



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANA CAROLINA LINHARES BRAGA

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DE
EXTRATOS E FRAÇÕES NEMATICIDAS DE *Moringa oleifera* EM
CAMUNDONGOS”**

SOBRAL – CE

2018

ANA CAROLINA LINHARES BRAGA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DE
EXTRATOS E FRAÇÕES NEMATICIDAS DE *Moringa oleifera* EM
CAMUNDONGOS**

Exame de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça
Co-orientadora: Dra. Hévila Oliveira Salles

SOBRAL – CE

2018

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)

- B792a Braga, Ana Carolina Linhares.
Avaliação da toxicidade e do trânsito gastrointestinal de extratos e frações nematicidas de Moringa oleifera em camundongos / Ana Carolina Linhares Braga. – 2018.
56 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2018.
Orientação: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça.
Coorientação: Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles.
1. Moringa. 2. Testes toxicológicos. 3. Esvaziamento gástrico. I. Título.

CDD 660.6

ANA CAROLINA LINHARES BRAGA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DE
EXTRATOS E FRAÇÕES NEMATICIDAS DE *Moringa oleifera* EM
CAMUNDONGOS**

Exame de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Macromoléculas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça (Orientador)
Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral

Dra. Hévila Oliveira Salles (Co-orientadora)
Embrapa Caprinos e Ovinos

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral

A Deus e Nossa Senhora.
Aos meus pais, Afrânio e Cristina.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus e Nossa Senhora**, por serem meus combustíveis diários, por todas as bênçãos derramadas sobre mim e por me darem forças e ensinamentos durante toda a caminhada do mestrado.

À minha mãe, **Cristina**, Minha Cris, a luz da minha vida, por acreditar mais em mim do que eu mesmo acredito, por lutar com unhas e dentes pela minha felicidade e por todo o auxílio durante esta caminhada, sem o seu apoio tudo seria diferente e mais difícil, a você dedico este trabalho.

Ao meu pai, **Afrânio**, homem sábio com quem aprendi desde pequena, princípios exímios como humildade, responsabilidade e honestidade, que me nortearam durante toda a vida e me fizeram chegar até aqui.

Aos meus irmãos, **Bibo e Fífilho**, por tanto amor dedicado a mim e por ter a certeza que a minha felicidade também é a de vocês.

Aos meus Avôs, **Marta e João** (*in memorian*), **Quitéria e Simplício** (*in memorian*), por terem formado minha família com bases sólidas, onde o amor e a fé em Deus são peças fundamentais e indispensáveis em qualquer circunstância.

Ao meu orientador, **Dr. Ronaldo**, por ter me aceitado no seu grupo, por ter embarcado nas minhas idéias e por todos os ensinamentos durante esta jornada, sempre disponível para me auxiliar.

À minha co-orientadora, ou mãe científica, **Dra. Hévila**, como sou grata a você por todos os anos de ensinamentos, desde a iniciação científica e por ser tão disponível para ajudar, sou uma fã e admiradora sua.

À Dra. **Lissiana**, por ter aceitado participar da banca, por todas as sugestões e observações feitas e por sempre auxiliar todos nós que fazemos parte do Laboratório de fisiologia e neurociências.

ÀCAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio para a realização desta pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, em especial, **Professor Igor**, coordenador e **Edilda** pela ajuda durante todo o curso.

Ao meu querido IC **Marcos**, por toda a ajuda durante os experimentos, tanto prática como também psicológica e por sempre ser tão disponível e tornar os dias de trabalho mais leves.

Às minhas amigas de mestrado **Nayara e Débora**, por toda a ajuda durante os experimentos, por todos os conhecimentos compartilhados, vocês foram indispensáveis para a conclusão deste mestrado, serei eternamente grata.

Às amigas que construí durante o mestrado, por todos os conhecimentos e momentos compartilhados, **Helô, Bianca** e em especial a minha amiga querida que se faz sempre presente, **Jessyca**.

A todos que fazem parte do laboratório de fisiologia e neurociências, que foram fundamentais para a realização dos experimentos, **Helenira, Sara, Paulo, Igor, Larissa, Monalisa**, em especial ao **Francisco**, técnico do laboratório, por estar sempre disponível e disposto para me ajudar.

À minha amiga e irmã científica, **Marjory**, por sempre estar disposta a me ajudar e por compartilhar conhecimentos e experiências, desde a iniciação científica que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de histologia e agora professor do mestrado, **Anderson Weyne**, por todo o auxílio durante a preparação das lâminas de histologia e por sempre estar disponível, você foi indispensável.

À minha professora de patologia da faculdade, **Rafaelly Siqueira**, pela ajuda durante a leitura das lâminas e por todo o conhecimento compartilhado.

À minha **Letinha**, minha segunda mãe, por sempre torcer por mim e vibrar com minhas conquistas e também porque me deu uma segunda família, **Gilson, Sarah e Gilson Filho**, onde o amor e os momentos compartilhados foram fundamentais para me dar forças e continuar a caminhada.

À minha grande amiga e irmã, **Monyk**, por toda a torcida e apoio, tanto nos experimentos, mesmo no final de semana, como psicológico me dando ânimo e forças para terminar este trabalho.

À todas as minhas amigas de longas datas, que sempre torceram pelas minhas conquistas, por todos os momentos compartilhados e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, em especial, **Dani, Gabi, Rillary, Taís, Isabela, Andreza, Cibele**.

Deixo aqui meu respeito a todos os animais que doaram a vida por este trabalho.

À todos vocês, **MUITO OBRIGADA!**

***“A palavra de Deus pode abrir o mar, se o
senhor prometeu é só nele esperar.”
-Autor desconhecido.***

RESUMO

Moringa oleifera é uma planta com uma quantidade elevada de moléculas com atividades biológicas relacionadas, atraindo pesquisas para comprovarem e justificarem seu uso farmacológico. Como exemplo, a planta vem sendo avaliada no controle de nematoides gastrintestinais em caprinos, parasitos que causam perdas de produção e os tratamentos disponíveis (antihelmínticos) desencadeiam resistências nos mesmos. Porém, faltavam estudos que avaliassem a segurança, a dose adequada e os reais efeitos gastrintestinais de frações das sementes dessa planta com atividade nematicida. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda, subcrônica e o trânsito gastrintestinal, em camundongos, de extratos e frações de sementes de *Moringa oleifera* com atividade nematicida comprovada. O extrato bruto aquoso (Exb) foi produzido a partir de sementes de *M. oleifera* com casca, liofilizado. Para obtenção dos compostos secundários (C2) o EXB foi fracionado com etanol PA. Após centrifugação o sobrenadante gerou C2 e o pellet a fração protéica, essa foi fracionada por diálise (D12). O potencial nematicida foi determinado a partir do teste de eclosão de ovos de caprinos *in vitro*. Para os testes toxicológicos em camundongos, agudo (única administração) e subcrônico (administração por 14 dias), os animais receberam por gavagem oral concentração diferente (5, 50, 300 mg/Kg, com adição da dose de 2000 mg/Kg no teste de toxicidade aguda) do extrato, D12, C2 ou então água destilada (grupo controle). Ao final do experimento foram realizados testes bioquímicos (creatinina, ALT e AST) e histológicos. Para análise do trânsito gastrintestinal foi realizado o teste de esvaziamento gástrico (EG). Os tratamentos (Exb, D12 e C2) demonstraram alto potencial nematicida com taxas de inibição da eclosão maiores que 93%. Nenhum dos grupos experimentais apresentou toxicidade evidente com taxas de sobrevivência de 100% tanto com administração única como repetida, níveis séricos de enzimas hepáticas e renais sem diferenças estatísticas do controle e histologia sem alterações. No teste de EG houve um aumento da retenção gástrica apenas na dose de 300 mg/Kg dos tratamentos com Exb e C2. O extrato, D12 e C2 de sementes de *M. Oleifera*, com atividade nematicida comprovada, não apresentaram toxicidade, constatando elevada segurança de administração tanto em dose única como repetida e não causaram alterações no trânsito gastrintestinais relevantes, justificando assim seu uso farmacológico.

Palavras-chave: Moringa; Testes toxicológicos; Esvaziamento gástrico.

ABSTRACT

Moringaoleifera is a plant with a high amount of molecules with related biological activities, attracting research to prove and justify its pharmacological use. As an example, the plant has been evaluated in the control of gastrointestinal nematodes in goats, parasites that cause production losses and available treatments (anthelmintics) trigger resistance in them. However, studies were lacking that evaluated the safety, the adequate dose and the actual gastrointestinal effects of fractions of the seeds of this plant with nematicidal activity. The objective of this study was to evaluate the acute, subchronic and gastrointestinal toxicity in mice of extracts and fractions of *Moringaoleifera* seeds with proven nematicidal activity. The crude aqueous extract (Exb) was produced from *M. oleifera* seeds with bark, lyophilized. To obtain the secondary compounds (C2) the EXB was fractionated with ethanol PA. After centrifugation the supernatant generated C2 and the pellet the protein fraction was fractionated by dialysis (D <12). The nematicidal potential was determined from the in vitro goat egg hatch test. For toxicological tests in mice, acute (single administration) and subchronic (administration for 14 days), the animals received different concentrations (5, 50, 300 mg / kg, with a dose of 2000 mg / kg in the test of acute toxicity) of the extract, D12, C2 or else distilled water (control group). At the end of the experiment, biochemical tests (creatinine, ALT and AST) and histological tests were performed. Gastric emptying test (EG) was performed to analyze the gastrointestinal transit. The treatments (Exb, D12 and C2) demonstrated high nematicidal potential with hatch inhibition rates higher than 93%. None of the experimental groups had evident toxicity with 100% survival rates both with single and repeated administration, serum levels of liver and kidney enzymes without statistical difference in control and histology without changes. In the EG test there was an increase in gastric retention only at the dose of 300 mg / kg of Exb and C2 treatments. The extract, D12 and C2 from *M. Oleifera* seeds, with proven nematicidal activity, showed no toxicity, showing high administration safety both in single and repeated doses and did not cause relevant gastrointestinal transit changes, thus justifying its pharmacological use.

Keywords: Moringa; Toxicological tests; Gastric emptying.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema utilizado para avaliação do *screening hipocrático*, onde os números 1 a 5 indicam a quantidade de animais acometidos pelas alterações comportamentais estudadas.....32

Tabela 2: Taxa de sobrevivência e alterações comportamentais em camundongos tratados com Exb (Extrato bruto), D12 (Fração protéica) e C2 (Compostos secundários) nas doses 5, 50 e 300 mg/Kg ao longo dos 14 dias de tratamento.....38

Tabela 3: Peso dos órgãos dos animais após exposição repetida por 14 dias de Extrato bruto (Exb), Fração protéica (D12) e compostos secundários (C2) de *M. oleifera* em três doses: 5, 50 e 300 mg/Kg. Dados são apresentados como média \pm E.P.M.). (ANOVA, Newman-Keuls).....41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração do ciclo de vida dos nematóides gastrintestinais de caprinos. Com eliminação de ovos nas fezes, larvas infectam o ambiente, contaminando pastagens.....21
- Figura 2:** *Moringa oleifera*(planta adulta).....23
- Figura 3:** Semestes de *M. oleifera* com casca.....27
- Figura 4:** Esquema da metodologia de extração e fracionamento de sementes de *M. oleifera* com casca. Exb C/C: Extrato bruto com casca; C2: Compostos Secundários.....28
- Figura 5:** Fluxograma descrevendo metodologia do teste de toxicidade aguda descrito pela OECD 421; 0,1,2,3: número de animais mortos; GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado.....30
- Figura 6:** Linha do tempo do teste de toxicidade em camundongos após administração de extratos e frações de *M. Oleifera*.....31
- Figura 7:** Após a eutanásia do camundongo submetido ao teste de EG, demonstrando estômago e o comprimento total do intestino que foi separado em partes iguais. Círculo amarelo indica o estômago. Reta amarela indica a divisão do intestino em proximal e distal.....33
- Figura 8:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS, de extratos e frações de sementes de *Moringa oleifera*. Bandas protéicas coradas com Coomassie Brilliant Blue G250 e contendo 5µg de proteínas. M: Marcador de massa molecular; Exb: Extrato bruto; D12: Fração proteica menor que 12 kDa; C2: Compostos secundários.....35
- Figura 9-** Taxa da inibição da eclosão dos ovos de helmintos quando em contato com os tratamentos (5mg /0,5 ml). Exb: Extrato bruto; D12: Fração proteica menor que 12 kDa; C2: Compostos secundários. * p<0,05 em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....36
- Figura 10:** Níveis séricos de AST em camundongos machos e fêmeas tratados com Água (controle), Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleifera* (300 mg/Kg). * p<0,05 em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....39
- Figura 11:** Níveis séricos de ALT em camundongos machos e fêmeas tratados com Água (controle), Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleifera* (300 mg/Kg). * p<0,05 em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....39
- Figura 12:** Níveis séricos de creatinina em camundongos machos e fêmeas tratados com Água (controle), Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleifera* (300 mg/Kg). * p<0,05 em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....40

