereof. **J Pharm Biomed Anal.** V. 48, P. 619-28. 2008.

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

- LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews – Drug Discovery**. V. 7, 2008.
- LEY, S.V. e BAXENDALE, I.R. New tools and concepts for modern organic synthesis. **Nature Reviews Drug Discovery**, 1 (8), pp. 573–586, 2002.
- LIN, Y.; CHANG, Y.; YANG, D.; TZANG, B.; CHEN, Y. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. **Food Chem.**, v. 140 n. 1–2, p. 31–38, 2013.
- LINDORFF-LARSEN, K., WINTER, J. R., (2001), "Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards dénaturant, heat and proteases", **FEBS Lett.**, 488:3, pp. 145-148.
- LINS, L; BRASSEUR, R. The hydrophobic effect in protein folding. **Faseb J.** 9(7):535-40. 1995.
- LOMBARDINO, J. G., LOWE, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**,v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.
- LOPEZ-OTIN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumour supression. **Nat. Rev. Cancer**. v. 7(10), p. 800-8, 2007.
- LUBECK, W; HANNES, H. Noniel valioso tesoro de los mares delsur. **Madrid: EDAF S. A.**, p.173, 2001.
- LOUIS-JEUNE, C; ANDRADE-NAVARRO, M.A., PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins**. 80(2):374-81. 2012.
- LUENGO, M.B. A historical revision of the main immunological events and pharmacology in the search of the understanding and treatment of inflammatory diseases. **Revista Eletrônica de Farmácia**; 2005; Vol 2 (2), p.64-72.
- LUTIF, C.C. Caracterização bioquímica e avaliação das atividades citotóxica e alergênica de uma proteína transferidora de lipídeos isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará. 2015.
- LV, L.; CHEN, H.; HO,C.; SANG, S. Chemical components of the roots of noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects. **Fitoterapia**. v. 82, n. 4, p. 704–708, 2011.
- McCLATHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v.1, n. 2, p. 110-120, 2002.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C.

O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001, p. 145-175.

MAMEDE, L.C.; CAETANO B.L.; ROCHA, L.A.; FERREIRA, E.M.; CESTARI, A.; KFURI, C.R.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S.; MELLO, C.; CUNHA, W.R.; NASSAR, E.J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 27(2):151-5. 2006.

MANDUKHAIL, S.U., AZIZ, N., GILANI, A.H. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. **Lipids Health Dis.** 9:88.. 2010.

MASUDA, M.; MURATA, K.; FUKUHAMA, A.; NARUTO, S.; FUJITA, T.; UWAYA, A.; ISAMI, F.; MATSUDA, H. Inhibitory effects of constituents of *Morindacitrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. **Journal Natural of Medicine**, v. 63, p. 267–273, 2009.

MATSUDA, K.; AOKI, J.; UCHIDA M.K.; SUZUKI-NISHIMURA, T. *Datura stramonium* agglutinin released histamine from rat peritoneal mast cells that was inhibited by pertussis toxin, haptenic sugar and N-acetyl-glucosamine specific lectins: Involvement of glycoproteins with N-acetylglucosamine residues. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 66, p. 195–204, 1994.

MATSUDA, HIDEAKI, MASUDA, MEGUMI, MURATA, KAZUYA, ABE, YUMI, UWAYA, AKEMI, 2013. Study of the anti-photoaging effect of noni (*Morinda citrifolia*), Melanoma – From Early Detection to Treatment. **J. Tradit. Med.**, v. 28 n. 2, p. 47–54. 2013.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S. AND WOLFGANG, V. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology & Hepatology** 17 (4): 445-447, 2005.

MORAES, G.P; ALENCAR, M.V.O.; ISLAM, M. T.; ARAÚJO, L. S.; GOMES, D.C.V.G.; CARVALHO, R.M.C; CORREIA, D.; PAZ, M.F.C.; FERREIRA, P.M.P.; CAVALCANTE, A.A.C.; PICADA, J.N.; FERRAZ, A.; GRIVICICH, I. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Journal of Medicinal Plants Research**. Vol.10(2), pp. 18-28. 2016.

MORTON, J. F. The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of it's "colourful" relatives. **Ecological Botany**, v. 46, p. 241-256, 1992.

MOTA, M. R. L., CRIDDLE, D. N., ALENCAR, N. M. N., GOMES, R. C., MEIRELES, A. V. P., GADELHA, T. S., GADELHA, C. A. A., OLIVEIRA, C. C., BENEVIDES, R. G., CAVADA, B. S., ASSREURY, A. M. S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 1-10, 2006.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**.65(1-2):55-63.1983.

MURATA, K.; ABE, .; SHINOHARA, K.; FUTUMARA-MASUDA, M.; UWAYA, A.; ISAMI, .; MATSUDA, H. Anti-allergic activity of the *Morinda citrifolia* extract and its constituents. **Pharmacognosy**; 6(3): 260–265. 2014.

