



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VITÓRIA CAMILO DE SOUZA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ANTIGENOTOXICIDADE E DO POTENCIAL QUIMIOPROTETOR
DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam. CONTRA DANOS INDUZIDOS POR
METOTREXATO**

RECIFE
2022

VITORIA CAMILO DE SOUZA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ANTIGENOTOXICIDADE E DO POTENCIAL QUIMIOPROTETOR
DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam. CONTRA DANOS INDUZIDOS POR
METOTREXATO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva
Coorientador: Me. Matheus Cavalcanti de Barros

RECIFE

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Vitória Camilo de Souza.

Avaliação da antigenotoxicidade e do potencial quimioprotetor das folhas de moringa oleifera lam. contra danos induzidos por metotrexato / Vitória Camilo de Souza Silva. - Recife, 2022.

48 p. : il., tab.

Orientador(a): Patrícia Maria Guedes Paiva

Cooorientador(a): Matheus Cavalcanti De Barros

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Quimioproteção. 2. Genotoxicidade. 3. Farmacologia. 4. Bioquímica . 5. Toxicologia . I. Paiva, Patrícia Maria Guedes. (Orientação). II. De Barros, Matheus Cavalcanti. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

VITÓRIA CAMILO DE SOUZA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ANTIGENOTOXICIDADE E DO POTENCIAL QUIMIOPROTETOR
DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam. CONTRA DANOS INDUZIDOS POR
METOTREXATO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à coordenação do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Aprovado em: __/__/____

Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Avaliador 1
Universidade Federal de Pernambuco

Avaliador 2
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sergio e Vera, por todo o amor e dedicação que recebi durante a minha caminhada, por todo esforço para que eu tivesse uma boa educação e por sempre apoiarem as minhas escolhas, desde o cursinho até a minha escolha de curso e trajetória da faculdade. Sem esse apoio eu não conseguiria terminar este curso. Vocês são uma parte fundamental de quem sou hoje. Amo Vocês.

A toda a minha família, tias e tios, primos e primas, por todo amor e apoio que recebi ao longo da minha trajetória. Vocês também fazem parte desta conquista. Aos grandes amigos que a Universidade Federal de Pernambuco me presenteou, vocês foram peças muito importante na minha vida ao longo desses cinco anos. Ao lado de vocês esta caminhada foi mais leve, e sou grata pelos momentos que dividimos de alegrias e tristezas, mas sempre de mãos dadas fortalecendo uns aos outros.

É com muita admiração e carinho que gostaria de expressar meu agradecimento a minha orientadora, Prof.^a Dr^a Patrícia Paiva por tudo que fez e faz por mim e por ter me aceitado de forma tão carinhosa e gentil do seu laboratório de Bioquímica de Proteínas (BIOPROT) e pela oportunidade, profissionalismo e por ter influenciado de forma significativa e decisiva em meu crescimento científico e como pessoa.

Ao meu co-orientador Matheus Cavalcanti, por quem tenho grande admiração e carinho, pelo exemplo, pelas risadas, pela paciência, pela ajuda nos experimentos, pelas correções e por tudo o que aprendi. Espero um dia ser competente como você. Obrigada!

Dedico um lugar especial a meus amigos tanto de dentro da universidade, quanto aos de fora, seja de forma virtual ou não, por darem seu apoio nos momentos difíceis tanto em assuntos acadêmicos, quanto em assuntos da vida, por serem pelo ombro amigo que foi essencial para manter o foco e a postura perante os obstáculos da vida, principalmente durante a pandemia que foi um momento difícil na vida de muitas pessoas.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Agradeço ao CNPQ por financiar e apoiar o meu projeto e o de outros estudantes que buscam conhecimento e avanço da área científica do país e reconhece a sua devida importância para o mundo.

E por fim, agradeço a todos que colaboraram de forma direta e indireta com este trabalho e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), professores do curso, aos funcionários da universidade, pelo acolhimento e troca de experiências que foram fundamentais na minha jornada acadêmica.

“Eu procuro lembrar a mim mesmo, umas cem vezes por dia, que minha vida privada e profissional depende de outras pessoas, vivas e mortas, e que eu preciso me superar para dar aos outros algo próximo do que recebi e recebo”

(Albert Einstein)

RESUMO

Moringa oleifera Lam. tem sido referida como árvore maravilhosa ou milagrosa em muitos países devido aos potenciais nutricionais e medicinais que apresenta. A maioria das drogas usadas no tratamento do câncer, como o metotrexato (MTX), comprometem o indivíduo devido aos efeitos citotóxicos. Diante disso, o presente estudo investigou o potencial quimioprotetor de infusão e farinha das folhas de *M. oleifera* contra danos induzidos por MTX em camundongos. As folhas de *M. oleifera* foram coletadas, secase moídas para obtenção da farinha. A infusão foi obtida a partir da solubilização da farinha (10 g) em 100 mL de água destilada (100 °C, 15 min) seguido de filtração. Os animais foram divididos em seis grupos (n=5): Controle negativo (CN), Infusão (1.000mg/kg), farinha (250 mg/kg), controle positivo (MTX a 20 mg/kg), pré tratamento com infusão ou farinha durante tres dias seguido de administração de MTX. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como o peso e a histologia dos órgãos foram avaliados. A antigenotoxicidade foi determinada utilizando o ensaio cometa a partir do cálculo do índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O tratamento com MTX induziu alterações na série vermelha e leucocitária, aumento de marcadores de danos hepáticos e modificações histopatológicas no fígado e rins. O pré-tratamento com as preparações das folhas foi capaz de inibir os efeitos colaterais promovidos pelo MTX nos parâmetros bioquímicos e hematológicos com melhores valores obtidos para a infusão. Na genotoxicidade, os tratamentos com a infusão (ID = $48,29 \pm 8,02$; FD = $17,0 \pm 2,90$) e farinha (ID = $50,83 \pm 7,67$; FD = $24,2 \pm 0,8$) diminuíram os danos promovidos pelo MTX (ID = $119,4$; FD = $50,67 \pm 2,57$). A infusão (ID = $39,17 \pm 7,46$; FD = $29,29 \pm 4,50$) e a farinha (ID = $34,83 \pm 4,96$; FD = $26,33 \pm 2,16$) não foram genotóxicas em relação ao CN (ID = $47,83 \pm 6,51$; FD = $26,13 \pm 2,58$). A farinha e a infusão obtidas a partir das folhas de *M. oleifera* apresentaram efeito antigenotóxico e quimioprotetor contra danos hematológicos, bioquímicos, teciduais e genotóxicos induzidos por metotrexato (MTX), fármaco amplamente utilizado para o tratamento de câncer.

Palavras-chave: ensaio cometa. chá. produtos naturais. extrato.

ABSTRACT

Moringa oleifera Lam. It has been referred to as a wonder or miracle tree in many countries due to its nutritional and medicinal potentials. Most drugs used in cancer treatment, such as methotrexate (MTX), compromise the individual due to cytotoxic effects. Therefore, the present study investigated the genoprotective and chemoprotective potential of infusion and meal of *M. oleifera* leaves against MTX - induced damage in mice. The leaves of *M. oleifera* were collected, dried and ground to obtain the flour. The infusion was obtained by solubilizing the flour (10 g) in 100 ml of distilled water (100°C, 15 min) followed by filtration. The animals were divided into six groups (n=5): Negative control (NC), Infusion (1,000 mg/kg), flour (250 mg/kg), positive control (MTX at 20 mg/kg), pre-treatment with infusion or flour for three days followed by MTX administration. Biochemical and hematological parameters, as well as organ weight and histology were evaluated. Antigenotoxicity was determined using the comet assay from the calculation of damage index (DI) and damage frequency (DF). Treatment with MTX induced changes in the red and leukocyte series, increased markers of liver damage and histopathological changes in the liver and kidneys. The pre-treatment with the leaf preparations was able to inhibit the side effects promoted by MTX in the biochemical and hematological parameters with better values obtained for the infusion. Regarding genotoxicity, treatments with infusion (DI = 48.29 ± 8.02 ; DF = 17.0 ± 2.90) and flour (DI = 50.83 ± 7.67 ; DF = 24.2 ± 0.8) reduced the damage caused by MTX (DI = 119.4 ; DF = 50.67 ± 2.57). Infusion (DI = 39.17 ± 7.46 ; DF = 29.29 ± 4.50) and flour (DI = 34.83 ± 4.96 ; DF = 26.33 ± 2.16) were not genotoxic in relation to NC (DI = 47.83 ± 6.51 ; DF = 26.13 ± 2.58). The flour and infusion obtained from the leaves of *M. oleifera* showed antigenotoxic and chemoprotective effects against hematological, biochemical, tissue and genotoxic damages induced by methotrexate.

Keywords: comet assay. tea. natural products. extract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A - Aspectos gerais de <i>Moringa oleifera</i> . B - Flores. C - Sementes. D - Folhas. E - Frutos.....	17
Figura 2: Potenciais medicinais das folha de <i>Moringa oleifera</i>	18
Figura 3: Comparação entre as moléculas de MTX e ácido fólico.....	19
Figura 4: Rota metabólica do metotrexato	20
Figura 5: Micronúcleo em eritrócito de peixe	24
Figura 6: Teste do Cometa. Classes de danos de DNA: Classe 0, Classe 1, Classe 2, Classe 3, Classe 4	25
Figura 7: Fotomicrografias representativas do fígado, baço e rim de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) e infusão (1.000 mg/kg) das folhas de <i>Moringa oleifera</i> isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles	35
Figura 8: Genotoxicidade da farinha (250 mg/kg) e infusão (1.000 mg/kg) das folhas de <i>Moringa oleifera</i> isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros hematológicos de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) ou infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *Moringa oleifera* isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.....32

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) ou infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *Moringa oleifera* isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.....32

Tabela 3: Peso relativo dos órgãos (mg/g) de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) e infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *Moringa oleifera* (250 mg/kg) isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Moringa oleifera</i>	16
3.2 USOS E APLICAÇÕES DO METOTREXATO	19
3.3. GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	21
3.3.1 Ensaio cometa	24
3.4. QUIMIOPROTEÇÃO E ANTIGENOTOXICIDADE.....	25
4 METODOLOGIA	27
4.1. PREPARAÇÃO DA INFUSÃO	27
4.2. ANIMAIS E ÉTICA NA PESQUISA	27
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.4. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS	28
4.5. ANÁLISES HISTOLÓGICAS	28
4.6. ENSAIO COMETA	29
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO I	48

1 INTRODUÇÃO

Moringa oleifera Lam., também conhecida como moringa ou cedro, é nativa do sul da Índia e amplamente cultivada no nordeste brasileiro, onde é utilizada tradicionalmente para diversas finalidades no uso popular (AYERZA, 2012). Essa planta tem sido referida como árvore maravilhosa ou milagrosa em muitos países devido aos potenciais nutricionais e medicinais que apresenta, sendo inclusive indicada como uma alternativa sustentável para o combate à desnutrição (GUPTA et al., 2018; CHUMARK et al., 2008). Apesar de todas as partes da planta serem utilizadas para algum fim, a folha é a mais usada pela população, cuja utilização envolve geralmente o preparo de infusões ou o consumo *in natura* (COZ-BOLAÑOS et al., 2018).