Figura 13: Análise histopatológica do coração (400x, coloração HE). A: Controle, B: Extrato bruto 300 mg/Kg, C: Fração Protéica 300 mg/Kg, D: Compostos secundários 300mg/Kg. Cardiomiócitos dentro do padrão da normalidade, com eosinifilia citoplasmática típica e núcleos basofílicos preservados.....42

Figura 14: Análise histopatológica do fígado (400x, coloração HE). A: Controle, B: Extrato bruto 300 mg/Kg, C: Fração Protéica 300 mg/Kg, D: Compostos secundários 300mg/Kg. Hepatócitos dentro do padrão da normalidade, com binucleação típica e presença de capilares sinusóides (S) característicos.....42

Figura 15: Análise histopatológica do rim (400x, coloração HE). A: Controle, B: Extrato bruto 300 mg/Kg, C: Fração Protéica 300 mg/Kg, D: Compostos secundários 300mg/Kg. Presença de Glomérulos renais (GR) e túbulos contorcidos (*) proximais e distais com padrões de morfologia dentro da normalidade.....43

Figura 16: Retenção fracional no estômago do corante vermelho de fenol, após 15 minutos de administração. Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleiferanas* doses 50 e 300 mg/Kg. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....44

Figura 17: Retenção fracional do corante vermelho de fenol no intestino proximal, após 15 minutos de administração. Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleiferanas* doses 50 e 300 mg/Kg. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....44

Figura 18: Retenção fracional do corante vermelho de fenol no intestino distal, após 15 minutos de administração. Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleiferanas* doses 50 e 300 mg/Kg. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Exb	Extrato bruto
D12	Fração Proteica com massa molecular menor que 12 kDa
C2	Compostos Secundários
OMS	Organização Mundial de Saúde
kDa	Kilodaltons
EG	EsvaziamentoGástrico
TGI	TrânsitoGastrintestinal
WSMoL	Lectina de moringa solúvel em água
<i>M. oleifera</i>	<i>Moringaoleifera</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
h	Horas
min	minutos
SDS	dodecil-sulfato de sódio
mm	milímetros
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
mg	Miligramas
Kg	Kilogramas
AST	Aspartatoaminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
mL	Mililitros
TCA	ÁcidoTricloracético
NaOH	Hidróxido de sódio
rpm	Rotaçãoopor minute
g	ForçaCentrífuga
N	Normalidade
nm	nanômetro
DL 50	Dose letalmediana
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Estudos de produtos naturais com atividades farmacológicas	17
1.2	Toxicologia de Plantas Medicinais	18
1.3	Esvaziamento e trânsito gastrintestinal	19
1.4	Uso de plantas no controle de nematoides gastrintestinais	20
1.5	<i>Moringa oleifera</i>	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Locais de realização dos experimentos	26
3.2	Animais	26
3.2.1	<i>Aspectos éticos</i>	26
3.3	Obtenção do extrato bruto e frações de <i>Moringa oleifera</i>	27
3.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	28
3.5	Teste parasitológico (Teste de eclosão de ovos <i>in vitro</i>)	29
3.6	Avaliação da toxicidade (Teste de segurança)	29
3.6.1	<i>Exposição dos animais para o teste de toxicidade</i>	29
3.6.2	<i>Toxicidade aguda e subcrônica</i>	30
3.6.3	<i>Observação dos sinais de toxicidade (Screening hipocrático)</i>	31
	<i>Coleta das amostras</i>	32
3.6.4	<i>Avaliação ponderal</i>	32
3.6.5	<i>Análise bioquímica</i>	32
3.6.6	<i>Necropsia e histopatológico</i>	33
3.7	Determinação do esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal	33
3.8	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Análise do perfil protéico dos tratamentos por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	35

4.2	Potencial nematicida dos tratamentos pelo teste parasitológico de eclosão de ovos de nematoides <i>in vitro</i>	36
4.3	Testes de toxicidade aguda e subcrônica	36
4.3.1	<i>Taxa de sobrevivência dos animais e alterações comportamentais</i>	37
4.3.2	<i>Níveis séricos de enzimas hepáticas</i>	38
4.3.3	<i>Níveis séricos de creatinina</i>	40
4.3.4	<i>Peso dos órgãos</i>	40
4.3.5	<i>Análise histopatológica</i>	41
4.4	Determinação do esvaziamento gástrico	43
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estudos de produtos naturais com atividades farmacológicas

A natureza é a principal fonte de moléculas bioativas que são utilizadas tanto para finalidade científica, na produção de novos fármacos e tratamentos, como prática, na terapia empírica de distúrbios patológicos por grupos populares. O Brasil apresenta uma rica flora, sendo o país com a maior biodiversidade dentre os outros, justificando a utilização de plantas medicinais na cultura popular para o tratamento de diversas doenças tanto de pessoas como de animais. Diversas comunidades científicas têm se interessado na pesquisa desses produtos, na busca de comprovações farmacológicas, bem como de assegurar quais efeitos colaterais esses podem vir a causar, projetando uma utilização racional desses recursos (SOUZA; FELFILI, 2006).

Para muitos tipos de plantas pode-se atribuir o nome medicinal devido à quantidade de atividades farmacológicas observadas: antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiparasitárias, antineoplásicas. Tais possíveis atividades estão diretamente relacionadas à quantidade de componentes presentes nessas, tanto as essenciais macromoléculas, como proteínas e peptídeos, mas também compostos adquiridos, como os secundários. Embora exista essa gama de atividades, a utilização de produtos naturais na terapia ainda é anedótica e necessita de comprovações científicas para justificar o uso (RODRIGUES; ALMEIDA; PIRES, 2010).

Apesar da falta de estudos que comprovem a eficácia clínica e toxicidade das plantas medicinais, essas ainda são uma alternativa bastante utilizada para melhorar a qualidade de vida de populações que não possuem condições para outros tratamentos, bem como, para auxiliar em tratamentos que apresentam efeitos adversos significativos, objetivando reduzi-los e também para tratar condições sanitárias em nível de produção, como no caso da presença de nematoides gastrintestinais em caprinos (TÓRRES; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 90, cerca de 65-80% da população mundial estavam distantes de centros de saúde ou não tinham condições de arcarem com tratamentos médicos, sendo as plantas medicinais a única forma de acesso a cuidados básicos de saúde. Tais fatores são

preocupantes ao se considerar a falta de informação acerca das propriedades destes compostos, o uso indiscriminado concomitante com outras drogas e a falta de conhecimento sobre os reais efeitos farmacológicos e toxicológicos (VEIGA JUNIOR, 2008).

1.2 Toxicologia de plantas medicinais

É de conhecimento da população que medicamentos sintéticos causam efeitos colaterais, comprometendo a saúde de pacientes que os utilizam, tornando uma preocupação crescente e conduzindo estudos a buscarem alternativas terapêuticas, como a utilização de recursos naturais para desenvolvimento de novos produtos (SHIN *et al.*, 2013). As plantas medicinais, pertencentes à medicina popular, são utilizadas há muitos anos e pesquisas recentes mostram que essas são realmente eficazes no tratamento de diversas doenças.

A crença comum da população que as plantas, por serem produtos de origem natural, não causam efeitos tóxicos, como os medicamentos sintéticos, são errôneas e tornou os estudos pré-clínicos e toxicológicos destes produtos escassos. No entanto esses são necessários para comprovação da segurança e eficácia dessas substâncias (LEE *et al.*, 2015, TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Os estudos toxicológicos são realizados para avaliar os riscos potenciais para a saúde, sejam esses pela exposição isolada (toxicidade aguda) ou repetida (toxicidade subcrônica e crônica) e se caracterizam como testes pré-clínicos sendo fundamentais para conhecer as substâncias, sejam elas naturais ou não, dando um suporte e uma segurança na terapia (MOURA *et al.*, 2012).

Esses estudos baseiam-se em experimentos para investigar possíveis reações adversas, variando de leves a graves, como também conhecer a dosagem mais segura de substâncias. Existem alguns tipos de experimentos feitos com o modelo animal camundongo, como o teste de atividade farmacológica, que serve de triagem preliminar para plantas, no qual são observados os efeitos farmacológicos e toxicológicos por análises comportamentais de animais diante da administração do composto estudado (COSTA, 2013).

Outro teste realizado é o de toxicidade aguda, no qual é avaliado os possíveis efeitos tóxicos e a ocorrência de mortalidade nos animais em um breve período de tempo, após administração de uma única dosagem do composto tendo como

objetivo a descoberta de dosagens seguras. Já o teste de avaliação da toxicidade subcrônica, os animais são expostos a múltiplas dosagens durante dias que podem variar de 14 a 24, onde durante este período são observadas mudanças comportamentais, presença de mortalidade, bem como ao final do experimento dosagens bioquímicas e estudos histológicos para a comprovação de segurança no uso contínuo das substâncias estudadas sobre órgãos vitais.(OEDC, 2001).

1.3 Esvaziamento e trânsito gastrintestinal

Considerando o sistema gastrintestinal, nos processos de armazenamento e tempo de retenção, digestão e absorção de nutrientes, os órgãos diretamente ligados e cuja função é de extrema importância são estômago e intestino respectivamente. O processo de motilidade do quimo que estava no estômago para o duodeno é chamado de esvaziamento gástrico (EG) e esta velocidade é variável e está relacionada a diversos processos tanto fisiológicos como patológicos. A regulação do EG é realizada por alguns fatores como os níveis de açúcar no sangue, as sinalizações do sistema nervoso entérico e a atuação dos hormônios peptídeos gastrintestinais (CALABRESI, 2013).

Alterações no tempo de EG podem levar a episódios patológicos primários como diarreias, quando há um aumento no número de evacuações diárias, devido à motilidade do trânsito gastrintestinal (TGI) esta de maneira mais acelerada ou quando o contrário ocorre, ocasionando episódios de constipação, quando há a ausência de evacuação em intervalos maiores do que três dias. Nas duas situações podem ocorrer episódios tanto agudos como crônicos onde a terapia medicamentosa pode ser inserida a fim de modular o tempo de EG. Além disso o tempo de EG pode acelerar ou retardar a absorção de algumas drogas podendo estas resultarem em episódios de toxicidade ou mesmo de diminuição de eficácia (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Algumas condições podem alterar o tempo de EG, estas podem ser fisiológicas como o envelhecimento, o ciclo menstrual e a gravidez, patológicas em presença de gastroparesia, refluxo esofágico, diabetes mellitus, dispepsia e obesidade, como também na administração de algumas drogas que possuem interação com algum dos fatores moduladores de EG resultando em um retardo ou aumento da motilidade do TGI (NUNES *et al.*, 2014).

Conhecer a resposta de drogas no TGI é de fundamental importância para garantir a sua segurança de administração, considerando que estas podem ocasionar possíveis interações levando a episódios de eventos adversos bem como agravando patologias pré-existentes neste sistema.

1.4 Uso de plantas no controle de nematoides gastrintestinais de caprinos

Infecções por nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes causam perdas econômicas consideráveis na caprinocultura, tanto por alguns animais não resistirem à doença e chegarem a óbito, como também por uma diminuição na produção desses, desde a perda gradativa de peso como a susceptibilidade para infecções secundárias, devido à baixa imunidade (CORREA *et al.*, 2013).

Na região semiárida do Nordeste brasileiro, *Haemonchus contortus* é o parasito gastrintestinal que apresenta maior relevância, sendo que o período de maior infecção dos animais é no final do período chuvoso e início da seca (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Esse parasito causa alterações hematológicas importantes como hipoproteïnemia, redução do volume globular e hipoalbuminemia, causando edema submandibular e perda de peso nos caprinos, o que diminui a produção nos criadouros (FAUSTO *et al.*, 2014).