MURRAY, P.E.; MURRAY, R.M.; NAMEROW, K.N.; KUTTLER, S.; GARCIA-GODOY, F.. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. **J. Endod.** v.34, n.1, p. 66–70, 2008.

NAYAK, S.; MENGI, S. Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. **Pharmaceutical biology**. 48(7), P. 724-731. 2010

NELSON, S.C. Noni seeds handling and seedling production. Fruits and nuts. **Cooperative extension service/CTAHR**, University of Hawaii at Mānoa. 2005.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug Discovery. **Natural Product Reports**, 17 (3) (2000), pp. 215–234, 2000.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M.. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, 66 (7) (2003), pp. 1022–1037, 2003.

NOBLE, R.L., BEER, C.T., CUTTS, J.H. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. **Ann N Y Acad Sci**. 5;76(3):882-94. 1958

NUALSANIT, P. ROJANAPANTHU, W. GRITSANAPAN, S.H. LEE, D. LAWSON, S.J. BAEK. *Damnacanthal*, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. **J. Nutr. Biochem.** v. 23, n. 8, p. 915–923, 2012.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H; MOURA, T.R.; TEIXEIRA, C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379 (6), p. 609-16, 2009.

OECD Guideline for the testing of chemicals 407 – Repeated Dose 28 - Day Oral Toxicity Study in Rodents (2008).

OECD Guideline for the testing of chemicals 423 – Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method (2001).

OLIVEIRA, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March E seus principais constituintes, mistura de alfa e beta amirina. **Dissertação** (Pós-Graduação em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Traditional medicine: definitions**. 2008.

PAIVA, S. C. A.; DUARTE, S.A.F. Manual de Farmacologia. Licenciatura em Optometria e Ciências da Visão. 2011.

PALU, A.K.; WEST, B.J.; JARAKAE J. C. Noni seed oil topical safety, efficacy, and potential mechanisms of action. *J. Cosmet., Dermatol. Sci. Appl.*, v. 2, n. 2, p. 74–78, 2012.

PASTORELLO EO, POMPEI C, PRAVETTONI V, FARIOLI L, CALAMARI AM, SCIBILIA J, et al. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 8C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind. Placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:775–83.

PATEL, A.; KAMARIYA, Y. H.; PATEL, M. B. Identification of residues in chromodomain helicase DNA-binding protein 1 (Chd1) required for coupling ATP hydrolysis to nucleosome sliding. *J Biol Chem.* 286(51):43984-93. 2011

PEDERSEN, S., O'BYRNE, P. A comparison of the efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. *Allergy*, v. 52, p. 1–34, 1997.

PEIXOTO, E.P. Previsão da solubilidade de fármacos orgânicos em água, baseado na relação quantitativa entre estrutura molecular e propriedades in silico. **Dissertação**. Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás. 2010.

PEREIRA, M. A. S. Estudo da atividade antinociceptiva da adenosina em camundongos – análise do mecanismo de ação. Itajaí, 2005. **Dissertação** (Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí.

PFIZER. Manual: Medicamentos biológicos e biossimilares. 2014.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, v. 26, p. 211-223, 1996.

RAMAZZINA, I.; AMATO, S.; PASSERA, E.; SFORZA, S.; MINISTRELLO, G.; BERNI, R.; FOLI, C. Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein from pear. *Gene.* 491:173-181. 2012.

RANG, H.P. & DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. Ed. **Elsevier**. São Paulo. 2008. p. 226.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, F.J.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MICHEL, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharm Technol.* V. 26(2) P. 48-56. 2002.

ROGERO, S.O.; LUGAO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res.* 6(3):317- 320. 2003

ROBBINS, S. S.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. *Patologia: bases patológicas das doenças*. **Elsevier**, Rio de Janeiro, 8ª ed., 2010.