Folhas frescas dessa planta possuem 4 vezes a vitamina A da cenoura, 7 vezes a vitamina C da laranja, 4 vezes o cálcio do leite e 3 vezes o potássio da banana (THURBER; FAHEY, 2009). Dentre as propriedades medicinais já descritas para as folhas de moringa estão as atividades anticancerígena (BERKOVICH et al., 2013), antimicrobiana (MANDAL et al., 2014), anti-inflamatória (SULAIMAN et al., 2008) e antioxidante (VONGSAK et al., 2013). Além disso, estudo desenvolvido por Sathya et al. (2010) demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *M. oleifera* apresenta alto potencial em prevenir danos induzidos pela ciclofosfamida (fármaco empregado para o tratamento de câncer) ao material genético de camundongos.

O câncer é a segunda causa de morte em países em desenvolvimento, no entanto, a maioria das drogas atualmente utilizadas na quimioterapia trazem um comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro devido aos efeitos imunossupressores, citotóxicos e genotóxicos (YU et al., 2014). Por isso, nos últimos anos tem sido estimulada a investigação de substâncias de origem natural que possam inibir, reverter ou retardar esses efeitos (LOBO et al., 2010; CHAUDHARY; SAINI; GOYAL, 2007). Uma das drogas empregadas para o tratamento do câncer é o metotrexato (MTX), medicamento usado para o tratamento de câncer de testículo, ovário, pulmão e vários tipos de sarcomas e carcinomas (SALEM et al., 2017). Apesar de ser amplamente utilizado, a administração de MTX induz danos aos rins, fígado e ao material genético, bem como promove a formação de espécies reativas de oxigênio (SALEM et al., 2017; WIDEMANN; ADAMSON, 2006).

Diante o exposto, as propriedades biológicas das folhas de *M. oleifera* e a necessidade de esforços para o descobrimento de produtos naturais que diminuam os efeitos colaterais provocados pelas drogas anticâncer justificam a investigação do potencial quimioprotetor e antígeno tóxico das folhas de *M. oleifera* contra danos induzidos por MTX.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial quimioprotetor e genoprotetor de infusão e farinha das folhas de *M.oleifera* contra alterações induzidas por metotrexato (MTX) a partir de ensaio *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir a farinha e a infusão das folhas de *M. oleifera*;
- b) Realizar ensaio *in vivo* de quimioproteção e antigenotoxicidade utilizando seis grupos experimentais;
- c) Determinar parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais tratados;
- d) Realizar análise histológica dos órgãos dos animais tratados e comparar as imagens com aquelas dos animais dos grupos controle negativo e positivo;
- e) Definir o potencial antigenotóxico das folhas de *M. oleifera* através do ensaio cometa.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

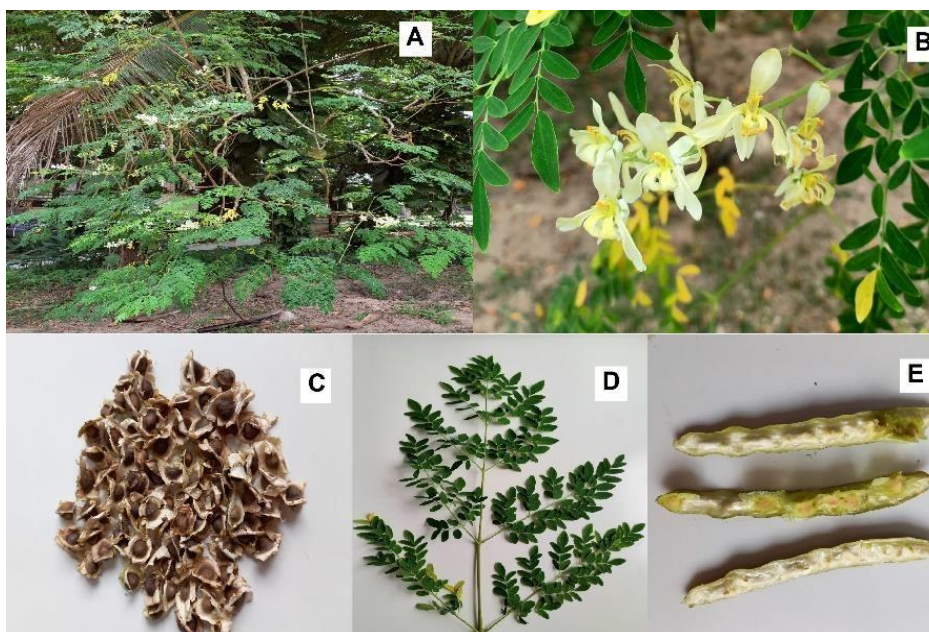
3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Moringa oleifera*

Moringa oleifera, pertencente à família monogenérica Moringaceae, é nativa do norte da Índia e cresce em vários países tropicais (BEZERRA et al., 2004). Árvores de moringa são cultivadas em diversos locais do mundo, tais como na África, América Central e do Sul, Sri Lanka, Índia, México, Malásia, Indonésia e Filipinas (ANWAR; BANGER, 2003). A planta (Figura 1A) possui pequeno ou médio porte (5 a 10 metros de altura) e flores brancas (Figura 1B) docemente perfumadas (ROBERTS, 2000; CHATTERJEE; PAKRASHI, 1991). As folhas (Figura 1D) são longo-pecioladas, bipinadas, folíolos obovais, cujo comprimento é de até 3 centímetros (SILVA; MATOS, 2008).

A moringa é uma planta de rápido crescimento, resistente às secas e com frutos comestíveis (Figura 1E) e por conter essas qualidades é considerada uma planta bastante adequada para ser cultivada nas regiões áridas do Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008). A resistência da planta não se restringe à seca mas também a solo levemente alcalino e ácido (CHUMARK et al., 2008). Descrita como “árvore maravilhosa ou milagrosa”, quase todas as partes da planta são utilizadas para alguma finalidade, como a casca, raiz, frutos, flores, folhas, semente e goma (PRICE, 1985; PARROTTA, 2001). As folhas podem ser consumidas frescas, cozidas ou armazenadas como pó seco durante muitos meses sem refrigeração, sem perda de valor nutricional (PRICE, 1985; PARROTTA, 2001).

Sementes de *M. oleifera* (Figura 1C) são usadas para remoção de turbidez da água no nordeste e em outras regiões brasileiras de difícil acesso à água potável, sendo assim amplamente empregadas como um método alternativo de tratamento de água (GASSENSCHMIDT et al., 1995). A suspensão da semente triturada reduz a turbidez e melhora a qualidade da água, tornando-a mais adequada ao consumo humano e de outros animais (PATERNIANI, 2009; SANTOS, 2011; SANTOS, 2013.) Estudos têm demonstrado que o extrato proteico de *M. oleifera* pode remover quantidades significativas de matéria orgânica total da água, melhorando aspectos como aroma e cor, sendo tal atividade relacionada à presença de moléculas coagulantes na preparação (SANTOS et al., 2011).

Figura 1: A - Aspectos gerais de *Moringa oleifera*. B - Flores. C - Sementes. D - Folhas. E - Frutos.



Fonte: Autoria própria, 2022

3.1.1 APLICAÇÕES MEDICINAIS DAS FOLHAS DE *M. oleifera*

As folhas de *M. oleifera* são usadas como alimento devido o potencial nutricional, particularmente na Índia, Paquistão, Filipinas, Havaí e muitas partes do continente africano. A composição nutricional da moringa envolve altos valores de proteínas, lipídios, vitaminas, carboidratos e fibras (SOUZA; KULKARNI, 1993; ANWAR et al., 2005). De acordo com Hsu et al. (2006), folhas dessa planta contêm sete vezes mais vitamina C que as laranjas, quatro vezes o cálcio do leite, quatro vezes a mais vitamina A que encontrado nas cenouras e duas vezes a proteína do leite. Além disso, a planta tem sido usada para combater a desnutrição entre bebês e mulheres que amamentam em muitos países em desenvolvimento (Fuglie, 1999; Price, 2007). As aplicações das folhas de *M. oleifera* não se restringem ao valor nutricional, uma vez que apresentam diversos potenciais medicinas, sendo portanto considerada um nutraceutico (KOU et al., 2018).

Na figura 2 estão representadas algumas atividades relatadas para as folhas de *M. oleifera* na literatura científica. Preparações obtidas a partir das folhas de *M.oleifera* são empregadas tradicionalmente para o tratamento de malária, febre tifoide, pressão arterial, artrite e hipertensão (SIVASANKARI; ANANDHARAJ;

GUNASEKARAN, 2014). Além disso, as folhas também possuem alto potencial antioxidante devido à elevada quantidade de polifenóis. Os níveis de atividade antioxidante (em μmol equivalente de trolox/mL) observado nas preparações aquosas das folhas (infusão e decocção) foram da ordem de $5,97 \pm 0,08$ e $5,75 \pm 0,28$ no ensaio do ABTS, $0,720 \pm 0,01$ e $0,655 \pm 0,03$ no teste do DPPH e $1,469 \pm 0,06$ e $1,185 \pm 0,08$ no teste de poder de redução do íon ferro (FRAP) (COZ-BOLAÑOS et al., 2018).

Segundo Martins et al. (2000), as formas mais empregadas para obtenção das propriedades medicinais das plantas pela população em geral são os chás obtidos por infusão, decocção ou maceração.

Figura 1 – Potenciais medicinais das folhas de *Moringa oleifera*



Fonte: Barros et al. (2021)

Khan et al. (2017) observaram que o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* administrado por via oral durante 3 semanas (100 mg/kg) para ratos com diabetes induzida por estreptozotocina e a 200 mg/kg para camundongos com dieta rica em lipídeos, restaurou a glicose sanguínea, o perfil lipídico e o nível de enzimas hepáticas de forma significativa em ambos os grupos. Fard et al. (2015) também observaram que o extrato hidroetanólico das folhas inibiu significativamente a secreção de óxido nítrico e outros marcadores inflamatórios em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). De acordo com Potestà et al. (2019) células de Jukart (linfoblastos leucêmicos de células T) e células THP1 (monócitos leucêmicos) foram mais suscetíveis aos tratamentos com o extrato das folhas de moringa que as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs). Outras atividades tem sido relatadas para as folhas de *M. oleifera*, tais como antimicrobiana, atividade

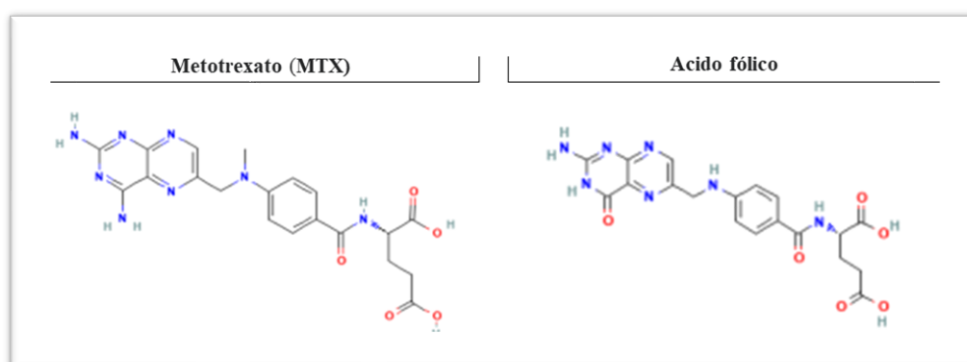
imunomoduladora e atividade citoprotetora (EL SHANAWANY et al., 2019; SARKAR et al., 2017; ELGAMILY et al., 2016).