O ciclo de vida desses endoparasitos possui duas etapas (figura 1), a de vida parasitária, que ocorre dentro do animal, com a reprodução sexuada do parasito, nos quais as fêmeas produzem ovos que chegam ao meio externo por meio das fezes. A outra etapa, que é a de vida livre, ocorre no ambiente, os ovos evoluem para larvas passando por três estádios até se tornarem infectantes, período que dura de 5 a 10 dias, onde, ao ser ingerida com a pastagem, infecta o animal, continuando o ciclo demonstrado na figura (ARAÚJO, 2009).

O tratamento para essas infecções é baseado na administração de anti-helmínticos (MELO *et al.*, 2003), porém com o uso indiscriminado desses fármacos, as populações de parasitos têm criado resistência a esse tratamento químico, sendo um dos principais entraves para o desenvolvimento da caprinocultura atual.

O uso de plantas para o tratamento das infecções parasitárias é uma prática bastante difundida a nível mundial (ADEMOLA; ELOFF, 2011), porém, necessita de estudos mais abrangentes comprovando a sua eficácia anti-helmíntica e provando que essas não causam efeitos colaterais, nem comprometem os animais, ou meio

ambiente. Esta alternativa caracteriza-se como sustentável e de fácil administração e execução, visto que muitos desses vegetais apresentam um caráter ovicida e larvicida (BATATINHA *et al.*, 2004, EQUALE *et al.*, 2011) contra endoparasitos, possivelmente devido à presença de moléculas bioativas, como proteínas ou compostos secundários (SALLES *et al.*, 2014).



Figura 1: Ilustração do ciclo de vida dos nematóides gastrintestinais de caprinos. Com eliminação de ovos nas fezes, larvas infectam o ambiente, contaminando pastagens. Fonte: do próprio autor.

1.5 *Moringaoleifera*

Moringa oleifera (Figura 2) pertence à família das Moringaceae e é nativa da Índia, embora seja bastante difundida nos trópicos de todo o mundo. Resiste bem à seca, pois é capaz de sobreviver em solos pobres de nutrientes. Cresce significativamente rápido e é encontrada em diversas áreas do Brasil (SANTANA *et al.*, 2010). Essa planta é utilizada em diversos países da África e da Ásia, seja na alimentação ou na medicina tradicional, devido a sua alta quantidade de nutrientes, como proteínas e aminoácidos (GALUPPO *et al.*, 2014).

Um dos usos mais abundantes e estudados dessa planta é no tratamento de água, ela possui composição protéica com atividade coagulante, sendo mais

eficazes do que o alúmen (coagulante comercial para o tratamento de água), além de não afetar o pH e a condutividade da água após o tratamento (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995).

Além da proteína floculante, extratos de moringa apresentam diversos componentes como terpenos, flavonóides, taninos, alcalóides, diversas vitaminas como A, B, C e E, além de um composto secundário majoritário, os glucosinolatos também chamados de glucomoringinas. Devido a esta quantidade de componentes diversas atividades farmacológicas podem ser atribuídas, no entanto, faz-se necessária a observação de eventos tóxicos tanto de extratos como de compostos isolados (CHEENPRACHA *et al.*, 2010, FERREIRA *et al.*, 2009).

Dentre os usos terapêuticos atribuídos estão o tratamento de infecções e doenças inflamatórias no sistema cardiovascular, gastrointestinal, hepático e renal (FAHEY *et al.*, 2005, MBIKAY, 2012), como também em inflamações de garganta, bronquite, infecções nos olhos e ouvidos, por conter quantidades elevadas de vitamina C e A, mais do que possuem as laranjas e cenouras (MUKUNZI *et al.*, 2011). Possui também atividade antilipídêmica controlando a hipertensão e o colesterol alto (ASARE *et al.*, 2012).

Diversas pesquisas recentes, que atribuem à *M. Oleifera* atividades farmacológicas como anti-inflamatórias, anticancerígenas e antidiabéticas, são relacionadas à presença de glicosinolatos, substâncias presentes em extratos etanólicos e metanólicos de folhas, flores, sementes e frutos. São um dos grupos mais estudados de compostos secundários devido à quantidade de derivados ativos, como os isotiocianatos, que estão presentes em plantas da ordem Brassicaceae, onde a família Moringaceae está inserida, e são formados a partir de mecanismos de defesa da planta por meio de uma enzima chamada mirosinase (Förster, 2015, Santos, 2018, Waterman, 2014).

É relatada a relevância dessa planta no controle de hiperglicemia e na prevenção do diabetes mellitus tipo 2, devido a inativação de enzimas específicas (TOMA *et al.*, 2014) e sua ação antioxidante é justificada devido a presença de níveis elevados de polifenóis (FAHEY *et al.*, 2005).



Figura 2: *Moringa oleifera* (planta adulta). Fonte: Do próprio autor.

M. oleifera ainda possui efeitos antitoxicidade como mostrado por Sheikhet *al.* (2014), Kerdsomboomet *al.* (2016) e Taha, Amin e Sultan (2015), que demonstraram um efeito protetor da planta contra intoxicações por arsênio, cádmio e ciclofosfamida, respectivamente, tendo um grande potencial para o tratamento dessas, como também o estudo de Ekonget *al.* (2017) e Eldaimet *al.* (2017) evidenciando o potencial da planta estudada como hepato e neuroprotetor.

Pesquisas recentes comprovam a relevância de *M. oleifera* no controle de nematóides gastrintestinais, com atividades ovicidas e larvicidas tanto de extratos aquosos e etanólicos como também de moléculas isoladas como a lectina solúvel em água (WSMoL) pela interação com os receptores glicoconjugados intestinais no embrião, assim como na cutícula das larvas causando a interrupção do ciclo de vida desses, tendo um maior controle nas infecções, sejam nas reincidentes ou em outros animais (Cabardo Jr. e Portugaliza, 2017; Medeiros *et al.*, 2018; Salles *et al.* 2014; Tayoet *al.*, 2014).

Na medicina tradicional *M. oleifera* também é utilizada para tratar distúrbios no trato gastrintestinal e alguns estudos demonstram esta capacidade, como o de Sadraei *et al.* (2015), evidenciando o extrato das folhas e sementes como antiespasmódico e o de Debnath *et al.* (2011), caracterizando o potencial dos extratos no tratamento de úlceras gástricas.

Estudos sobre o trânsito gastrointestinal (TGI) e esvaziamento gástrico (EG) com avaliação de possíveis danos de *M. oleifera* são escassos na literatura, porém relevantes devido diversas modulações enzimáticas ocorrerem nestes, bem como a alteração na fisiologia de estômago e intestino estar associada à manifestações de eventos adversos significativo. (POTRICH *et al.*, 2014).

Em relação à toxicidade de *M. oleifera*, alguns estudos são um tanto contraditórios e a maioria são realizados com extratos ou isolados de folhas, demonstrando que a planta possui atividade larvicida contra *Aedes aegyptie Anagastakuehniella* comprometendo o sistema digestivo destas, baixa toxicidade aguda e predisposição ao dano hepático e renal com o uso crônico em camundongos e ecotoxicidade elevada para zebrafish (FERREIRA *et al.*, 2009, Oliveira *et al.*, 2017, OYAGBEMI *et al.*, 2013, Silva *et al.*, 2017).

Tratamentos alternativos para problemas patológicos, como no caso da infecção por nematoides gastrintestinais em caprinos, são necessários devido à resistência às drogas químicas, além dessas deixarem resíduos químicos nos animais comprometendo a produção. *Moringa oleifera* tem demonstrado ação no controle desses nematoides, além de outros efeitos farmacológicos em virtude de sua composição apresentar diversas moléculas bioativas, podendo ser uma possível alternativa farmacológica para o surgimento de um novo nematicida no mercado. No entanto, para que isso seja possível, há a necessidade prévia de realização de estudos toxicológicos e gastrintestinais com frações farmacológicas desta planta, para que sejam verificados eventos adversos, segurança de dosagem e comprometimento de órgãos vitais, justificando assim o desenvolvimento de novos tratamentos a partir desta espécie vegetal e garantindo a segurança na administração desses tratamentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade aguda, subcrônica e o trânsito gastrointestinal de extratos e frações de sementes de *Moringa oleifera* com atividade nematicida comprovada.

2.2 Objetivos Específicos

Produzir extratos e frações de sementes de *M. oleifera*;

Avaliar a atividade nematicida dos extratos e frações com o teste de eclosão de ovos *in vitro*;

Avaliar a toxicidade dos extratos e frações de *M. oleifera* verificando sinais por meio do *screening* hipocrático;

Verificar por meio de exames bioquímicos, a presença de lesões no fígado e rins, produzidas pela toxicidade subcrônica, após administração oral dos tratamentos;

Identificar lesões microscópicas no coração, fígado e rins de camundongos, compatíveis com a intoxicação pelos tratamentos testados;

Verificar variação no peso dos órgãos ao final dos testes;

Avaliar o esvaziamento gástrico após administração dos extratos e frações das sementes de *M. oleifera*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de realização dos experimentos

Os experimentos de extração, fracionamento e atividade nematicida foram realizados nos laboratórios de bioquímica e parasitologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, e os testes de avaliação toxicológica e gastrintestinal das substâncias testadas, no Laboratório de Fisiologia e Neurociências da Universidade Federal do Ceará (UFC) *Campus* Sobral.

3.2 Animais

Para o teste parasitológico de avaliação da atividade nematicida, foram utilizados dois caprinos da raça Saanen, pertencentes ao rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos sabidamente infectados por nematoides gastrintestinais.

Para os testes toxicológicos e gastrintestinais foram utilizados 146 camundongos Swiss sendo 96 fêmeas (nulíparas e não grávidas) e 50 machos, pesando entre 25-40g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici, sendo alocados no Biotério Setorial da Faculdade de Medicina UFC/*Campus* Sobral. Os animais foram mantidos em suas casas gaiolas, com no máximo 6 animais, à temperatura média de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*.

3.2.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC e aprovado com o protocolo 11/16 e todos os procedimentos experimentais foram realizados em estrita conformidade com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

Os animais doadores de fezes contaminadas por ovos de helmintos fazem parte de projeto da Embrapa que já possui autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Caprinos e Ovinos para realização das coletas (Processo 03/2015).

3.3 Obtenção do extrato e das frações de *Moringa oleifera*

As sementes de *Moringa oleifera* com casca (Figura 3) utilizadas para extração dos tratamentos foram coletadas de um mesmo espécime vegetal localizado na cidade de Sobral, Ceará em setembro de 2016 e armazenadas a 4 °C até utilização.

A figura 4 demonstra as etapas de extração e fracionamento dos tratamentos. Com auxílio de um moedor de grãos, as sementes de *M. oleifera* com casca foram trituradas, até a obtenção de uma farinha fina. Em seguida, a farinha foi suspensa com água destilada na proporção de 1:10 (sólido:líquido) e colocada em um agitador de tubos por uma hora para extração à temperatura ambiente (25°C). Após este período, o material foi centrifugado por 30 minutos à 10.000 x *g* a 4°C. O sobrenadante filtrado em papel filtro qualitativo foi liofilizado e chamado de extrato bruto (Exb).



Figura 3: Sementes de *M. oleifera* com casca.
Fonte: Do próprio autor.

O pellet da fração etanólica foi ressuspenso em água e fracionado por diálise em membrana de *cut off* 12 kDa à 4 °C, contra água destilada na proporção de 1:10, por 48 horas, com trocas realizadas a cada 24 horas. Após este processo apenas a fração não retida na membrana foi utilizada para prosseguir com o estudo como mostrado por Salles et al. (2014) que as moléculas ovicidas presentes na *Moringa oleifera* possuem massa molecular inferior a 12 kDa.

O Exb foi fracionado com etanol na proporção 1:10 (sólido:líquido) por 1 hora à 25 °C e centrifugado por 5 minutos à 13.000 x *g* a 25°C. Para a retirada do etanol o sobrenadante foi submetido à evaporação com auxílio de um rotavapor com sistema

a vácuo, ressuspensionado em água e liofilizado para a utilização nos experimentos, sendo essa fração chamada de compostos secundários (C2).