- ROBERTS, P. R., BURNEY, J. D., BLACK, K. W., ZALOGA, G. P. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. **Digestion**. v. 60, p. 332, 1999.
- RODRIGUEZ, F. M.; PINEDO, M. D. Mito y realidad de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Rev. Cubana Plantas Méd.**, v. 9, n. 3, 2004.
- ROWINSKY, E.K.; DONEHOWER, R.C. Paclitaxel (taxol). **N Engl J Med**. v. 332 p. 1004–14, 1995.
- SAGHIRI, M. A.; GARCIA-GODOI, F.; ASGAR, K.; LOFTI, M. The effect of *Morinda citrifolia* juice as an endodontic irrigant on smear layer and microhardness of root canal dentin. **Oral Sci. Int.** v. 10 n. 2, p. 53–57, 2013.
- SANTOS R. M. M.; FIALHO, S. L. Nanopartículas: uma alternativa para a administração de biofármacos. **Biociencia Cienc Desenvolv.** 2007;37:52-9.
- SELS, J.; MATHYS, J.; CONINCK, B.M.A.D.; CAMMUE, B.P.A.; BOLLE, M.F.C.D.. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**. V. 46,p. 941-950, 2008.
- SALCEDO G, SANCHEZ-MONGE R, DIAZ-PERALES A, GARCIA-CASADO G, BARBER D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. **Clin Exp Allergy**. 34(9):1336-41. 2004.
- SALCEDO, G., SANCHEZ-MONGE, R., BARBER, D., AZ-PERALES, A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. **Biochim. Biophys. Acta** 1771, 781–791. 2007.
- SANCHO, A. I., RIGBY, N. M., ZUIDMEER, L., ASERO, R., MISTRELLO, G., AMATO, S., 520 GONZALEZ-MANCEBO, E., FERNANDEZ-RIVAS, M., VAN REE, R., & MILLS, E. N. C. 521 The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid 522 transfer protein from apple, Mal d 3. **Allergy**, 60, 1262–1268. 2005.
- SCHEURER S, LAUER I, FOETISCH K, MONCIN MS, RETZEK M, HARTZ C. Strong allergenicity of Pru a 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. **J Allergy ClinImmunol**. 114:900–7. 2004.
- SCHMALZ G, SCHUSTER U, KOCH A, SCHWEIKL H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. **J Endod**. 28(3):188-92. 2002.
- SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.;
- ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. V. 30(2), p. 129-135. 2009.
- SILVA, M. C. C.; SILVA, A. B.; TEIXEIRA, F. M. Therapeutic and Biological Activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 332-336, 2010.

SINHA VR, TREHAN A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **J Control Release**. 90(3):261-80. 2003.

SOUSA , J.A.; AQUINO, A. R. L.; FREIRE, F. C. O. F.; NETO, P. A. F. S.
Comunicado técnico: produção de mudas de noni (*Morinda citrifolia* L.). **EMBRAPA**.
ISSN 1679-6535. Fortaleza. 2010.

SOUZA, A.A. *McLTP₁* (*Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1): efeito antimicrobiano *in vitro* e atividade protetora sobre a sepse induzida em camundongos. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SIMÕES, C.M.O.S.E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul, 2001.

STADLBAUER, V.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; SCHMERLAIB, J.; KRISPER, P.; TRAUNER, M.; STAUBER, R. E. Hepatotoxicity of Noni juice: Report of two cases. **World Journal Gastroenterology**. 11 (30): 4758-4760, 2005.

SU, C., WANG, M.Y., NOWICKI, D., JENSEN, J., ANDERSON, G. Selective cox-2 inhibition of *Morinda citrifolia* (Noni) *in vitro*. In: The Proceedings of the Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer. **Inflammation and Related Disease**. The 7th Annual Conference, Loews Vanderbilt Plaza, Nashville, Tennessee, USA. 2001.

TABORIANSKI, A.M. Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas. **Dissertação**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

TEIXEIRA, M. J. Mecanismos de ocorrência de dor. **Ver. Med.** (São Paulo), 80 (Ed. Esp. PT.1), p.22-62, 2001.

UHLIG, T.; KYPRIANOU, T.; MARTINELLI, F.G.; APPICI, C. A.; HEILIGERS, D.; HILLS, D.; CALVO, X. R.; VERHAERT, P. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics** .v. 4, p. 58–69, 2014.

VAN REE, R. Clinical importance of non-specific histamine release: Fc receptors, antibodies and allergens. Immunotherapy in asthma. Marcel Dekker. New York, 399-409. **Lung Biology and Health and disease**. V. 136, 1999.

VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENAÇOLLI, S. J.; TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **O Agrônomo**, v. 57, p. 20-21, 2005.

VEHABOVIC, M., HADZOVIC, S., STAMBOLIC, F., HADZIC, A., VRANJES, E., HARACIC, E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **Int J Pharm**.256:109–15. 2003.

WANG W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Int J Pharm.** V. 185(2), P.129-88. 1999.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. Review. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, p. 1127–1141, 2002.

WEST, B. J.; PALMER, S. K.; DENG, S.; PAULO, A. K. Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. **Curr. Res. J. Biol. Sci.** v. 4, n. 1, p. 52–54, 2012.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, p.1765-1769, 2000.

WU, A.M.; WU, J.H.; LIU, J.H. SINGH, T. Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). **Life Sci.**, v. 74, n. 14, p. 1763-1779.

YANG, X.; JIANG, M.; Hsieh, K.; LIU, J. Chemical Constituents from the Seeds of *Morinda citrifolia*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 7, p. 119-122, 2009.

YONEMOCHI C, FUJISAKI H, HARADA C, HANAZUMI M. Evaluation of transgenic event CBH 351 (Starlink) corn in broiler chicks. **Anim Sci J.** v. 73, p.221 – 228, 2002.

YU, H.; LI, S.; HUANG, M.; HO, C. Antiinflammatory Constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) Fruits. *American Chemical Society*, v. 987, p. 179-190, 2008.
YOUNOS, C. e col. Analgesic and Behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Medica.** v. 56, p. 430 – 434, 1990.