O efeito quimioprotetor do extrato etanólico de folhas de *M. oleífera* (i.p. 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg) foi avaliado em camundongos durante sete dias de pré-tratamento contra danos induzidos por ciclofosfamida (CP). Os autores avaliaram os danos após os tratamentos utilizando o teste do micronúcleo (MN) na medula óssea e o ensaio cometa no fígado. Os resultados obtidos em ambos os testes mostraram que nos animais pré-tratados com o extrato houve diminuição do dano ao DNA de maneira dose dependente, apontando para a presença de fitoconstituintes quimiopreventivos nas folhas de *M. oleífera* (SATHYA et al., 2010).

3.2. USOS E APLICAÇÕES DO METOTREXATO

O Metotrexato (MTX) ou 4-amino-N10 metil ácido pteroglutâmico é um fármaco antimetabólito análogo ao ácido fólico (Figura 3) mais comumente utilizado em quimioterapia, em doenças autoimunes, como artrite reumatoide (NEVES et al., 2009). Além disso, o MTX pode ser empregado para o tratamento de câncer de testículo, ovário, pulmão e vários tipos de sarcomas e carcinomas (WU et al., 2010; SALEM et al., 2017). O medicamento também é eficaz para pacientes com psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal e outras doenças do tecido conjuntivo (NEVES et al., 2009). O MTX pode ser administrado, via intravenosa, subcutânea, intramuscular e é um dos únicos tipos de quimioterápicos que pode ser administrado por via oral. Todavia, sua baixa solubilidade aquosa afeta a sua biodisponibilidade na corrente sanguínea e resulta na sua excreção elevada na forma ativa (WANG, YAN et al., 2017).

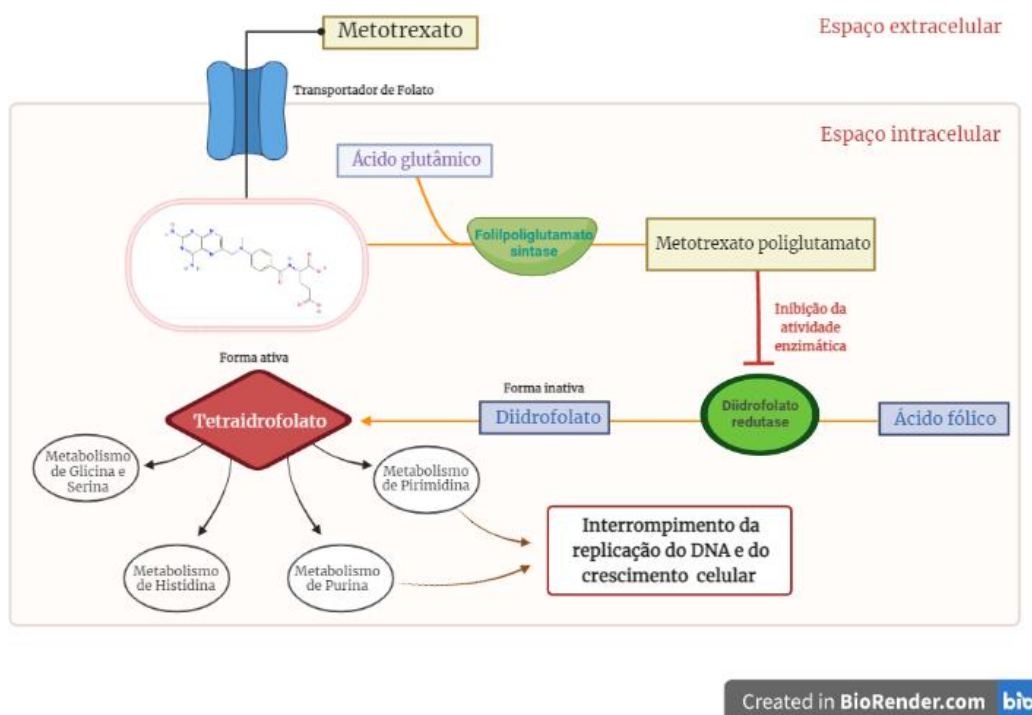
Figura 3. Comparação entre as moléculas de MTX e ácido fólico



Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2022)

A rota metabólica do MTX (Figura 4) inicia com a absorção da molécula pela célula através dos transportadores humanos de folato reduzido (SLC19A1) seguido de poliglutamatação no citoplasma, aumentando sua retenção no meio intracelular. Tanto o metotrexato quanto o metotrexato-poliglutamato inibem a enzima diidrofolato-redutase, a qual é responsável por transformar a forma inativado ácido fólico (diidrofolato) em forma ativa (tetraidrofolato). O tetraidrofolato está envolvido em muitas reações de transferência de carbono único, incluindo a síntese de nucleotídeos de DNA e RNA, o que impossibilita a replicação do DNA da célula e interrompe o crescimento celular (KATZUNG, 2003).

Figura 4. Rota metabólica do metotrexato.



Fonte: Autoria própria (2022)

A atividade anti-inflamatória e imunomoduladora do MTX em baixas doses, devido à ação apoptótica que possui sobre os leucócitos faz com que o medicamento também seja eficaz em pacientes transplantados (TORRES, 2019). Existem evidências de que a indução da apoptose causada pelo MTX está relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sobre as quais os linfócitos T demonstram particular suscetibilidade (HERMANN et al., 2005; NEVES et al., 2009). Devido à ação citotóxica, o uso de MTX está relacionado a uma série de

efeito adversos, tais como toxicidade ao trato gastrointestinal (náuseas, vômitos), hepatotoxicidade aguda e crônica e predisposição a maiores riscos de toxicidade sistêmica (XAVIER, 2010; LAHARIE et al., 2008). Além disso, danos aos rins e ao material genético também têm sido relatados como efeitos colaterais relacionados ao uso do metotrexato (SALEM et al., 2017; WIDEMANN; ADAMSON, 2006).

3.3. GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA), produzindo alterações em sua estrutura ou função e quando essas alterações se fixam de forma capaz de serem transmitidas denominam-se mutações (TURKEZ; ARSLAN; OZDEMIR, 2017). Nesse sentido, é importante salientar que nem sempre um composto genotóxico é mutagênico, uma vez que as alterações causadas na fita de DNA são passíveis de reparação pelos mecanismos endógenos da célula. Apesar de também serem fonte de variabilidade genética, as mutações podem levar a uma alteração da função gênica, a qual pode estar relacionada a uma série de doenças e distúrbios, sendo o câncer o mais conhecido deles (SLOCZYNSKA et al., 2014). Devido ao aumento da exposição da população a agentes genotóxicos, o número de doenças genéticas tem crescido continuamente em seres humanos e animais (NAGARATHNA et al., 2013).

Radiações ionizantes, luz ultravioleta e substâncias químicas são exemplos de fatores extrínsecos ao organismo que podem promover danos à molécula de DNA (FENG et al., 2018). Além disso, fatores endógenos (intrínsecos) também são responsáveis por uma gama de danos ao DNA diariamente, sendo que o principal fator é a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DOWDELL et al., 2017; ROBERTS et al., 2006). Ademais, os danos ao DNA ativados pelo estresse oxidativo promovem a inativação de genes importantes para o processo de reparo ao DNA (DOWDELL et al., 2017). Os tipos de danos ao DNA variam de quebras simples ou duplas da fita, ligações cruzadas entre as bases e adição de substâncias químicas que alteram a constituição das bases nitrogenadas (KLAASSEN; WATKINS, 2009).

Um dos principais problemas do uso de compostos naturais é a crença de que eles são isentos de toxicidade. Apesar dos compostos naturais possuírem uma ação similar de medicamentos alopáticos, eles podem também ter efeitos colaterais, sendo necessário reunir conhecimentos populares e científicos para garantir a

segurança e eficácia desses produtos. O consumo de plantas com propriedades medicinais mostrou, ao longo dos anos, que certas plantas são constituídas por substâncias potencialmente nocivas a saúde, dentre elas, alcaloides pirrolizidínicos, antraquinonas e lactonas sesquiterpênicas. Assim, o balanço entre os efeitos tóxicos e a ação farmacológica de um determinado produto natural é um parâmetro fundamental para verificar sua aplicação da terapêutica (WARGOVICH, 2001; VEIGA-JÚNIOR et al., 2005).

No campo da biotecnologia, mesmo que haja a grande necessidade pela descoberta de novas drogas, a avaliação da genotoxicidade é essencial para assegurar a utilização de novos produtos, por isso o processamento de um novo agente terapêutico ocorre com base nos resultados de testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES et al., 1995). A segurança no uso das plantas medicinais deve ser garantida através de extensas pesquisas científicas, farmacovigilância, controle regulatório e melhor comunicação entre pacientes e profissionais da saúde (ZHOU et al., 2004). No Brasil, a Agência Nacional de vigilância sanitária (ANVISA) solicita testes genotóxicos para a aprovação de novos produtos, estabelecendo normas e fornecendo diretrizes para a realização de estudos sobre toxicidade. Nesse sentido, diferentes modelos têm sido empregados na avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade visando a comprovação de segurança de produtos sintéticos ou naturais.

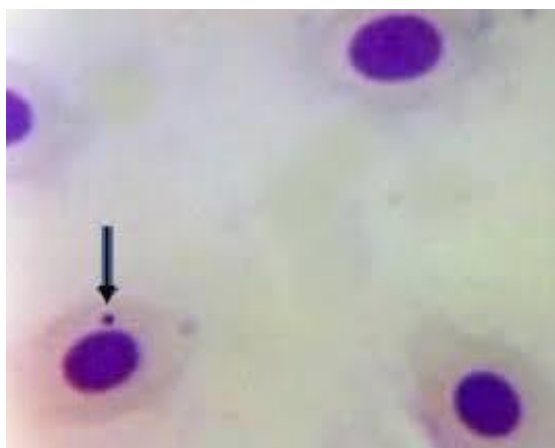
O teste de Ames permite identificar substâncias com potencial para induzir mutações gênicas em cepas de *Salmonella typhimurium* com mutações em vários genes no operon da histidina, sendo incapazes de crescer e formar colônias na ausência deste aminoácido. Quando expostas a uma substância que possa induzir a formação de mutações, a função do operon é restaurada, tornando-se assim as bactérias independentes da presença de histidina no meio de cultura. Um aumento do número de colônias formadas relativamente ao controlo negativo é indicativo de uma atividade mutagênica (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). O potencial mutagênico do extrato hidroalcoólico do louro-de-cheiro (*Ocotea duckei*) foi demonstrado a partir do teste de Ames, no qual a preparação apresentou-se mutagênica para as linhagens TA97, TA100 e TA102, na presença ou ausência de ativação metabólica (MARQUES et al., 2003).

Os testes com *Allium cepa* (cebola) tem sido reconhecido como padrão para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais

(CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). O teste de *Allium cepa* desenvolvido, foi avaliado como um instrumento útil para a pesquisa do potencial citotóxico e genotóxico de águas contaminadas, produtos químicos e extratos de plantas (CUCHIARA; BORGES; DOBROWS, 2012). Esse teste têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (MA et al., 1995). Segundo Kurás et al. (2006), a espécie *A. cepa* é de fácil preparação para análise, pois contém células meristemáticas homogêneas e 16 cromossomos grandes facilmente corados e observados. Também é considerado um teste eficaz devido à sua elevada sensibilidade, rapidez, baixo custo, facilidade de manipulação e boa correlação com células de mamíferos (CUCHIARA; BORGES; DOBROWS, 2012). O teste do *A. cepa* tem sido utilizado para avaliação de produtos naturais, como mostra o estudo conduzido por Prajitha e Thoppil (2016) que avaliou o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato aquoso das folhas de *Amaranthus spinosus*, demonstrando que a preparação reduziu o índice mitótico e promoveu quebras cromossômicas mesmo na menor concentração testada (0,05 g/L). Outro estudo observou o efeito genotóxico do extrato metonólico de *Euphorbia hirta* utilizando *A. cepa* e mostrou um efeito dose-dependente em relação a concentração do extrato e alterações cromossômicas (KWAN et al., 2012).