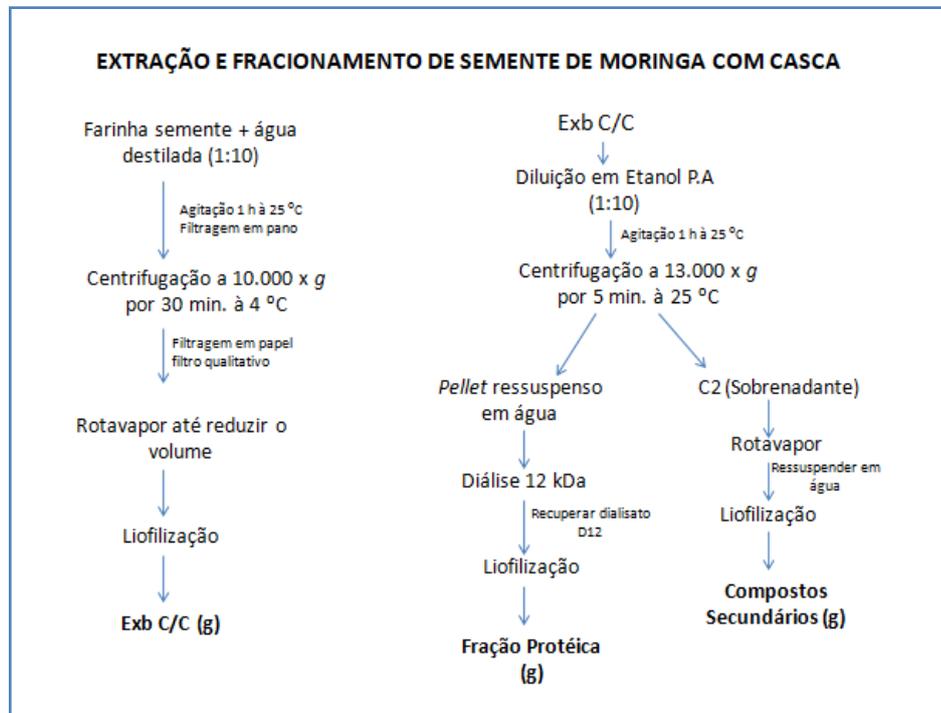


Figura 4: Esquema da metodologia de extração e fracionamento de sementes de *M. oleifera* com casca. Exb C/C: Extrato bruto com casca; C2: Compostos Secundários. Fonte: do próprio autor.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O extrato e frações foram analisados por eletroforese para determinação do perfil proteico de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando géis de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e aquecidas a 100°C, por 5 minutos, centrifugadas a 10.000 x g, 10 minutos, a 25°C, antes da aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, GE Healthcare Biosciences), no qual os géis foram submetidos a uma voltagem de 500 V, amperagem de 20mA e potência de 30 W. Como padrão de massas moleculares foi utilizado um kit (Bio-Rad) contendo: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). Após a corrida, os géis foram fixados em metanol 40% e ácido

acético 10% por 30 minutos e em seguida mantidos em solução corante coloidal contendo sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8%, metanol 20% e Coomassie Brilliant Blue G-250 0,08% até a visualização das bandas.

3.5 Teste Parasitológico (Ensaio de eclosão de ovos de nematoides *in vitro*)

Para a recuperação de ovos de helmintos, foram coletadas fezes diretamente da ampola retal de caprinos sabidamente infectados por nematoides gastrintestinais. As fezes foram maceradas e filtradas sequencialmente através de quatro peneiras com malhas de 1,00 mm, 0,105 mm, 0,055 mm e 0,025 mm de diâmetro. O material retido na última peneira recuperado e centrifugado a 1.600 g por 10 min, à temperatura ambiente (28°C). O *pellet* foi ressuspenso em uma solução saturada de açúcar e novamente centrifugado a 1.600 g por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em uma peneira de 0,025 mm de diâmetro, recuperando os ovos retidos. O ensaio foi realizado em um volume total de 500 µL, em placas de 24 poços, onde em cada poço tinha 100 µL de solução contendo os ovos (total de 100 ovos) e 400 µL dos tratamentos (5mg de massa, diluídos em água) ou 100 µL de solução contendo os ovos com 400 µL de água destilada para o controle, sendo tanto nos tratamentos como no controle realizadas triplicatas. Após montadas, as placas foram mantidas em câmara incubadora BOD a 27°C, sem fotoperíodo, por 24 horas. Ao final desse período avaliou-se a taxa de eclosão sob estereomicroscópio.

3.6 Avaliação da toxicidade (Teste de segurança)

O teste de toxicidade oral foi realizado segundo os protocolos experimentais OECD 407 (2008) e OECD 421 (2001) modificados e está demonstrado na Figura 5.

3.6.1 Exposição dos animais para os testes de toxicidade

Os animais (camundongos) receberam os extratos por gavagem orogástrica para os testes de toxicidade aguda e subcrônica. O extrato e as frações foram administrados na forma de solução aquosa e como veículo, água destilada. Em todos os testes houve um grupo controle, tratado apenas com o veículo.

3.6.2 Toxicidade aguda e subcrônica

Neste estudo, foram utilizados 103 animais, 100 separados em 10 grupos, com dez animais (5 machos e 5 fêmeas), onde cada grupo recebeu três doses de concentrações diferentes (5, 50 e 300 mg/Kg) para cada tratamento (extrato bruto, fração proteica e compostos secundários) e controle (água destilada). Três fêmeas foram utilizadas para adição e conclusão do teste de toxicidade aguda com dose de 2000 mg/Kg, onde foram observados por 24 horas a presença de mortalidade nos animais para classificação de segurança aguda e dosagem, como demonstrado na figura 5.

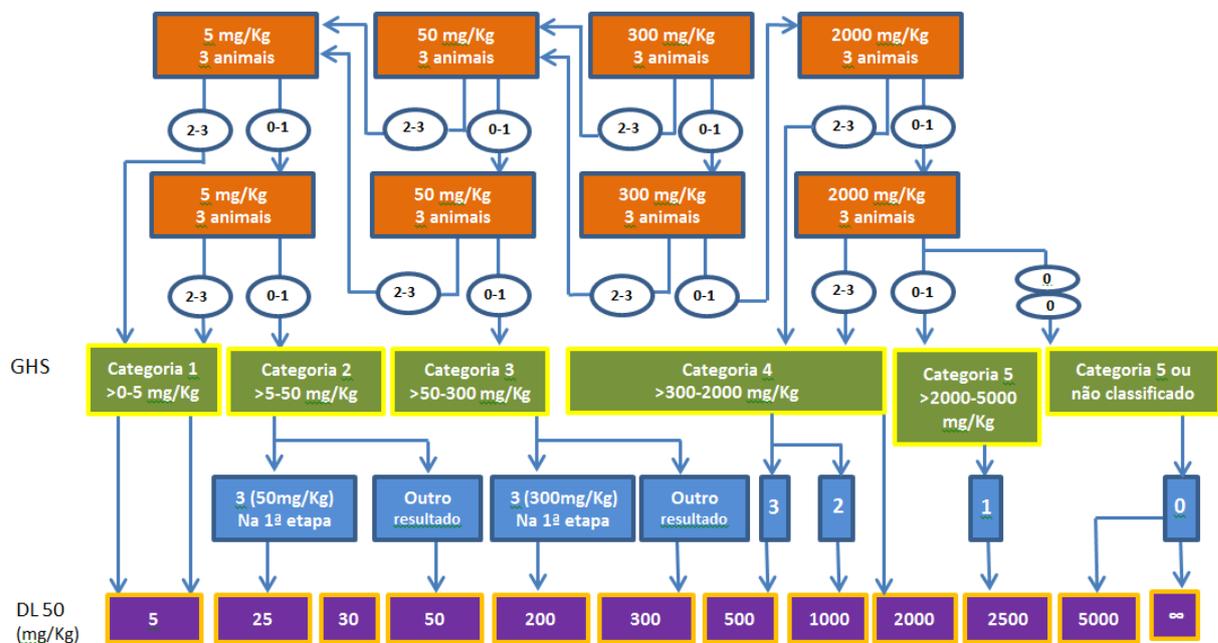


Figura 5: Fluxograma descrevendo metodologia do teste de toxicidade aguda descrito pela OECD 421; 0,1,2,3: número de animais mortos; GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado; Fonte: OECD (2001).

Observou-se os animais quanto as alterações comportamentais nos quinze minutos, trinta minutos, uma hora, duas horas, três horas, seis horas, doze horas e 24 horas após a administração dos tratamentos para avaliação da toxicidade aguda, após este período a observação ocorreu todos os dias subsequentes à administração até o décimo quarto dia, sempre à mesma hora (08:00) e assim avaliada a toxicidade subcrônica, de acordo com o *screening* hipocrático para observação destes parâmetros.

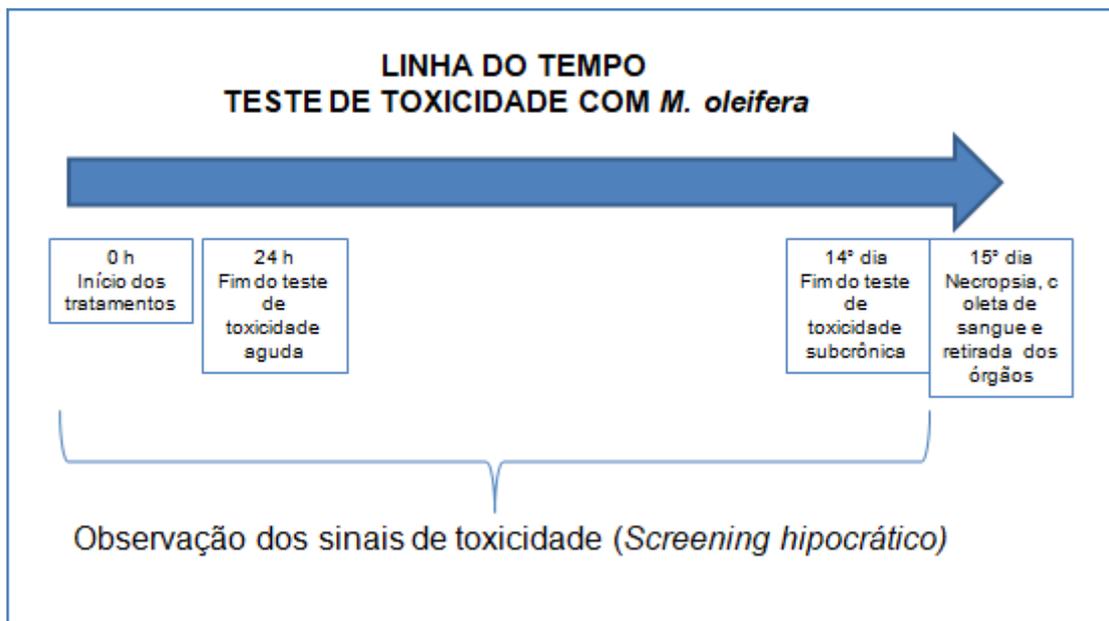


Figura 6: Linha do tempo do teste de toxicidade em camundongos após administração de extratos e frações de *M. Oleifera*. Fonte: Elaborado pela autora da pesquisa.

Os tratamentos foram diluídos em água destilada, devido ao extrato e frações serem solúveis nesta, e o volume final não excedeu 0,5 mL, volume máximo para administração em camundongos.

No décimo quinto dia, após jejum de 12 horas, todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido de guilhotina para coleta de sangue por esgotamento para testes bioquímicos e então foram retirados o coração, o fígado e os rins por meio de laparotomia para análises histológicas (figura 6).

3.6.3 Observação dos sinais de toxicidade (*screening hipocrático*)

Para a realização das observações das alterações comportamentais, foi utilizado o *screening hipocrático* através do qual registramos seguintes comportamentos dos animais: piloereção, contorção, cambalhotas, lambidas, pulsão sexual, sonolência, agitação, agressividade, rodopiar e morte. As observações foram realizadas em diferentes períodos durante o dia, após a administração dos compostos, que foi de quinze minutos, trinta minutos, uma hora, duas horas, três horas, seis horas, doze horas e 24 horas (toxicidade aguda) e, a partir de então, periodicamente, até o 14º dia para toxicidade subcrônica (Tabela 1).

Tabela 1: Esquema utilizado para avaliação do *screening hipocrático*, onde os números 1 a 5 indicam a quantidade de animais acometidos pelas alterações comportamentais estudadas.

ALTERAÇÃO	GRUPO							2º Dia	3º Dia	4º Dia
	1º Dia									
	15 min.	30 min.	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas			
Contorção	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Piloereção	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Cambalhotas	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Lambidas	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Pulsão Sexual	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Sonolência	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Agitação	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Agressividade	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Rodopiar	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Morte	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
ALTERAÇÃO	5º Dia	6º Dia	7º Dia	8º Dia	9º Dia	10º Dia	11º Dia	12º Dia	13º Dia	14º Dia
Contorção	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Piloereção	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Cambalhotas	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Lambidas	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Pulsão Sexual	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Sonolência	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Agitação	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Agressividade	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Rodopiar	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Morte	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5

Fonte: elaborada pelo autor.

3.6.4 Avaliação ponderal

Os animais foram pesados em balança semi-analítica antes da administração dos seus respectivos tratamentos durante todos os dias para adequação das doses. Os órgãos estudados (coração, fígado e rim) foram pesados no final do experimento.

3.6.5 Análises bioquímicas

Os testes de creatinina, aminotransferase de aspartate (AST) e aminotransferase de alanine (ALT) foram realizados a partir do sangue dos animais coletados no final dos experimentos, em tubos sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado e recuperado o soro. As dosagens foram feitas utilizando kits LABTEST e a leitura espectrofotométrica foi realizada em analisador de bioquímica automática modelo LABMAX-560.

3.6.6 Necropsia e histopatológico

Ao final da exposição aos tratamentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de guilhotina e submetidos a laparotomia para retirada e avaliação dos órgãos estudados.

Para os exames histopatológicos foram coletadas amostras de fígado, rim e coração e fixadas em solução formol neutro e tamponado a 10%. Após fixação de 24 horas, os órgãos foram desidratados em séries crescentes de etanol (70-100%), exposição em xilol, seguido de inclusão em parafina histológica. Foram feitos cortes e fixados em lâminas para posterior coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico em um aumento de 400x.

3.7 Determinação do esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal

O esvaziamento gástrico e o trânsito gastrointestinal foram determinados a partir de uma técnica descrita por (Bertaccini & Scarpignato, 1982).

Os animais, em jejum de 12 h, foram divididos em sete grupos ($n = 6$) e tratados por via oral com água, extratos e frações de *M. oleifera* em duas concentrações distintas (50 e 300 mg/Kg). Após 1 h, foi administrada também por via oral, uma solução glicosada a 5% contendo o corante vermelho de fenol, numa concentração de 0,50 mg/mL e depois de 15 minutos, os animais foram eutanasiados para a retirada do estômago e intestino delgado em duas partes iguais (proximal- logo após o estômago e distal) como demonstrado na figura 7.

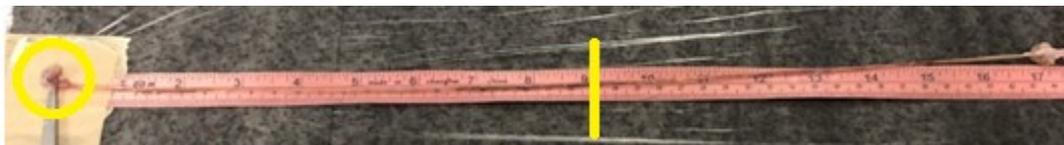


Figura 7 : Após a eutanásia do camundongo submetido ao teste de esvaziamento gástrico, demonstrando estômago e o comprimento total do intestino que foi separado em partes iguais. Círculo amarelo indica o estômago. Reta amarela indica a divisão do intestino em proximal e distal. Fonte: elaborada pelo autor.

Os órgãos foram colocados em uma solução de 50 mL de NaOH (0,1 N) e homogeneizados por 30 segundos recuperando uma amostra de 10 mL para

centrifugação por 10 minutos em 2800 rpm. Em seguida as proteínas foram precipitadas adicionando uma solução de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugando novamente por 20 minutos em 2800 rpm. 3mL do sobrenadante foram adicionados a 4 mL de NaOH (0,5 N) e realizada leitura em espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram analisados e calculadas a retenção fracional (%) do corante em cada órgão.

3.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPadPrism versão 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California EUA (Copyright © 1992-2009 GraphPad Software, Inc). Os resultados obedeceram a uma distribuição paramétrica e forão analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman Keuls (post hoc). Os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). O critério de significância utilizado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do perfil protéico dos tratamentos por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Quanto ao perfil eletroforético dos tratamentos (Figura8) foi possível verificar uma quantidade variável de bandas no extrato bruto, estando estas menores que 97 kDa, com uma banda prevalente à altura de 6,5 kDa. Na fração protéica(D12) foi possível constatar a mesma banda do extrato na altura de 6,5 kDa e que esta não esteve presente na fração que continha os compostos secundários com nenhuma evidência de material protéico.

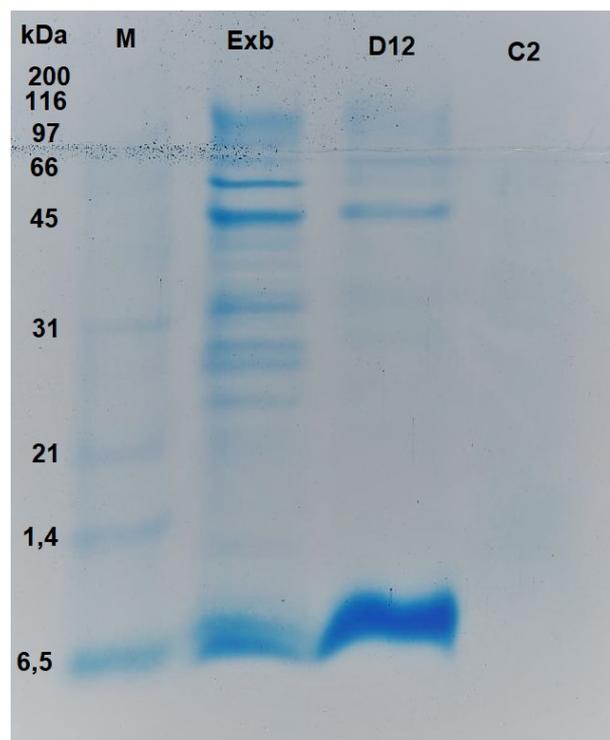


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS, de extratos e frações de sementes de *Moringa oleifera*. Bandas protéicas coradas com Coomassie Brilliant Blue G250 e contendo 5µg de proteínas. M: Marcador de massa molecular; Exb: Extrato bruto; D12: Fração protéica menor que 12 kDa; C2: Compostos secundários. Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 Potencial nematicida dos tratamentos pelo teste parasitológico de eclosão de ovos de nematoides *in vitro*

O potencial nematicida dos extratos e frações de *M. oleifera* foi verificado de acordo com a taxa de inibição da eclosão dos ovos de helmintos quando em contato com a dosagem de 5 mg dos tratamentos (Figura 9).

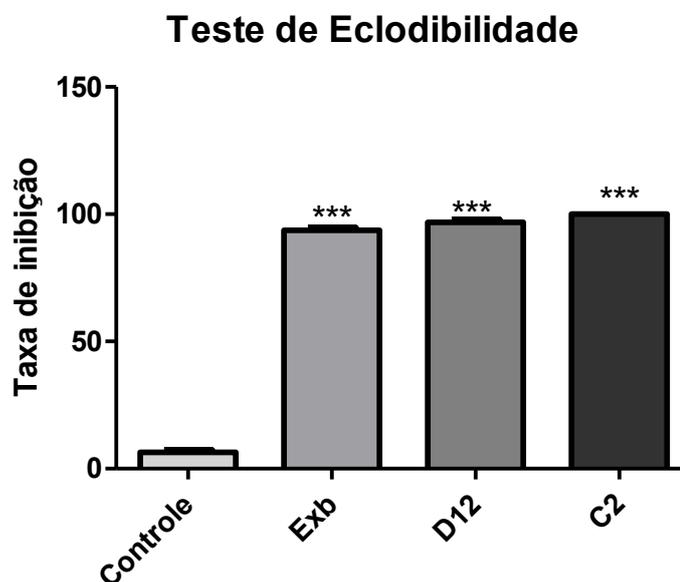


Figura 9- Taxa da inibição da eclosão dos ovos de helmintos quando em contato com os tratamentos (5mg /0,5 ml).Exb: Extrato bruto; D12: Fração proteica menor que 12 kDa; C2: Compostos secundários.* $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).Fonte: elaborada pelo autor.

Os extratos e frações tiveram uma atividade na inibição da eclosão dos ovos elevada (Exb: 93,70% \pm 1,635);D12: 96,79% \pm 2,00;C2: 100% \pm 0,0). Com os resultados apresentados, reforça-se o potencial nematicida presente em *M. oleifera* tanto no sinergismo das substâncias presentes no extrato, como também em frações protéica e etanólicas, podendo estas atuar como nematicidas naturais, no controle do ciclo de vida dos helmintos de caprinos.

4.3 Testes de toxicidade aguda e subcrônica

Para determinar a segurança do extrato aquoso e das frações protéica e não protéica (compostos secundários) de sementes com casca de *M. oleifera* foram realizados ensaios baseando-se em protocolos experimentais da OECD com algumas adaptações. Foi observada ausência de toxicidade dos tratamentos como descrito a seguir.

4.3.1 Taxa de sobrevivência dos animais e alterações comportamentais

A taxa de sobrevivência dos animais foi de 100% (Tabela 2) em todos os grupos experimentais, ou seja, não houve morte dos animais por administração do controle (água destilada), nem dos tratamentos em todas as doses, tanto no teste de toxicidade aguda (doses: 5,50,300 e 2000 mg/Kg) com administração única, como no teste de toxicidade subcrônica (doses: 5,50 e 300 mg/Kg) após 14 dias de administração repetidas (Tabela 2). Considerando o fluxograma de toxicidade aguda (figura 5), pode-se considerar os extratos e frações de *M. oleifera* com DL50 maior que 2000 mg/Kg, sendo classificadas no grupo 5 de segurança, ou seja, são substâncias seguras para administração em experimentos e possivelmente em humanos e animais, porém estes resultados precisam ser confrontados com as alterações comportamentais, níveis de ALT, AST, creatinina e análise histopatológica de órgãos realizadas após os 14 dias de tratamento para reforçar a segurança e baixa toxicidade.

De acordo com o *screening hipocrático*, não houve alterações comportamentais nos grupos experimentais controle (água destilada) e tratamentos (Exb, D12 e C2) em todas as doses utilizadas, constatando que não houveram sinais relacionados ao aparecimento de toxicidade (Tabela 2).

Tabela 2: Taxa de sobrevivência e alterações comportamentais em camundongos tratados com Exb (Extrato bruto), D12 (Fração protéica) e C2 (Compostos secundários) nas doses 5, 50 e 300 mg/Kg ao longo dos 14 dias de tratamento.

Tratamento	Taxa de sobrevivência	Alterações comportamentais
Controle	100%	-
Exb5	100%	-
Exb 50	100%	-
Exb 300	100%	-
D12 5	100%	-
D12 50	100%	-
D12 300	100%	-
C2 5	100%	-
C2 50	100%	-
C2 300	100%	-

Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.2 Níveis séricos de enzimas hepáticas

Para a constatação de segurança na administração oral dos tratamentos resultando em uma preservação da fisiologia hepática, foram realizadas provas bioquímicas estabelecendo dosagens séricas de AST e ALT na maior dosagem (300 mg/ Kg). A figura 10 mostra a dosagem de AST em machos e fêmeas, onde os animais tratados com exb tiveram níveis mais baixos ($165 \pm 39,7$ U/L) em relação aos grupos controle ($212,4 \pm 52,79$ U/L), D12 ($197,2 \pm 23,11$ U/L) e C2 ($204,1 \pm 54,40$ U/L), porém sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Os resultados das dosagens séricas de ALT estão apresentados na figura 11, demonstrando uma redução dos níveis nos grupos Exb ($44,11 \pm 8,2$ U/L) e D12 ($47,34 \pm 7,5$ U/L) frente ao controle ($53,33 \pm 7,3$ U/L) e C2 ($54,79 \pm 8,01$ U/L), porém sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Os resultados das dosagens de enzimas hepáticas demonstraram que não houve alteração significativa nos níveis destas, detectando que não houve um aumento da função no fígado, reforçando a segurança na administração dos compostos testados.