Outro teste empregado para análise genotóxica é o teste do micronúcleo, o qual consiste em um teste rápido e sensível, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais quanto numéricas (HEDDLE et al., 1983). Os micronúcleos (Figura 5) resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou que se atrasaram em relação aos demais em sua migração em direção aos polos do fuso mitótico, podendo ser induzidos por agentes que são capazes de quebrar o DNA (clastogênicos) ou de interferir com a formação do fuso mitótico (aneugênicos) (HEDDLE et al., 1991). O ensaio pode ser usado em vários sistemas biológicos para o monitoramento de genotoxicidade, incluindo no sangue humano e de outros animais (MERSCH; BEAUVAIS, 1997). Os micronúcleos são formados ao longo da eritropoiese devido à quebras ou perdas cromossômicas, assim, após o processo de enucleação é possível observar apenas o fragmento cromossômico (micronúcleo) em eritrócitos jovens (MAVOURNIN et al., 1990). Algumas vantagens do teste do micronúcleo envolvem o alto rigor estatístico e a detecção de danos apenas em células mitóticas (MILLER; POTTER, 1998).

Figura 5: Micronúcleo em eritrócito de peixe.



Fonte: SILVA (2014)

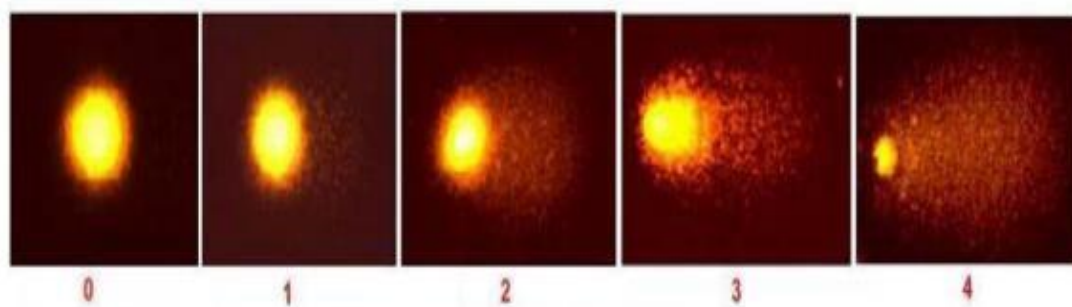
3.3.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única (SCGE) é um método versátil, simples e adaptável para medir danos no DNA e reparos em nível de célula individual (BELPAEME et al., 1998). O teste é baseado na capacidade de fragmentos de DNA carregados negativamente migrarem através de um gel de agarose em resposta a um campo elétrico (COSTA; TEIXEIRA, 2014). Se o DNA não apresentar dano, migrará de forma homogênea, formando um círculo, no entanto, caso haja dano, o DNA fragmentado migrará mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores, formando uma espécie de cauda de cometa, motivo pelo qual o teste ficou conhecido como ensaio cometa (COSTA; TEIXEIRA, 2014). Uma vez que danos no DNA são frequentemente específicos para células e tecidos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula (TICE, 1995).

A metodologia do ensaio consiste na lise celular, relaxamento do DNA e corrida eletroforética, sendo possível observar os fragmentos de DNA provindos da quebra causada pelo agente testado após coloração (FAIRBAIRN et al., 1995; ANDERSON; BERGER, 1994; SILVA et al., 2003). Além de permitir a visualização da presença ou não da cauda resultada pelos fragmentos de DNA, a variação do tamanho da mesma fornece informação para ser possível obter a classificação do dano em diferentes classes, classificado de 0 a 4 (Figura 6), sendo a classe 0 referente à visualização do DNA íntegro, ao passo que a classe 4 representa o dano máximo, ou seja, a

visualização de uma grande cauda de cometa, formada pela presença de muitos fragmentos de DNA (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013).

Figura 6: Teste do Cometa. Classes de danos de DNA: 0-Classe 0; 1-Classe 1; 2-Classe 2; 3- Classe 3; 4-Classe 4.



Fonte: Sponchiado (2008)

3.4 QUIMIOPROTEÇÃO E ANTIGENOTOXICIDADE

A quimioproteção consiste na utilização de compostos naturais ou sintéticos para bloquear, reverter ou prevenir o desenvolvimento de câncer (MANACH et al., 2009). A carcinogênese envolve a exposição da célula a agentes cancerígenos que poderão modificar a capacidade proliferativa das células (BAYNES; DOMINICZAK, 2000). Diante disso, compreendendo a quimioprevenção de uma forma mais ampla, este conceito tem sido empregado para definir moléculas ou preparações capazes de mitigar danos celulares potencialmente carcinogênicos advindos da exposição a produtos químicos diversos. Existem pelo menos dois mecanismos principais para a quimioproteção, os quais consistem na antimutagênese e na antiproliferação. A antimutagênese inclui a inibição da absorção de agentes cancerígenos, a desintoxicação de carcinógenos e o aumento do reparo do DNA (KELLOFF, 1999).

Produtos naturais têm sido amplamente testados como estratégia de quimioproteção especialmente devido ao efeito antioxidante, uma vez que danos ao DNA ocorrem comumente pela formação de espécies reativas de oxigênio que surgem durante o metabolismo carcinogênico ou processos celulares (TALALAY et al., 1995). Extratos vegetais com propriedades antioxidantes, devido à presença de metabólitos, como por exemplo os flavonóides, neutralizam a produção de espécies reativas de oxigênio e combatem o estresse oxidativo (AHMADI; SHADBOORESTAN, 2015). Além disso, a quimioproteção com agentes naturais oferece uma abordagem atraente

para aumentar as defesas do corpo e evitar danos ambientais e endógenos (SURH, 2003).

A maioria dos trabalhos envolvendo quimioproteção de efeitos advindos de fármacos utilizados para o tratamento de câncer envolve a ciclofosfamida (CP). Ciclofosfamida é um agente citotóxico e alquilante amplamente utilizado como agente antitumoral e imunossupressor (JALALI; HASSANZADEH; MALEKINEJAD, 2011). Administração oral do extrato metanólico de *Phyllanthus amarus* (250 e 750 mg/kg) reduziu significativamente a mielossupressão e melhorou o nível de leucócitos quando comparado ao grupo tratado apenas com CP (KUMAR; KUTTAN, 2005). A avaliação do efeito quimioprotetor do extrato etanólico de folhas de *M. oleifera* per os em ratos quanto à genotoxicidade induzida por ciclofosfamida (CP) demonstrou que nos animais pré-tratados com a preparação houve redução na porcentagem de MN induzida por CP com o aumento da concentração do extrato (SATHYA et al., 2010). Glicosinolatos com efeito quimiopreventivo tem sido amplamente relatados para espécies pertencentes ao gênero *Moringa* (FAHEY et al., 2018). Além da CP, outros trabalhos tem utilizado Metotrexato para análise de quimioproteção, como o estudo desenvolvido por Olayinka et al. (2016), no qual foi observado que o ácido gálico protegeu contra a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzidas pelo MTX em ratos, através da redução do dano oxidativo aos tecidos.

3 METODOLOGIA

3.1 PREPARAÇÃO DA INFUSÃO E DA FARINHA DE FOLHAS DE *M. oleífera*

As folhas de *M. oleífera* foram coletadas na Universidade Federal de Pernambuco, lavadas com água destilada, secas à 28 °C, moídas e a farinha foi armazenada até a utilização. A administração da farinha foi realizada por gavagem nos animais utilizando água destilada como veículo. Para preparação da infusão, 10 gramas da farinha de folhas foram adicionadas a água destilada (100 mL, 100 °C) e mantidas em repouso durante 15 min. Em seguida, a preparação foi filtrada, liofilizada e armazenada em freezer até a realização dos testes.

3.2 ANIMAIS E ÉTICA NA PESQUISA

Os Camundongos Swiss foram obtidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Antes do uso nos experimentos, os animais foram alojados sob condições padronizadas (22 ± 2 °C, em ciclo 12-12 h claro/escuro e 50 - 60% de umidade) e alimentados com uma dieta padrão de camundongos disponível *ad libitum*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFPE sob o protocolo nº 0031/2021 (ANEXO I).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As doses utilizadas nos ensaios de quimioproteção e antigenotoxicidade foram definidas a partir do estudo de toxicidade desenvolvido por Barros et al. (2022), tendo em vista que no estudo do mesmo foi observado que dosagens em quantidade maior podem gerar toxicidade nos animais. Para a realização do estudo, os animais foram divididos em seis grupos (n=5 animais por grupo) e os tratamentos foram realizados da seguinte forma:

- **Grupo 1 (Controle negativo)** - Tratamento via oral com água destilada (veículo) durante três dias (0,1 mL/10g) seguido de administração intraperitoneal de solução salina;
- **Grupo 2 - (Infusão)** - Tratamento via oral durante três dias com a infusão das folhas de *M. oleífera* (1000 mg/kg) seguido de administração intraperitoneal de solução salina;
- **Grupo 3 (Farinha)** - Tratamento via oral durante três dias com a farinha das folhas de *M. oleífera* (250 mg/kg) seguido de administração intraperitoneal de solução salina;

- **Grupo 4 (Controle positivo)** - Tratamento via oral água destilada por três dias seguido de aplicação intraperitoneal de MTX (20 mg/kg);
- **Grupo 5 (Infusão/MTX)** - Tratamento via oral com a infusão das folhas de *M. oleifera* (1.000 mg/kg) por três dias seguido de aplicação intraperitoneal de MTX (20 mg/kg);
- **Grupo 6 (Farinha/MTX)** - Tratamento via oral durante três dias com a farinha das folhas de *M. oleifera* (250 mg/kg) seguido de aplicação intraperitoneal de MTX (20 mg/kg).

Após o quinto dia de experimentação, foi realizada a coleta de sangue através da veia caudal para avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa. Posteriormente, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina e xilazina (2:1; v/v) para coleta de sangue por punção cardíaca para a realização de análises bioquímicas e hematológicas.

3.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Para a análise dos parâmetros hematológicos, o sangue coletado foi transferido para um tubo contendo EDTA. Os seguintes parâmetros foram determinados: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos em analisador hematológico automático MaxCell Vet 500 D e microscópio óptico Olympus. Outra parte do sangue foi transferida para um tubo contendo gel separador e centrifugado a 3.500 RPM por 10 min para obtenção de soro e avaliação dos seguintes parâmetros: albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), proteínas totais, ureia, creatinina, colesterol total e triglicerídeos usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) em analisador automático COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics).

3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As análises histológicas do fígado, rim e baço dos camundongos foram realizadas por microscopia óptica. Secções dos órgãos foram fixadas em formalina tamponada (10%, v/v), desidratadas através em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente, cortes histológicos (5 µm) foram obtidos,

corados com hematoxilina-eosina e montados usando lâminulas com resina. As amostras foram observadas usando um microscópio óptico.