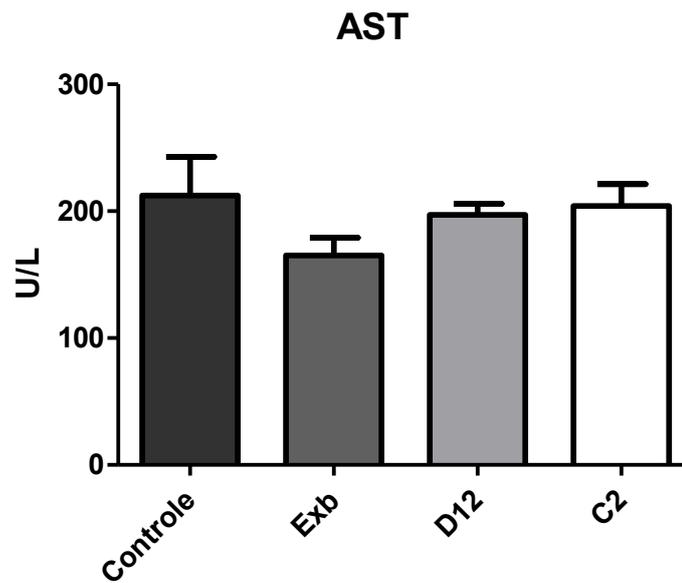


Figura 10: Níveis séricos de AST em camundongos machos e fêmeas tratados com Água (controle), Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleifera* (300 mg/Kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls). Fonte: elaborada pelo autor.

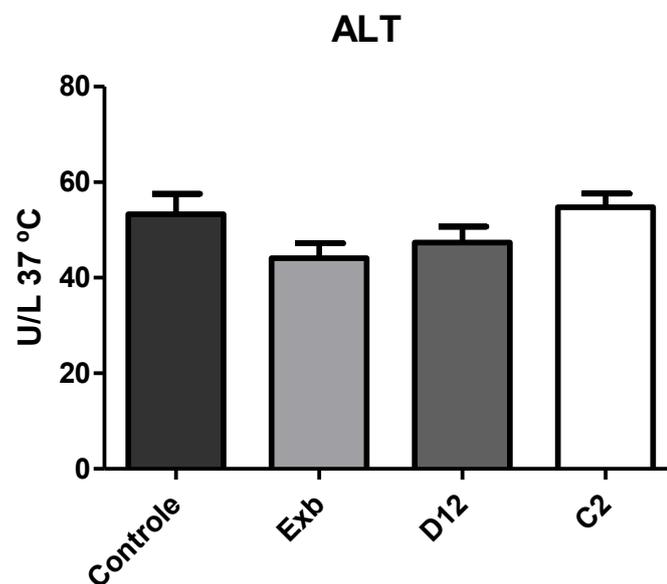


Figura 11: Níveis séricos de ALT em camundongos machos e fêmeas tratados com Água (controle), Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleifera* (300 mg/Kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls). Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.3 Níveis séricos de creatinina

Para avaliação da função renal foram realizadas dosagens nos níveis séricos de creatinina. Os grupos Exb ($1,357 \pm 0,58 \text{ mg/dL}$) e C2 ($1,490 \pm 0,33 \text{ mg/dL}$) apresentaram resultados maiores que o controle ($1,220 \pm 0,20 \text{ mg/dL}$) e D12 ($1,167 \pm 0,14 \text{ mg/dL}$), porém sem diferença estatística significativa como demonstrado na figura 12. Os resultados indicam que a administração dos compostos não alterou a função renal.

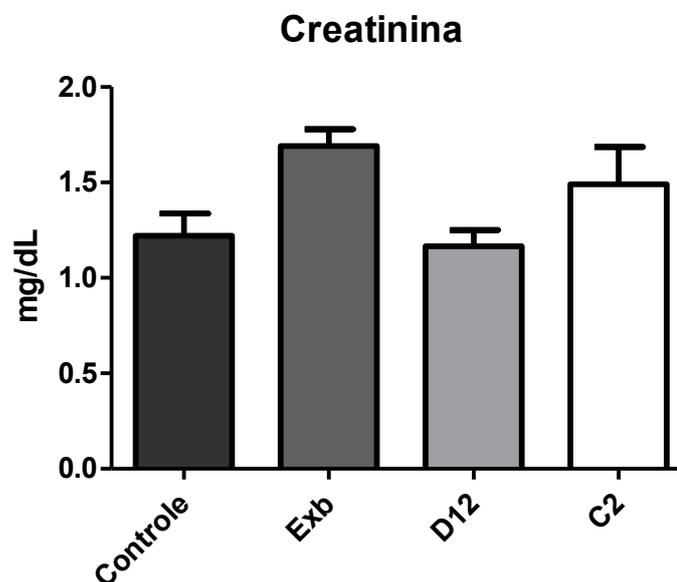


Figura 12: Níveis séricos de creatinina em camundongos machos e fêmeas tratados com Água (controle), Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleifera* (300 mg/Kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls). Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.4 Peso dos órgãos dos animais

O peso dos órgãos foi avaliado na perspectiva de observar alguma visceromegalia. Os resultados não demonstraram diferenças estatísticas do controle concluindo que o tamanho dos órgãos não foi afetado com a exposição ao tratamento como mostrado na tabela 3.

Tabela 3: Peso dos órgãos dos animais após exposição repetida por 14 dias de Extrato bruto (Exb), Fração protéica (D12) e compostos secundários (C2) de *M. oleifera* em três doses: 5, 50 e 300 mg/Kg ou água (controle). Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (ANOVA, Newman-Keuls).

Tratamentos	Coração (g)	Fígado (g)	Rim(g)
Controle	0,161 \pm 0,0197	1,188 \pm 0,350	0,226 \pm 0,043
Exb5	0,161 \pm 0,032	1,188 \pm 0,130	0,226 \pm 0,052
D12 5	0,165 \pm 0,025	1,107 \pm 0,200	0,229 \pm 0,062
C2 5	0,165 \pm 0,042	0,998 \pm 0,127	0,223 \pm 0,054
Exb 50	0,163 \pm 0,05	1,120 \pm 0,280	0,226 \pm 0,085
D12 50	0,163 \pm 0,020	1,120 \pm 0,136	0,226 \pm 0,035
C2 50	0,165 \pm 0,021	1,120 \pm 0,170	0,226 \pm 0,033
Exb 300	0,163 \pm 0,022	1,120 \pm 0,254	0,226 \pm 0,054
D12 300	0,163 \pm 0,021	1,120 \pm 0,244	0,226 \pm 0,081
C2 300	0,163 \pm 0,038	1,120 \pm 0,199	0,226 \pm 0,073

Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.5 Análise histopatológica

Para verificar possíveis alterações estruturais, foi realizada a análise histopatológica de coração, fígado e rim. Em todos os tratamentos testados não foram observadas alterações patológicas significativas, nem mesmo na maior dose (300 mg/Kg), como demonstrado nas figuras 13, 14 e 15 com imagens histológicas do coração, do fígado e do rim, respectivamente, dos grupos tratamentos e controle, onde os órgãos mantiveram sua morfologia geral preservada, com células típicas parenquimatosas e estromais e ausência de infiltrados celulares e pontos de lesões, indicando uma possível biocompatibilidade *in vivo*.

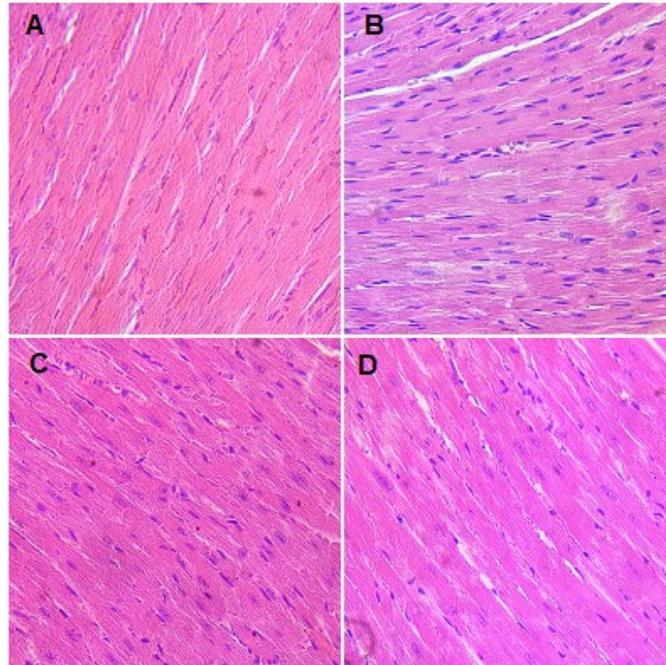


Figura 13: Análise histopatológica do coração (400x, coloração HE). A: Controle, B: Extrato bruto 300 mg/Kg, C: Fração Protéica 300 mg/Kg, D: Compostos secundários 300mg/Kg. Cardiomiócitos dentro do padrão da normalidade, com eosinifilia citoplasmática típica e núcleos basofílicos preservados.

Fonte: elaborada pelo autor.

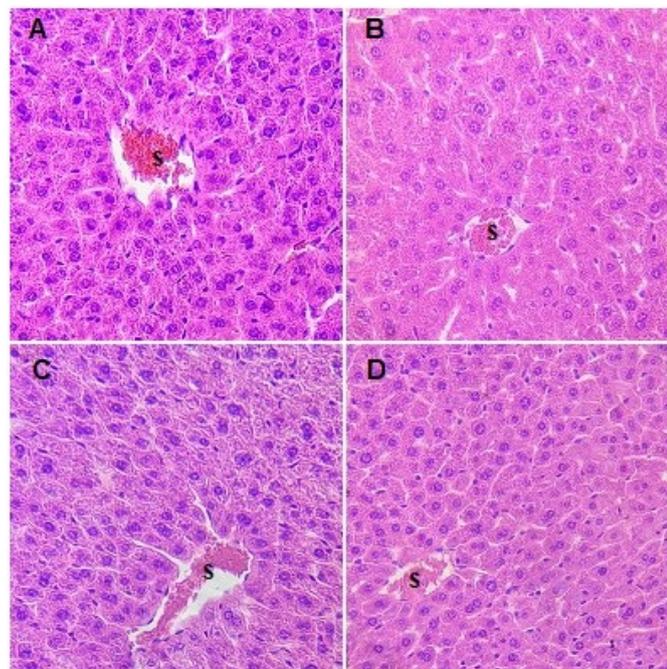


Figura 14: Análise histopatológica do fígado (400x, coloração HE). A: Controle, B: Extrato bruto 300 mg/Kg, C: Fração Protéica 300 mg/Kg, D: Compostos secundários 300mg/Kg. Hepatócitos dentro do padrão da normalidade, com binucleação típica e presença de capilares sinusóides (S) característicos. Fonte: elaborada pelo autor.

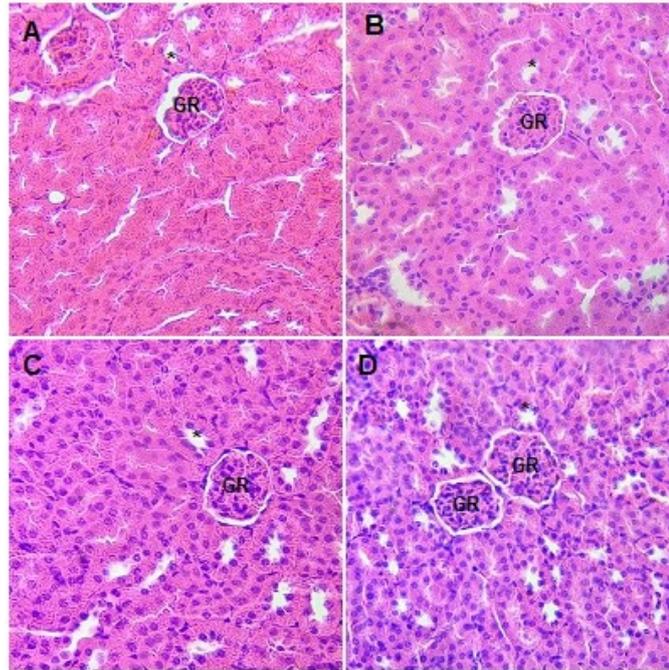


Figura 15: Análise histopatológica do rim (400x, coloração HE). A: Controle, B: Extrato bruto 300 mg/Kg, C: Fração Protéica 300 mg/Kg, D: Compostos secundários 300mg/Kg. Presença de Glomérulos renais (GR) e túbulos contorcidos (*) proximais e distais com padrões de morfologia dentro da normalidade. Fonte: elaborada pelo autor.

4.4 Determinação do esvaziamento gástrico

A fim de estabelecer possíveis eventos no TGI com a administração dos tratamentos foi realizado o experimento de EG. A figura 16 demonstra a retenção fracional no estômago após 15 minutos de administração do corante vermelho de fenol, onde se constatou um aumento da retenção significativa no grupo Exb ($46,21 \pm 8,48\%$) e C2 ($46,09 \pm 4,5\%$) na dose de 300 mg/Kg em relação ao controle ($17,53 \pm 4,01\%$), retardando assim o EG. No grupo D12 não houve diferença significativa nas doses de 50 ($21,59 \pm 6,0$) e 300 ($29,56 \pm 5,34$) mg/kg em relação ao controle.

A figura 17 demonstra a retenção fracional na primeira parte do intestino onde apenas C2 na dose de 300 mg/Kg ($17,98 \pm 6,2\%$) teve diferença estatística do controle ($37,98 \pm 2,87\%$) com diminuição da retenção fracional.

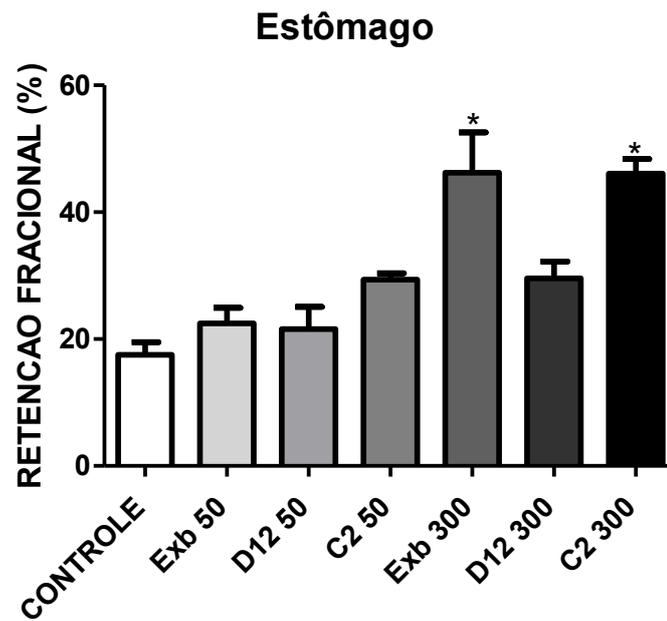


Figura 16: Retenção fraciona no estômago do corante vermelho de fenol, após 15 minutos de administração. Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleiferanas* doses 50 e 300 mg/Kg. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).
Fonte: elaborada pelo autor.

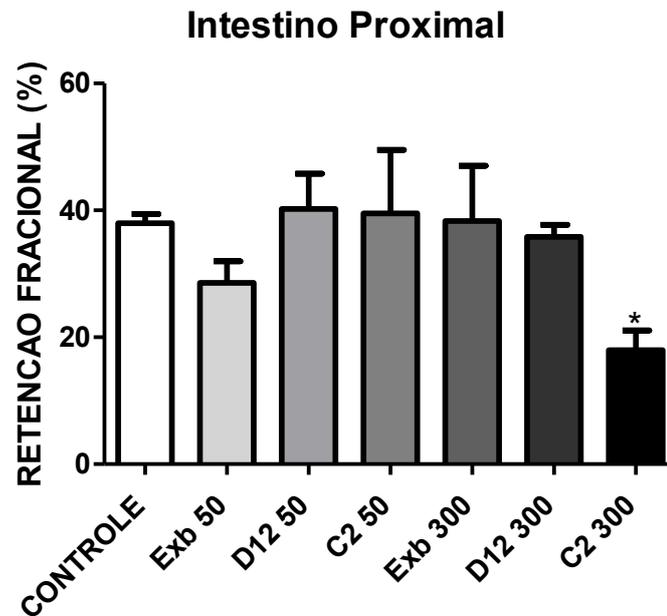


Figura 17: Retenção fracional do corante vermelho de fenol no intestino proximal, após 15 minutos de administração. Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleiferanas* doses 50 e 300 mg/Kg. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls).
Fonte: elaborada pelo autor.

Os valores da retenção fracional na última parte do intestino estão expressos na figura 18, onde apenas Exb 300mg/Kg ($13,47 \pm 6,0\%$) teve resultados significativos de diminuição da retenção em relação ao controle ($44,50 \pm 5,60$).

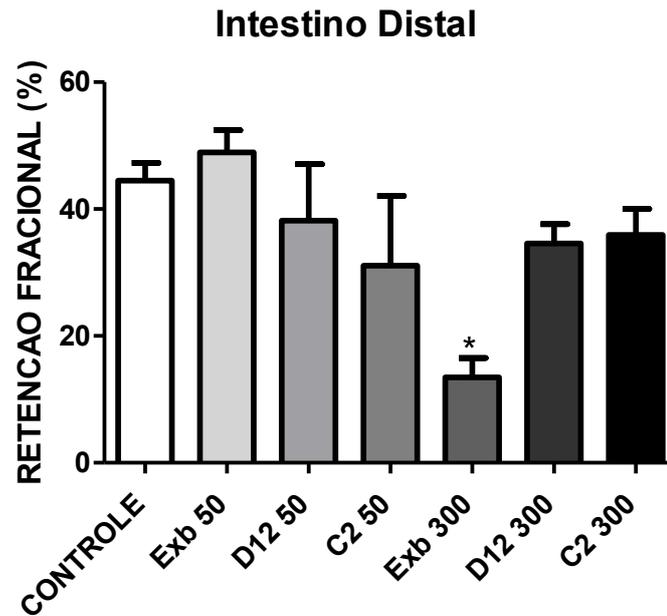


Figura 18: Retenção fracional do corante vermelho de fenol no intestino distal, após 15 minutos de administração. Extrato bruto (Exb), fração protéica (D12) e Compostos secundários (C2) de *M. oleiferanas* doses 50 e 300 mg/Kg. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. (ANOVA, Newman-Keuls). Fonte: elaborada pelo autor.

5DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de diversos distúrbios patológicos tem sido justificada atualmente devido a essas causarem uma diminuição no acúmulo de substâncias químicas pelo organismo, a diminuição de eventos adversos relativos a drogas sintéticas e porque estas produzem efeitos farmacológicos significativos bem como a facilidade no acesso devido à grande biodiversidade existente (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Na atualidade, estudos toxicológicos sobre plantas medicinais têm se tornado escassos devido ao foco de grupos de pesquisas em descobertas de atividades farmacológicas inovadoras, porém estes estudos são importantes e indispensáveis para comprovar a segurança de administração, pois ao contrário do que grupos populares pensam, substâncias ativas oriundas de produtos naturais causam danos à saúde se não utilizados de maneira correta, com dosagens e posologia bem estabelecidas (AMADI *et al.*, 2018; LEE, 2015; MOURA *et al.*, 2012).

Moringa oleifera, pertencente à família das Moringaceae, é descrita na literatura com diversas atividades farmacológicas como anti-diabéticas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas e o seu estudo tem aumentado consideravelmente nos últimos anos a fim de descobrir e isolar novas substâncias ativas para produção de fármacos inovadores (MBIKAY, 2012).

A composição da planta estudada neste trabalho possui diversas moléculas bioativas, podendo estarem de origem protéica como relatado por Ferreira *et al.*, 2009, que observaram atividade larvicida sobre *Aedes Aegypti* de proteínas com massa abaixo de 12 kDa, ou de origem do metabolismo secundário como moléculas os glicosinolatos, com atividades antinociceptivas descrita por Santos, 2014.

A presença de nematoides gastrintestinais em caprinos é um fato relevante e causam perdas consideráveis de produção por comprometerem animais infectados, estes podendo até chegar a óbito. Esses parasitas têm-se mostrado com um alto poder de resistência ao tratamento atual que se baseia na administração de anti-helmínticos, drogas químicas que podem acumular resíduos em produtos da caprinocultura como carnes e leite (CORREA, 2013). A utilização de plantas para controle desses nematoides se caracteriza como tratamento alternativo e trabalhos atuais demonstraram um alto poder desses compostos sobre o ciclo de vida desses parasitas (ADEMOLA, ELOFF, 2011).

Os resultados deste trabalho demonstraram um alto potencial nematicida dos compostos de *M. oleifera* estudados com taxas de inibição da eclosão de ovos de helmintos maiores que 93% corroborando com estudos atuais que também demonstraram uma alta eficácia da planta sobre ovos de nematóides gastrintestinais (SALLES *et al.*, 2014).

A toxicidade de compostos oriundos de diversas partes de *M. oleifera* como flores, folhas e sementes é descrita na literatura por alguns autores como relatado por Ferreira *et al.*, 2009, quando houve acentuada mortalidade em larvas de *Aedes Aegypti* e em camundongos nas doses de 550 e 700 mg/Kg em testes de toxicidade aguda administradas via intraperitoneal. Estudos em peixes demonstraram uma redução de parâmetros hematológicos como glicose, hematócrito, hemoglobina e enzimas hepáticas (KAVITHA *et al.* (2012), e taxa de mortalidade de elevada em zebrafish, relacionando com uma possível ecotoxicidade. Ademais, Mogbojuri e Emikpe (2009) e Araujo *et al.* (2013) demonstraram que o extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* causaram letargia e alterações sanguíneas como discreta anemia em camundongos. Awodele *et al.* (2012) utilizando o extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* revelou que estes não possuem toxicidade se administrados por via oral, mas o mesmo não ocorre se a administração ocorrer por via intraperitoneal onde a DL 50 foi de 1585 mg/Kg.

Lesões no fígado por administração de drogas e compostos para fim farmacológico podem ser reveladas e acompanhadas por alterações em enzimas específicas como as transaminases AST e ALT, estas estão no interior dos hepatócitos e são responsáveis pela metabolização de substâncias. Quando estão em níveis séricos elevados indicam um possível extravasamento das células devido a lesões, por isso a dosagem destas deve ser realizada na triagem de novos fármacos e substâncias (AMADI *et al.*, 2018; KHATTAB *et al.*, 2015).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a administração oral repetida por 14 dias de extratos e frações de *M. oleifera* não alterou estatisticamente os níveis de AST e ALT em camundongos, concordando com diversos autores que relatam níveis dentro do padrão da normalidade destes marcadores com a utilização de plantas da família Moringaceae (AWODELE *et al.*, 2012, KIM *et al.*, 2018). EL-Hakef *et al.* (2018), demonstraram que a utilização de extratos diminuiu estes índices. Concluindo assim que com os níveis de AST e ALT sem aumento estatístico

provavelmente não houve comprometimento da função renal, nem a presença de metabólitos que poderiam ser tóxicos.

A avaliação da função renal com a utilização de medicamentos e substâncias é de fundamental importância, sendo os rins a principal via de excreção do organismo. A creatinina é uma substância presente no sangue e excretada nos rins, níveis séricos altos deste marcador indicam uma possível lesão renal por um distúrbio na filtração de substâncias (SAWANT *et al.*, 2018). Os resultados deste trabalho demonstraram níveis séricos de creatinina dentro do padrão da normalidade como relatado também por Awodele *et al.*, 2012 na avaliação da creatinina em animais submetidos a tratamentos orais com extrato aquoso de folhas de *M. oleifera*.

A análise histológica revelou preservação de morfologia em coração, fígado e rins, sem a presença de infiltrados celulares, pontos de lesões, hiperemia aparente, nem acúmulo de substâncias que indicariam possíveis danos ou aumento de função nos órgãos estudados, pela administração das substâncias testadas.