3.6 ENSAIO COMETA

Uma alíquota do sangue coletado através da veia caudal (60 μ L) foi utilizada para realizar a versão alcalina do ensaio do cometa, segundo Singh et al. (1988). Em cada ensaio, 20 μ L de sangue foram misturados com 110 μ L de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C, colocados em lâminas totalmente solidificadas cobertas com uma camada de agarose padrão e revestidas com lamínula. Em seguida, as lâminas foram mantidas a 4 °C por 30 min, imersas durante 1 h a 4 °C em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM com ajuste do pH para 10,0 utilizando NaOH) e em seguida transferidas para cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 13). A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C, por 20 min, corrente de 32V e 300 mA. Após a corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7.5) por 15 min, secas e fixadas com etanol absoluto durante 5 min. Para análise, as lâminas foram coradas com iodeto de propídeo (50 μ L, 20 μ g/mL) e para cada tratamento foram analisados 100 nucleoides em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2) com objetiva de 40X utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Os nucleoides foram classificados de acordo com o dano observado com o grau de dano visualizado em classe 0 (sem cauda e sem danos), classe 1 (com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça), classe 2 (com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça), classe 3 (com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça) e classe 4 (ausência de cabeça) (COSTA; TEIXEIRA, 2014). O índice de danos foi calculado multiplicando o número de nucleoides observados em cada classe de dano pelo valor da classe. A frequência de danos (%) foi calculada com base no número de células com cauda em relação às células sem danos a cada tratamento. Três experimentos independentes foram realizados.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados pela média $\pm$ média do erro padrão (SEM). A normalidade dos dados foi testada previamente pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida

pelo pós-teste de Tukey utilizando o Software Prism GraphPad 7.0. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Folhas de *M. oleifera* apresentam diversas propriedades medicinais e nutricionais e a farinha e o chá são as principais formas de consumo dessa planta. Diante disso, o potencial de preparações das folhas em reduzir os danos induzidos pelo metotrexado (MTX), fármaco utilizado para o tratamento de câncer, foi avaliado em camundongos albinos Swiss fêmeas. Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos dos grupos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

A avaliação de parâmetros hematológicos é essencial, pois pode ser traduzida para humanos, fornecendo informações sobre o sistema hematopoiético e as respostas imunológicas após administração do produto testado (IGWEBUIKE et al., 2007). Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo, pois utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou injúria tecidual (SATAKE et al., 2009). O tratamento exclusivamente com MTX diminuiu os parâmetros da série vermelha (eritrócitos, hematócritos, hemoglobina, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular) e leucocitária em relação ao controle negativo. Os resultados obtidos para MTX são esperados, uma vez que os quimioterápicos exercem toxicidade sobre a formação do tecido hematopoiético. Sua consequência imediata é a incapacidade da medula óssea de repor os elementos figurados do sangue circulante, aparecendo assim a leucopenia e anemia (ÁVILA et al., 2013). Os tratamentos exclusivamente com as preparações das folhas de *M. oleifera* durante três dias não apresentaram diferença em relação ao controle negativo. Os dados estão em consonância aos obtidos no estudo realizado por Barros et al. (2022), no qual a infusão (1.000 mg/kg) e a farinha (250 mg/kg) não apresentaram toxicidade aguda ou em doses repetidas em 28 dias de aplicação oral.

O tratamento prévio com as preparações de folhas de *M. oleifera* demonstrou potencial em reduzir os efeitos colaterais causados pelo MTX para os seguintes parâmetros: eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM e leucócitos. A infusão mostrou-se mais eficaz que a farinha, possibilitando a normalização significativamente semelhante ao controle negativo dos eritrócitos ($5,06 \pm 0,54$), hematócrito ($34,98 \pm 3,21$), hemoglobina ($13,90 \pm 0,42$), VCM ($43,87 \pm 3,65$), HCM ($16,25 \pm 0,36$) e CHCM ($33,58 \pm 3,64$). Além disso, é possível observar na série leucocitária que tanto a

infusão (1.000 mg/kg) quanto a farinha (250 mg/kg) melhoraram significativamente o resultado em comparação ao controle positivo, porém essa melhora não foi completa pois há diferença também em relação ao controle negativo.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, observou-se que a infusão ($75,29 \pm 5,69$ e $99,29 \pm 5,24$) foi mais eficiente em reduzir os níveis de ALT e AST, respectivamente, em comparação a farinha ($89,75 \pm 5,28$ e $108,65 \pm 7,10$) e aos controles positivo ($98,85 \pm 7,19$ e $127,37 \pm 10,25$) e negativo ($62,18 \pm 5,12$ e $90,37 \pm 6,54$). As aminotransferases (ex: AST e ALT) são enzimas essenciais envolvidas no metabolismo central de todos os organismos, assim, as alterações nos níveis desses marcadores são importantes no diagnóstico de lesões hepáticas e cardíacas provocadas por infarto do miocárdio, drogas tóxicas ou infecções (LEHNINGER, 2006). A recuperação dos níveis sanguíneos das enzimas hepáticas indicam que as folhas de *M. oleifera* apresentam efeito hepatoprotetor. Atividade hepatoprotetora contra danos induzidos por tetracloreto de carbono em ratos já foi relatada para as folhas de *Moringa* no estudo de Hamza (2010) e essa atividade foi atribuída à alta concentração de compostos antioxidantes nas preparações testadas. Ademais, não foram observadas diferenças significativas dentre os grupos tratados em relação aos demais parâmetros bioquímicos mensurados. É importante destacar que a ureia e creatinina são indicadores de função renal (CHAN-YEUNG et al., 1981). A albumina é a principal proteína produzida pelo fígado no corpo humano, e níveis elevados desta proteína são considerados também um indicativo de distúrbios no fígado, além de obstrução dos canais biliares (PATRA et al. 2009).

Os efeitos observados na bioquímica e hematologia podem ser percebidos na alteração da massa relativa dos órgãos. Nesse sentido, foram realizadas pesagens dos órgãos analisados e os dados estão representados na Tabela 3. Observou-se mudança para os grupos MTX e farinha/MTX, enquanto que os demais grupos não apresentaram diferença em relação ao controle negativo. Os dados confirmam o que foi observado anteriormente, pois o tratamento com a infusão seguido de MTX não apresentou variação de peso, mas o mesmo não foi visto para o grupo tratado primeiramente com a farinha.

Tabela 1: Parâmetros hematológicos de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) ou infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *M. oleifera* isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.

Parâmetro	CN	Infusão	Farinha	CP	Infusão/MTX	Farinha/MTX
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5,32 $\pm$ 0,52 [#]	5,44 $\pm$ 0,41 [#]	5,17 $\pm$ 0,62 [#]	4,02 $\pm$ 0,59*	5,06 $\pm$ 0,54 [#]	5,14 $\pm$ 0,60 [#]
Hematócrito (%)	37,89 $\pm$ 3,06 [#]	35,53 $\pm$ 3,56 [#]	35,68 $\pm$ 3,48 [#]	30,44 $\pm$ 3,28*	34,98 $\pm$ 3,21 [#]	33,73 $\pm$ 3,05
Hemoglobina (g/dL)	14,27 $\pm$ 0,28 [#]	14,09 $\pm$ 0,40 [#]	14,05 $\pm$ 0,35 [#]	11,25 $\pm$ 0,30*	13,90 $\pm$ 0,42 [#]	12,59 $\pm$ 0,33 ^{*#}
VCM (fL)	47,25 $\pm$ 4,48 [#]	46,30 $\pm$ 4,21 [#]	45,14 $\pm$ 3,18 [#]	38,12 $\pm$ 4,15*	43,87 $\pm$ 3,65 [#]	41,07 $\pm$ 4,01*
HCM (pg)	16,59 $\pm$ 0,31 [#]	16,74 $\pm$ 0,38 [#]	16,16 $\pm$ 0,35 [#]	13,22 $\pm$ 0,41*	16,25 $\pm$ 0,36 [#]	14,99 $\pm$ 0,36 ^{*#}
CHCM (%)	37,39 $\pm$ 3,47 [#]	34,17 $\pm$ 3,22 [#]	36,29 $\pm$ 3,10 [#]	31,33 $\pm$ 3,25*	33,58 $\pm$ 3,64*	32,73 $\pm$ 3,17*
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,19 $\pm$ 0,73 [#]	7,59 $\pm$ 0,56 [#]	7,23 $\pm$ 0,65 [#]	4,16 $\pm$ 0,49*	6,06 $\pm$ 0,68 ^{*#}	6,49 $\pm$ 0,58 ^{*#}
Segmentados (%)	62,73 $\pm$ 6,09	60,47 $\pm$ 5,15	62,79 $\pm$ 5,56	60,49 $\pm$ 5,34	62,75 $\pm$ 5,64	62,20 $\pm$ 5,43
Linfócitos (%)	30,75 $\pm$ 3,17	33,10 $\pm$ 3,24	32,54 $\pm$ 3,32	33,17 $\pm$ 3,46	32,40 $\pm$ 3,28	32,41 $\pm$ 3,04
Monócitos (%)	3,40 $\pm$ 0,28	3,32 $\pm$ 0,36	3,62 $\pm$ 0,34	3,50 $\pm$ 0,51	3,37 $\pm$ 0,49	3,26 $\pm$ 0,42
Basófilos (%)	0,26 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,04
Eosinófilos (%)	3,52 $\pm$ 0,29	3,38 $\pm$ 0,33	3,23 $\pm$ 0,26	3,28 $\pm$ 0,27	3,24 $\pm$ 0,32	3,19 $\pm$ 0,37

VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média. Valores representados pela média $\pm$ SEM (n=5/grupo). CN: Controle negativo. CP: Controle positivo. Médias comparadas em relação ao CN (*) e CP (#).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) ou infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *M. oleifera* isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.

Parâmetro	CN	Infusão	Farinha	CP	Infusão/MTX	Farinha/MTX
Albumina (g/dL)	29,02 $\pm$ 2,43	30,86 $\pm$ 3,29	28,87 $\pm$ 2,96	28,93 $\pm$ 3,09	31,04 $\pm$ 3,68	30,06 $\pm$ 3,54
ALT (U/L)	62,18 $\pm$ 5,12	65,74 $\pm$ 4,73	64,38 $\pm$ 5,05	98,85 $\pm$ 7,19*	75,29 $\pm$ 5,69 ^{*#}	89,75 $\pm$ 5,28*
AST (U/L)	90,37 $\pm$ 6,54	93,49 $\pm$ 6,12	92,56 $\pm$ 7,19	127,37 $\pm$ 10,25*	99,29 $\pm$ 5,24 ^{*#}	108,65 $\pm$ 7,10 ^{*#}
Proteína total (g/dL)	61,59 $\pm$ 5,37	63,02 $\pm$ 6,14	60,24 $\pm$ 5,20	68,36 $\pm$ 6,58	64,39 $\pm$ 5,03	62,38 $\pm$ 5,21
Creatinina (mg/dL)	3,14 $\pm$ 0,36	3,35 $\pm$ 0,38	3,21 $\pm$ 0,37	3,79 $\pm$ 0,35	3,22 $\pm$ 0,26	3,19 $\pm$ 0,34
Ureia	0,28 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,05

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase. Valores representados pela média $\pm$ SEM (n=5/grupo), CN: Controle negativo, CP: Controle positivo, Médias comparadas em relação ao CN (*) e CP (#).