Corroborando com os resultados, alguns autores não encontraram lesões evidentes nestes órgãos com o uso de extratos de *M. Oleifera* (AWODELE *et al.*, 2012, KIM *et al.*, 2018), porém Santos, 2016, descreveu um acúmulo de glicogênio em hepatócitos e uma maior eosinofilia nos túbulos contorcidos distais dos rins de animais submetidos a tratamento com compostos isolados dos Isotiocianatos de *M. oleifera* o que poderiam ocasionar futuras lesões. Provavelmente o fator protetor dos tratamentos utilizados neste trabalho foi o sinergismo de várias substâncias contidas nos extratos e o estudo de substâncias isoladas sobre o aparecimento de sinais tóxicos faz-se necessário para comprovar essa hipótese.

Estudos sobre o sistema e o trânsito gastrointestinal, submetidos à exposição de *M. oleifera* e seus metabólitos são escassos e pouco discutidos na literatura atual. O potencial antiulcerogênico é o mais estudado demonstrando um efeito protetor da planta sobre este sistema (CHOUDHARY, BODAKHE, GUPTA, 2013). A fim de avaliar o comportamento do trânsito gastrointestinal sobre a administração dos tratamentos (Exb, D12 e C2), foi realizado o teste de esvaziamento gástrico e verificou-se uma taxa de retenção estomacal maior e significativa estatisticamente na dose de 300 mg/Kg nos grupos Exb e C2 demonstrando um retardo no tempo de esvaziamento gástrico que estaria relacionado a presença de compostos secundários. Mecanismos de atraso no EG por interação com os C2 de *M. oleifera* precisam ser estudados para comprovar esta hipótese.

O retardo do tempo de esvaziamento gástrico pode ser positivo se adicionar o fato desta planta ter também um potencial antidiarréico como demonstrado por Saralaya *et al.* (2010), onde a utilização do extrato hidroalcoólico, onde também estão presentes os compostos secundários, da raiz de *M. oleifer* não causaram distúrbios gastrintestinais e possíveis eventos adversos como diarreias, que são sintomas recorrentes em infecções parasitárias e na utilização de alguns tipos de plantas medicinais, estas causando irritações na parede do intestino por liberação de certos metabólitos podendo ocasionar lesões futuras (NICOLLET *et al.*, 2007).

Também ao fato de ser um possível aliado no controle da obesidade, aumentando a saciedade pelo aumento da retenção gástrica como descreve Kim *et al.* (2017) e por também extratos hidroalcoólicos de Moringa inibirem enzimas intestinais e pancreáticas como a α -glicosidase e a lipase (TOMA *et al.*, 2014), respectivamente. Porém o uso deve ser avaliado se combinado com patologias neste sistema que já retardam o EG como gastroparesia e refluxo gastroesofágico.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que a administração oral do extrato aquoso de *Moringa oleifera*, bem como suas frações protéicas e etanólica, contendo compostos secundários, no protocolo estudado, não apresentaram toxicidade, e não causaram eventos adversos significativos no sistema gastrointestinal, em camundongos, classificando-as como substâncias seguras, apresentando estas um elevado controle nas fases de vida livre de nematóides gastrintestinais de caprinos com alto potencial para produção de um bionemático natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMOLA, I.O.; ELOFF, J.N. In vitro anthelmintic effect of *Anogeissus leiocarpus* (dc.) Guill. & Perr. leaf extracts and fractions on developmental stages of *Haemonchus contortus*. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v.8, p.134-139, 2011.
- AMADI, P.U. *et al.* Toxicities of selected medicinal plants and floras of lower phyla. **Alexandria Journal of Medicine**, (2018).
- ARAÚJO, F.B. **Controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos com o uso do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans***. 2009. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias)- Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ASARE, G.A. *et al.* Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 265–272, 2012.
- AWODELE, O. *et al.* Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). **Journal of ethnopharmacology**. n.139, p.330– 336, 2012.
- BALAJI, G. *et al.* Antidiarrhoeal activity of ethanol and aqueous extracts of *Carum copticum* seeds in experimental rats. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, p. S1151-S1155, 2012.
- BATATINHA, M.J.M.; *etal.* Efeitos do suco de alho (*Allium sativum* Linn.) sobre nematódeos gastrintestinais de Caprinos. **Ciência rural**, v.24, p.1265-1266, 2004.
- CABARDO JR., D.E.; PORTUGALIZA, H.P. Anthelmintic activity of *moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, 2017.
- CALABRESI, M.F.F. **Avaliação da atividade de contração e esvaziamento gástrico em ratos gastrectomizados por biosusceptometria AC**. 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada)- Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.
- CHEENPRACHA, S. *et al.* Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorganic & medicinal chemistry**. v.18, n.17, p. 6598-6602, set. 2010.
- CORREA, B.R.; SIMÕES, S.V. D; CORREA, F.R. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido nordestino: controle integrado das parasitoses gastrintestinais visando contornar a resistência anti-helmíntica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.901-908, 2013.

COSTA, T.N. **Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do *aspidospermasubincanum*(apocynaceae) em camundongos.** 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

EKONG, M.B. *et al.* Neuroprotective effect of *Moringaoleifera* leaf extract on aluminium-induced temporal cortical degeneration. **Metabolic brain disease**, 2017.

ELDAIM, M.A.A.; ELRASOUL, A.S.A.; ELAZIZ, S.A.A. *Moringaoleifera* Leaves Aqueous Extract Ameliorates Hepatotoxicity in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Biochemistry and cell biology**, 2017.

EQUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.108– 113, 2011.

FAUSTO, G.C.; *etal.* Protein profile of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and copper. **Parasites & Vectors**, 7:335, 2014.

FAHEY, J.W. *Moringaoleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1, p. 1–33, 2005.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* Larvicidal activity of the water extract of *Moringaoleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.81, n. 2, p. 207-217, 2009.

FOSTER, N. *et al.* Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in *Moringaoleifera*. **Food Chemistry**. n.166, p.456–464, 2015.

GALUPPO, M. *et al.* Anti-inflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Fitoterapia**. v. 95, p. 160-174, jun. 2014.

GRAÇA, J.R.V. **O citrato de sildenafil (viagra®) inibe a motilidade gastrointestinal em ratos acordados e anestesiados e a contratilidade in vitro de tiras isoladas de duodeno de ratos ex vivo.** 2005. 100 f. Tese (Doutorado em farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

KHATTAB, H. *et al.* Relation of ALT and AST levels to the histopathological changes in liver biopsies of patients with chronic hepatitis C genotype 4. **Arab Journal of Gastroenterology**. N.16, p.50–53, 2015.

KAVITHA, C. *et al.* Toxicity of *Moringaoleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicologic Pathology**. n.64, p. 681–687, 2012.

HEL-HAK, H.N. *et al.* Toxic effect of *Moringa peregrina* seeds on histological and biochemical analyses of adult male Albino rats. **Toxicology Reports** 5. P. 38–45, 2018.

KERDSOMBOON, K. *et al.* Soluble *Moringa oleifera* leaf extract reduces intracellular cadmium accumulation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n.5, p. 543-549, 2016.

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

KIM, K.Y. *et al.* Aster pseudoglehni extract stimulates cholecystinin and serotonin secretion *in vitro* and reduces gastric emptying *in vivo*. **Journal of Functional Foods**.n.35, p.436–446, 2017.

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

LEE, J.S. *et al.* Acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies of *Codonopsis lanceolata* extract in Sprague–Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.71, p. 491-497, 2015.

MARCZAK, E.D. *et al.* Arg-ile-Tyr (RIY) derived from rapeseed protein decrease food intake and gastric emptying after oral administration in mice. **Peptides**, v. 27, p. 2065-2068, 2006.

MARRUFO, T. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Mozambique. **Molecules**, v.18, p. 10989-11000, 2013.

MBIKAY, M. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 1–12, 2012.

MECHINENI, A.; *et al.* Effect of fall-grazed sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) on gastrointestinal nematode infections of growing goats. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 221–228, 2014.

MEDEIROS, M.L.S. *et al.* Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**.n.108, p.782–789, 2018.

MELO, A.C.F.L.; *et al.* Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 339-344, 2003.

MUKUNZI, D. *et al.* Comparison of volatile profile of *Moringaoleifera* leaves from Rwanda and China using HS-SPME. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, p. 602–608, 2011.

NDABIGENGESERE, A. *et al.* Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringaoleifera*. **Water Research**, v. 29, n.2, p.703-710, 1995.

NIJIMA, F. *et al.* Inhibitory effect of intracerebroventricularly-administered [D-Arg2, b-Ala4]-dermorphin (1–4) on gastrointestinal transit. **Peptides**, v. 21, p. 295-299, 2000.

NUNES, W.R.R. *et al.* Mecanismos Neurais e Retardo do Esvaziamento Gástrico de Líquido Induzido no Infarto Agudo do Miocárdio em Ratos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia (online)**.2014.

OECD- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, 2001.

OECD- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline TG 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**. Paris: OECD, 2008.

OLIVEIRA, C.F.R. *et al.* A chitin-binding lectin from *Moringaoleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagastakuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n.142 p.67–76, 2017.

Oyagbemi, A., *et al.* Toxicological evaluations of methanolic extract of *Moringaoleifera* leaves in liver and kidney of male Wistar rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 24, n.4, p. 307-312, 2013.

POTRICH, F.B. *et al.* Ação de extratos de plantas medicinais sobre a motilidade do trato gastrointestinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.750-754, 2014.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J.M.D; PIRES, J.M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010.

RODRIGUES, J.V.L. *et al.* Trânsito gastrointestinal de *rattus norvegicus* (berkenhout, 1769) (rodentia: muridae) Após administração de tegaserode. **Jornal Português de Gastreenterologia**. v.21, n.4, p.138---146, 2014.

SADRAEI, H. *et al.* Assessment of hydroalcoholic extract of seeds and leaves of *Moringa peregrina* on ileum spasm. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.3, p. 252-258, 2015.

SALLES, H.O. *et al.* Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 136-143, 2014.

SANTANA, C.R. *et al.* CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MORINGA (*Moringa oleifera* Lam). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.55-60, 2010.

SANTOS, A.O. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and toxicological evaluation of semisynthetic molecules obtained from a benzyl-isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* Lam. in a temporomandibular joint inflammatory hypernociception model in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**.n.98, p. 609–618, 2018.

SARALAYA, M.G. *et al.* Antidiarrheal Activity of Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam Roots in Experimental Animal Models. **International Journal of Pharmaceutical Research**.V.2, n.2, 2010.

SAWANT, P.D. *et al.* Creatinine as a normalization factor to estimate the representativeness of urine sample - Intra-subject and inter-subject variability studies. **Applied Radiation and Isotopes**. N.136,p. 121–126, 2018.

SHEIKH, A. *etal.* Protective effect of *Moringa oleifera* Lam. Leaves against arsenic-induced toxicity in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, p. 353-358, 2014.

SHIN, S.H. *et al.* Single and 90-day repeated oral dose toxicity studies of fermented *Rhus verniciflua* stem bark extract in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 617–626, 2013.

SIDDHARTHA, D. *et al.* *Moringa oleifera* induced potential of serotonin release by 5-HT₃ receptors in experimental ulcer model. **Phytomedicine**, v. 18, p. 91-95, 2011.

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

SOUZA, W.M.A. *etal.* Avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico (EHA) de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrointestinais (Trichostrongylidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 12, p. 278-281, 2010.

SOUZA, C.D., FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p. 135-142, 2006.

TAHA, N.R., AMIN, H.A., SULTAN, A.A. The protective effect of *Moringa oleifera* leaves against cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats. **Tissue and Cell**, v. 47, p. 94-104, 2015.

TAYO, G.M. *et al.* Anthelmintic Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extracts Evaluated *in Vitro* on Four Developmental Stages of *Haemonchus contortus* from Goats. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1702-1710, 2014.

TOMA, A. *et al.* Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of Moringa stenopetalala leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-5, 2014.

TÔRRES, A.R. *et al.* Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.14, p. 373-380, 2005.

TUROLLA, M.S.R., NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.289-306, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 308-313, 2008.

WATERMAN, C. *et al.* Stable, water extractable isothiocyanates from Moringa oleifera leaves attenuate inflammation in vitro. **Phytochemistry**, n.103, 1p.114–122, 2014.