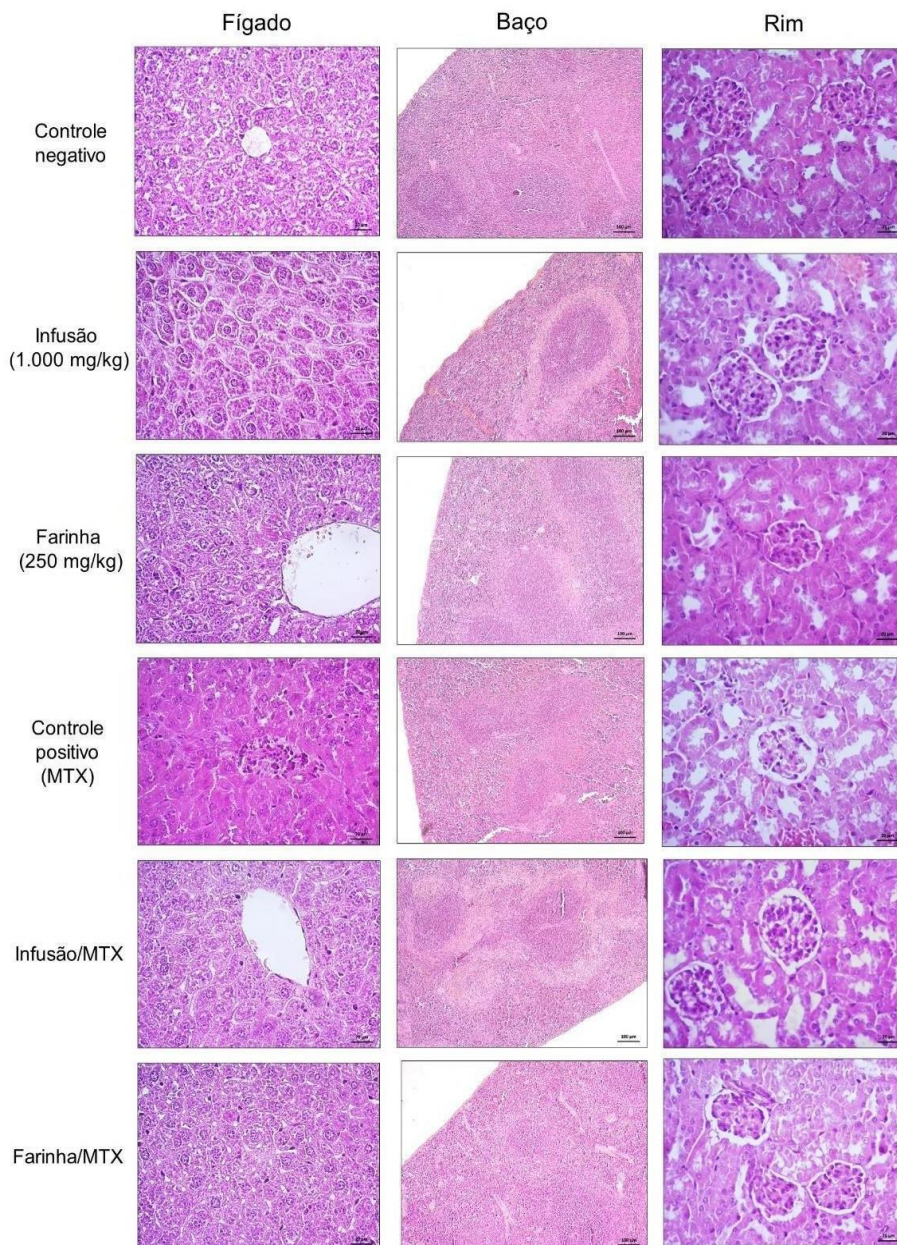
Tabela 3: Peso relativo dos órgãos (mg/g) de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) e infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *Moringa oleifera* (250 mg/kg) isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.

Tratamentos	Órgãos (mg/g)		
	Fígado	Baço	Rins
CN	50,88 ± 1,79 [#]	5,39 ± 0,09	12,21 ± 0,12
Infusão	48,2 ± 1,01 [#]	6,0 ± 0,33	12,97 ± 0,3
Farinha	50,57 ± 1,14 [#]	6,3 ± 0,41	12,77 ± 0,4
CP	42,7 ± 1,11 [*]	5,82 ± 0,55	12,54 ± 0,62
Infusão/MTX	48,73 ± 1,1 [#]	6,19 ± 0,52	13,1 ± 0,37
Farinha/MTX	43,40 ± 0,78 [*]	3,2 ± 0,15 ^{*#}	9,70 ± 0,31 ^{*#}

Valores representados pela média ± SEM (n=5/grupo), CN: Controle negativo, CP: Controle positivo, Médias comparadas em relação ao CN (*) e CP (#).

De acordo com Amna et al. (2013) o peso relativo dos órgãos é uma ferramenta útil em estudos de toxicidade devido à sua sensibilidade para prever o efeito da toxicidade e se correlacionarem bem com as alterações histopatológicas. Além disso, a realização da análise histopatológica serve como evidência de suporte para análises hematológicas e bioquímicas (TRAESSEL et al., 2016). As fotomicrografias representativas do fígado, baço e rim dos camundongos tratados com a farinha e a infusão das folhas de *M. oleifera* estão representados na Figura 7. Alterações histopatológicas não foram observadas para o controle negativo e os animais tratados com a preparação isoladamente e as alterações mais graves foram observadas para os fígados e rins dos animais tratados com MTX. Em revisão sistemática, Wang, Zhou e Liu (2018) reconheceram uma série de reações tóxicas graves relatadas para pacientes que fazem uso de MTX, incluindo hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. O grupo tratado previamente com a infusão, apresentou discretas alterações no fígado caracterizadas pela variação do volume nuclear, cromatina grosseira e nucléolos. Os animais tratados com a farinha apresentaram também as mudanças discretas observadas para o grupo Infusão/MTX, no entanto foi observado esteatose hepática de grau leve, efeito não observado para o grupo tratado apenas com MTX. Barros et al. (2022) observaram que a farinha das folhas (1.000 mg/kg) quando administrada oralmente em camundongos foi capaz de induzir esteatose hepática, apesar disso os autores não observaram esse efeito para o grupo tratado com a infusão. Desta forma, a fervura empregada para obter a infusão parece desempenhar um papel importante na desativação de antinutrientes presentes nas folhas de *M. oleifera*, conforme já relatado na literatura científica (SALLAU et al., 2012).

Figura 7. Fotomicrografias representativas do fígado, baço e rim de camundongos albinos Swiss fêmeas tratadas durante 3 dias com a farinha (250 mg/kg) e infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *M. oleifera* isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.

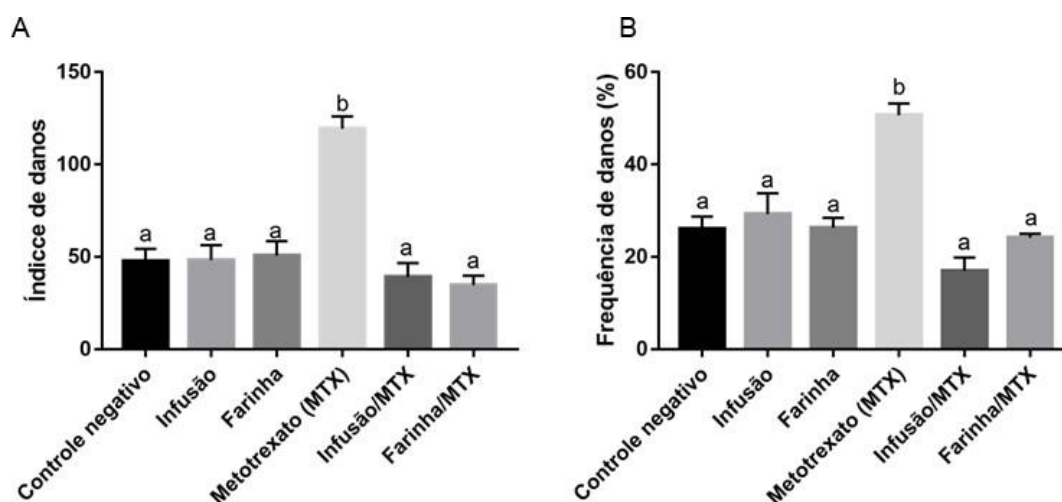


Legendas: **CN, Infusão e Farinha:** Fígado - Estrutura tissular dentro dos padrões típicos de normalidade e hepatócitos com espaços citoplasmáticos indicativos de reserva de glicogênio e ausência de infiltrados leucocitários. Baço: Estruturalmente preservado e sem modificações histomorfológicas. Rins: Compartimento glomerular, tubular, vascular e intersticial preservados. **CP (MTX):** Fígado - Moderadas alterações reativas caracterizadas pela variação do volume nuclear, cromatina grosseira e nucléolos e presença de infiltrados leucocitários. Baço - Estruturalmente preservado e sem modificações histomorfológicas. Rins: Estrutura nefrótica com variação do espaço de Bowman. e escassos pontos de reatividade do epitélio tubular. **Infusão/MTX:** Fígado - Discretas alterações reativas caracterizadas pela variação do volume nuclear, cromatina grosseira e nucléolos e ausência de infiltrado leucocitário. Baço - Estruturalmente preservado e sem modificações histomorfológicas. Rins - Estrutura nefrótica com variação do espaço de Bowman. Escassos pontos de reatividade do epitélio tubular. **Farinha/MTX:** Fígado: Discretas alterações reativas caracterizadas pela variação do volume nuclear, cromatina grosseira e nucléolos e esteatose hepática de grau leve. Baço - Estruturalmente preservado e sem modificações histomorfológicas. Rins: Estrutura nefrótica com variação do espaço de Bowman. Escassos pontos de reatividade do epitélio tubular.

Além disso, o efeito protetor observado para a infusão pode estar relacionado ao potencial antioxidante das folhas de *M. oleifera*, uma vez o MTX induz a formação de espécies reativas de oxigênio (SALEM et al., 2017; WIDEMANN; ADAMSON, 2006).

O potencial protetor das folhas de *M. oleifera* contra danos genotóxicos induzidos por MTX também foi avaliado utilizando o ensaio cometa. O ensaio cometa consiste em um método sensível, barato e estatisticamente robusto para detectar quebras de fita simples e dupla no DNA (COSTA; TEIXEIRA, 2014). Os dados ~~de~~ obtidos estão representados na Figura 6. O tratamento com a infusão (ID = $48,29 \pm 8,02$; FD = $17,0 \pm 2,90$) e farinha (ID = $50,83 \pm 7,67$; FD = $24,2 \pm 0,8$) foi capaz de diminuir os danos promovidos pelo MTX (ID = $119,4$; FD = $50,67 \pm 2,57$) a valores estatisticamente semelhantes ao controle negativo (ID = $47,83 \pm 6,51$; FD = $26,13 \pm 2,58$). Tanto a infusão (ID = $39,17 \pm 7,46$; FD = $29,29 \pm 4,50$) quanto a farinha (ID = $34,83 \pm 4,96$; FD = $26,33 \pm 2,16$) administradas isoladamente não foram genotóxicas.

Figura 8. Genotoxicidade da farinha (250 mg/kg) e infusão (1.000 mg/kg) das folhas de *Moringa oleifera* isoladamente ou posteriormente com metotrexato (MTX) e grupos controles.



Índice de danos (A) e Frequência de danos (B) aferidos através do ensaio

5 CONCLUSÃO

A farinha e a infusão obtidas a partir das folhas de *M. oleifera* apresentaram efeito antigenotóxico e quimioprotetor contra danos hematológicos, bioquímicos, teciduais e genotóxicos induzidos por metotrexato (MTX), fármaco amplamente utilizado para o tratamento de câncer. O presente trabalho estimula a condução de mais estudos com o objetivo de elucidar os mecanismos relacionados às atividade observadas, bem como os efeitos advindos da administração conjunta das preparações testadas com MTX em modelo experimental de câncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFKHAMI-ARDAKANI, M.; HASANZADEH, S.; SHAHROOZ, R.; DELIREZH, N.; MALEKINEJAD, H. Antioxidant effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. In: **Veterinary Research Forum**. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2018. p. 35.

AGUSTONI, D. Avaliação da capacitação de quimioprevenção de *Eugenia jambolana* em linhagem de hepatocarcinoma celular (HepG2 e Hepa 1c1c7). 2012. 128 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

AHMADI, A.; SHADBOORESTAN, A. Oxidative stress and cancer; the role of hesperidin, a citrus natural bioflavonoid, as a cancer chemoprotective agent. **Nutrition and cancer**, v. 68, n. 1, p. 29-39, 2016.

AHMED, S. A. A.; ADAM, S. Nutritional evaluation of *Moringa Oleifera* leaves and extract. **Ahfad Journal**, v. 24, n. 2, p. 113-123, 2007.

ALMATRAFI, M. M.; VERGARA-JIMENEZ, M.; MURILLO, A. G.; NORRIS, G. H.; BLESSO, C. N.; FERNANDEZ, M. L. Moringa leaves prevent hepatic lipid accumulation and inflammation in guinea pigs by reducing the expression of genes involved in lipid metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1330, 2017.

AMNA, O. F.; NOORAAIN, H.; NORIHAM, A.; AZIZAH, A. H.; HUSNA, R. N. Acute and oral subacute toxicity study of ethanolic extract of *Cosmos caudatus* leaf in Sprague Dawley rats. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 301, 2013.

ANDERSON, R. D.; BERGER, N. A. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutation research**, v. 309, n. 1, p. 109-142, 1994.

ANWAR, F.; ASHRAF, M.; BHANGER, M. I. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 1, p. 45-51, 2005.

ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6558-6563, 2003.

ÁVILA, FVF; SOARES, M B O; SILVA, S R. Perfil hematológico e bioquímico sérico de pacientes submetidas à quimioterapia antineoplásica: subtítulo do artigo. **Revista de Enfermagem e Atenção a Saúde**: REAS, UBERABA, v. 2, n. 2, p.32-45, set. 2013.

AYERZA, R. Seed and oil yields of *Moringa oleifera* variety Periyakalum-1 introduced for oil production in four ecosystems of South America. **Industrial Crops & Products**, v. 36, n. 1, p. 70-73, 2012.

BARBOSA, A. D. A.; MÜLLER, E. S.; MORAES, G. H. K. D.; UMIGI, R. T.; BARRETO, S. L. D. T.; FERREIRA, R. M. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 308-312, 2010.

BARROS, M. C.; SILVA, A. G. B.; SANTOS, T. G. S.; CHAGAS, C. A.; MACHADO, J. C. B.; FERREIRA, M. R. A.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of acute toxicity, 28-day repeated dose toxicity, and genotoxicity of *Moringa oleifera* leaves infusion and powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 296, p. 115504, 2022.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica Médica. São Paulo: Manole, 2000. 566p.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.

BERKOVICH, L.; EARON, G.; RON, I.; RIMMON, A.; VEXLER, A.; LEV-ARI, S. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2013.

BEZERRA, A. M. E., MOMENTÉ, V. G., & MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 295-299, 2004.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CHAN-YEUNG, M.; FERREIRA, P.; FROHLICH, J.; SCHULZER, M.; TAN, F. The effects of age, smoking, and alcohol on routine laboratory tests. **American journal of clinical pathology**, v. 75, n. 3, p. 320-326, 1981.

CHATTERED, A.; CHANDRAPRAKASH, I. W. The Treatise on Indian Medicinalplants, vol. I. **National Inst. of Science Communication and InformationResources, New Delhi, India**, v. 71, 1992.

CHIBA, Y.; MIZOGUCHI, I.; HASEGAWA, H.; OHASHI, M.; ORII, N.; NAGAI, T.; YOSHIMOTO, T. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, n. 8, p. 1363-1376, 2018.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; KLAI-UPSORN, S. P. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 439-446, 2008.

COSTA, C.; TEIXEIRA, J. P. The Comet Assay In Vivo in Humans. In: **Genotoxicity and DNA Repair**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 219-239.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J. F.; FÉRARD, J. F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 167-171, 1999.

COZ-BOLAÑOS, X.; CAMPOS-VEGA, R.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS-GÓMEZ, M.; LOARCA-PIÑA, G. F.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H. Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator in vitro. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 95-101, 2018.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. D.; BOBROWSKI, V. L. (2012). Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia Ciência Agropecuária**, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012.

DARYL, W. F.; PEGGY, L. O.; KIM, L. N. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

DE MIRANDA, D. E.; MIRANDA, M. A. D. S. Q.; RICARDO, P.; JUNIOR, S. E.; ALMEIDA, A. M. R. Prevalência de anemia nos pacientes com doença renal crônica em tratamento de hemodiálise. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 1, n. 2, p. 282-296, 2018.

DOWDELL, J.; ERWIN, M.; CHOMA, T.; VACCARO, A.; IATRIDIS, J.; CHO, S. K. Intervertebral disk degeneration and repair. **Neurosurgery**, v. 80, n. 3S, p. S46-S54, 2017.

EL SHANAWANY, E. E.; FOUAD, E. A.; KESHTA, H. G.; HASSAN, S. E.; HEGAZI, A. G.; ABDEL-RAHMAN, E. H. Immunomodulatory effects of *Moringa oleifera* leaves aqueous extract in sheep naturally co-infected with *Fasciola gigantica* and *Clostridium novyi*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 43, n. 4, p. 583-591, 2019.

ELGAMILY, H.; MOUSSA, A.; ELBORAEY, A.; HODA, E. S.; AL-MOGHAZY, M.; ABDALLA, A. Microbiological assessment of *Moringa oleifera* extracts and its incorporation in novel dental remedies against some oral pathogens. **Open access Macedonian journal of medical sciences**, v. 4, n. 4, p. 585-590, 2016.

FAHEY, J. W.; OLSON, M. E.; STEPHENSON, K. K.; WADE, K. L.; CHODUR, G. M.; ODEE, D.; HUBBARD, W. C. The diversity of chemoprotective glucosinolates in *Moringaceae* (*Moringa* spp.). **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, fev. 1995.

- FARD, M. T.; ARULSELVAN, P.; KARTHIVASHAN, G.; ADAM, S. K.; FAKURAZI, S. Bioactive extract from *Moringa oleifera* inhibits the pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide stimulated macrophages. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. Suppl 4, p. S556, 2015.
- FENG, M.; VALDES, G.; DIXIT, N.; SOLBERG, T. D. Machine learning in radiation oncology: opportunities, requirements, and needs. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 110, 2018.
- FUGLIE L.J. The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics. Revised edition. **Church World Service**, Dakar. p. 68, 1999.
- GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; BERNHARD, T.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1243, n. 3, p. 477-481, 1995.
- GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica animal. **Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 360, p. 65-71, 2003.
- GUPTA, S.; JAIN, R.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. **Journal of Herbal Medicine**, v. 11, p. 1-11, 2018.
- HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 345-355, 2010.
- HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991.
- HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.
- HERMANN, S.; ZURGIL, N.; DEUTSCH, M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. **Inflammation Research**, v. 54, n. 7, p. 273-280, 2005.
- HEUSER, V. D.; DE ANDRADE, V. M.; PERES, A.; DE BRAGA, L. M. G. M.; CHIES, J. A. B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell biology international**, v. 32, n. 10, p. 1223-1229, 2008.
- HSU, R.; MIDCAP, S.; ARBAINSYAH, D. W. L. *Moringa oleifera* medicinal and Economic uses. **International course on Economic botany, National Herbarium, Leiden, The Netherlands**, 2006.
- IGWEBUIKE, U. M. et al. Effects of Nigerian Qua Iboe Brent crude oil on rat spleen and haematological parameters. **Veterinarski arhiv**, v. 77, n. 3, p. 247, 2007.

IGWEBUIKE, U. M.; OBIDIKE, R. I.; SHOYINKA, S. V. O.; NWANKWO, C. U.; OKWECHIME, I. O.; AKA, L. O. Effects of Nigerian Qua Iboe Brent crude oil on rat spleen and haematological parameters. **Veterinarski arhiv**, v. 77, n. 3, p. 247, 2007.

IGWEBUIKE, U. M.; OBIDIKE, R. I.; SHOYINKA, S. V. O.; NWANKWO, C. U.; OKWECHIME, I. O.; AKA, L. O. Effects of Nigerian Qua Iboe Brent crude oil on rat spleen and haematological parameters. **Veterinarski arhiv**, v. 77, n. 3, p. 247, 2007.

Jalali, S. A.; Hassanzadeh, S.; Malekinejad, H. Chemoprotective effect of *Crataegus monogyna* aqueous extract against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. In: **Veterinary Research Forum**. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, 2011. p. 266-273.

KATZUNG, B. G. Farmacologia : básica e clínica. 8 edição. **Lange, Rio De Janeiro, 2006.**

KELLOFF, Gary J. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. **Advances in cancer research**, v. 78, p. 199-334, 1999.

KHAN, W.; PARVEEN, R.; CHESTER, K.; PARVEEN, S.; AHMAD, S. Hypoglycemic potential of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaf and in vivo GC-MS metabolomics. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 577, 2017.

KLAASSEN, Curtis D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. AMGH Editora, 2009.

KOU, X.; Li, B.; OLAYANJU, J. B.; DRAKE, J. M.; CHEN, N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 343, 2018.

KUMAR, K. B. H.; KUTTAN, R. Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 494-500, 2005.

KURAŚ, M.; NOWAKOWSKA, J.; ŚLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 211-221, 2006.

KWAN, Y. P. et al. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, p. 1–14, 8 jul. 2015.

KWAN, Y. P.; SAITO, T.; IBRAHIM, D.; AL-HASSAN, F. M. S.; EIN OON, C.; CHEN, Y.; SASIDHARAN, S. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 7, p. 1223-1236, 2016.

LAHARIE, D.; TERREBONNE, E.; VERGNIOL, J.;CHANTELOUP, E.; CHABRUN,

E.; COUZIGOU, P.; DE LEDINGHEN, V. Foie et méthotrexate. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 32, n. 2, p. 134-142, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica, 4. edição. **Sarvier, São Paulo**, 2006.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in Allium. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LI, Xiao-Jun et al. Gynura procumbens reverses acute and chronic ethanol-induced liver steatosis through MAPK/SREBP-1c-dependent and-independent pathways. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 38, p. 8460-8471, 2015.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MANACH, C. et al. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 10, p. 1303–1315, out. 2009.

MANACH, C.; HUBERT, J.; LLORACH, R.; SCALBERT, A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. 10, p. 1303-1315, 2009.

MANDAL, B.; BHATTACHARJEE, I.; KUNDU, J. K.; CHANDRA, G. Efficiency of Extracts of two Medicinal Plants of India Against Some Pathogenic Bacteria. 2014.

MARQUES, R. C. P., DE MEDEIROS, S. R. B., DA SILVA DIAS, C., BARBOSA-FILHO, J. M., & AGNEZ-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of Ocotea duckei by the Ames test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.536, n. 1-2, p. 117-120, 2003.

MARTINS, E. R., Castro, D. M., Castellani, D. C., & Dias, J. E. **Plantas medicinais viçosa**: editora UFV. 2000.

MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.

MAZAIRA, S. Efectos adversos hematológicos de los psicofármacos. **ERTE**, p. 378.

MCILWAIN, David R.; BERGER, Thorsten; MAK, Tak W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.

MENDES, F.T. Fígado e drogas. In: Dani, R, Castro, LP. Gastroenterologia clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 80, p.1035-1042, 1988.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 393, n. 1-2, p. 141-149, 1997.

MILLER, T. R.; POTTER, L. C. Subband prescreening of foliage-penetrating SAR imagery. In: **Algorithms for Synthetic Aperture Radar Imagery V**. SPIE, 1998. p. 279-288.

MOREIRA, M. C.; AZEVEDO, Í. M.; OLIVEIRA, C. N.; MEDEIROS, A. D. C. Influência do cólon na regeneração do fígado de ratos submetidos à hepatectomia e colectomia. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, p. 476-481, 2017.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

NAGARATHNA, P. K. M.; REENA, K.; REDDY, S.; WESLEY, J. Review on immunomodulation and immunomodulatory activity of some herbal plants. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 22, n. 1, p. 223-230, 2013.

NEVES, C.; JORGE, R.; BARCEIOS, A. A TEIA DE TDXICIDADE DO METOTREXATO. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v. 34, n. 1, 2009.

NUNES, G. G.; BONATTO, A. C.; CARLA, G.; BARISON, A.; RIBEIRO, R. R., BACK, D. F.; SOUZA, E. M. Synthesis, characterization and chemoprotective activity of polyoxovanadates against DNA alkylation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 108, p. 36-46, 2012.

Olayinka, E. T., Ore, A., Adeyemo, O. A., & Ola, O. S. Ameliorative effect of gallic acid on methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rat. **Journal of xenobiotics**, v. 6, n. 1, p. 6092, 2016.

Oliveira, J. M. G., Pereira, L. J. C., Moura, E. R., Sousa, M. R. S. C., SALES, P., Silva, S. M. M. S., ... & Costa, A. P. R. Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* sobre o ciclo estral de ratas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, p. 539-546, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 423: acute oral toxicity-acute toxic class method**. OECD Publishing, 2002.

PARROTTA, J. A. **Healing plants of peninsular India**. CABI publishing, 2001.

PATERNIANI, J. E.; MANTOVANI, M. C.; SANT'ANNA, M. R. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para tratamento de águas superficiais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 765-771, 2009.

PATRA, C. R.; MONEIM, S. S. A.; WANG, E.; DUTTA, S.; PATRA, S.; ESHED, M.; MUKHOPADHYAY, D. In vivo toxicity studies of europium hydroxide nanorods in mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 240, n. 1, p. 88-98, 2009.

POTESTÀ, M.; MINUTOLO, A.; GISMONDI, A.; CANUTI, L.; KENZO, M.; ROGLIA, V.; MONTESANO, C. Efeitos citotóxicos e apoptóticos de diferentes extratos de *Moringa oleifera* Lam em células linfóides e monocitóides. **Medicina Experimental e Terapêutica**, v. 18, não. 1 p. 5-17, 2019.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18-25, 2016.

PRETTI, E.; CAVALCANTE, D.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 2007.

PRICE, M. L. **Description Of Echo'S Seedbank Of Underexploited Food Plants**. 1985.

PRICE, M. L. The moringa tree. **ECHO technical note**, v. 17391, p. 1-19, 2007.

PURVES, D.; HARVEY, C.; TWEATS, D.; LUMLEY, C. E. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, v. 10, n. 4, p. 297-312, 1995.

ROBERTS, M. J. **Edible & medicinal flowers**. New Africa Books, 2000.

ROBERTS, T. M.; KOBOR, M. S.; BASTIN-SHANOWER, S. A.; HORTE, S. A., GIN, J. W.; BROWN, G. W. Slx4 regulates DNA damage checkpoint-dependent phosphorylation of the BRCT domain protein Rtt107/Esc4. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 1, p. 539-548, 2006.

ROENIGK H.H, MAIBACH H.I, WEINSTEIN G.P. Terapia com metotrexato para psoríase: revisões de diretrizes. *Arco Dermatol*. 1973; 108 (1): 35.

SAINI, M. R.; GOYAL, P. K.; CHAUDHARY, G. Anti-tumor activity of Aloe vera against DMBA/croton oil-induced skin papillomagenesis in Swiss albino mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 29, n. 2, 2010.

SALEM, N. I. S.; NOSHY, M. M.; SAID, A. A. Modulatory effect of curcumin against genotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin and methotrexate in male mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 370-376, 2017.

SANTOS, T. M.; PEREIRA, D. F.; SANTANA, C. R.; SILVA, G. F. Estudo do tratamento físico químico da água produzida utilizando *Moringa oleifera* Lam em comparação ao sulfato de alumínio. **Exacta**, v. 9, n. 3, p. 317-321, 2011.

SANTOS, T. R. T.; VIEIRA, M. F.; BERGAMASCO, R. Uso do coagulante natural *moringa oleifera* lam no processo combinado de coagulação/floculação/adsorção para minimização da formação de trihalometanos. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, 2013.

Sarkar, M., Bhowmick, S., Hussain, J., Hasan, M., & Hossain, S. Hot Water Extract of *Moringa oleifera* Leaves Protects Erythrocytes from Hemolysis and Major Organs from Oxidative Stress in vitro. **Journal of Basic and Applied Research in Biomedicine**, v. 3, n. 3, p. 120-126, 2017.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. D.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Macapá**, p. 330-345, 2009.

Sathya, T. N., Aadarsh, P., Deepa, V., & Murthy, P. B. *Moringa oleifera* Lam. leaves prevent cyclophosphamide-induced micronucleus and DNA damage in mice. **International Journal of phytomedicine**, v. 2, n. 2, 2010.

Scherer, K., & Strohschoen, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 3, 2013.

SILVA, A. H. Estratégias para avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados. 2011.

SILVA, F. J. A., & de Matos, J. E. X.. Sobre dispersões de *moringa oleifera* para tratamento de água. **Revista Tecnologia**, v. 29, n. 2, 2008.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Genética Toxicologia. Porto Alegre, Alcançe, p. 422, 2003.

Singh, D., Arya, P. V., Aggarwal, V. P., & Gupta, R. S. Evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of *Moringa oleifera* Lam. leaves in carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Antioxidants**, v. 3, n. 3, p. 569-591, 2014.

Sivasankari, B., Anandharaj, M., & Gunasekaran, P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 408-423, 2014.

Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of applied genetics**, v. 55, n. 2, p. 273-285, 2014.

SOUSA, T.K.G. Estudo da toxicidade e potencial antitumoral do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila. 2015. 130 f. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Biotativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SOUZA, J.;KULKARNI,A.R. Comparative studies on nutritive values of tender foliage

of seedlings and mature plants of *Moringa oleifera* Lam. **Econ Taxon Bot**, v.17 p.479-485, 1993

Souza, V. C., & Lorenzi, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 2012.

Sulaiman, M. R., Zakaria, Z. A., Bujarimin, A. S., Somchit, M. N., Israf, D. A., & Moin, S. Evaluation of *Moringa oleifera* aqueous extract for antinociceptive and anti-inflammatory activities in animal models. **Pharmaceutical biology**, v. 46, n. 12, p. 838-845, 2008.

Surh, Y. J.. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.

Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prestera, T., & Zhang, Y. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. **Toxicology letters**, v. 82, p. 173-179, 1995.

Thurber, M. D., & Fahey, J. W. Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the “Diffusion of Innovations” theory. **Ecology of food and nutrition**, v. 48, n. 3, p. 212-225, 2009.

TICE, R. R.; STRAUSS, G. H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 13, p. 207-214, 1995.

Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999.

Torres-Pérez, S. A., Ramos-Godínez, M. D. P., & Ramón-Gallegos, E. Effect of methotrexate conjugated PAMAM dendrimers on the viability of breast cancer cells. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2019. p. 050014.

TRAESSEL, G. K., et al. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.97 p.224-231, 2016.

Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O.. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 10, p. 1089-1098, 2017.

Vasconcelos, T. H. C. D., Modesto-Filho, J., Diniz, M. D. F. F. M., Santos, H. B., Aguiar, F. B. D., & Moreira, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 583-591, 2007.

VEIGA, J.; Valdir, F.; Angelo C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

Vongsak, B., Sithisarn, P, Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W.. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

WANG, W., ZHOU, H., LIU, L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: a systematic review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 158, p. 502-516, 2018.

WANG, X.; YAN, H. Methotrexate-loaded porous polymeric adsorbents as oral sustained release formulations. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 598-602, 2017.

WARGOVICH, M. J., WOODS, C., HOLLIS, D. M., ZANDER, M. E. Herbals, cancer prevention and health. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 11, p. 3034S-3036S, 2001.

Welsh, M. J., Anderson, M. P., Rich, D. P., Berger, H. A., Denning, G. M., Ostedgaard, L. S., ... & Smith, A. E. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: a chloride channel with novel regulation. **Neuron**, v. 8, n. 5, p. 821-829, 1992.

WIDEMANN, B. C.; ADAMSON, Peter C. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. **The oncologist**, v. 11, n. 6, p. 694-703, 2006.

WINOCUR, E.; GAVISH, A.; VOIKOVITCH, M.; EMODI-PERLMAN, A.; ELI, I. Drugs and bruxism: a critical review. **Journal of orofacial pain**, v. 17, n. 2, 2003.

WU, Z., SHAH, A., PATEL, N., YUAN, X. Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 17, p. 5108-5112, 2010.

XAVIER, M. M. Monitoramento da Toxicidade do Metotrexato em Esquemas de Altas Doses no Tratamento de Osteossarcoma. Trabalho apresentado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia. Universidade do Estado da Bahia, Salvador, 2010.

YU, L., XU, W., SHEN, W., CAO, L., LIU, Y., LI, Z., DING, J. Poly (lactic acid-co-glycolic acid)–poly (ethylene glycol)–poly (lactic acid-co-glycolic acid) thermogel as a novel submucosal cushion for endoscopic submucosal dissection. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 3, p. 1251-1258, 2014.

ZHOU, S.; KOH, H. L.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E. J. D. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. **Life Science**, v. 74, p. 935-968, 2004.

ANEXO I



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

Recife, 23 de agosto de 2021

Ofício nº58/21

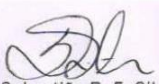
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Prof. Patrícia Maria Guedes Paiva
 Departamento de Bioquímica
 Centro de Biociências
 processo nº0031/2021

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da antigenotoxicidade e do potencial quimioprotetor de preparações das folhas de *Moringa oleífera* Lam. contra danos induzidos por metotrexato.**” registrado com o nº0031/2021 sob a responsabilidade da **Prof. Patrícia Maria Guedes Paiva** envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/07/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2021 a 01/08/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico
Nº de animais	45
Peso/Idade	25-30g/ 60 dias
Sexo	Femea (45)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)..
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos

Atenciosamente


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