



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NA REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA –
RENORBIO

LUCÍOLA ABILIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIROS ROLIM

**DIFERENÇA DE ALTERAÇÕES TECIDUAIS HEPÁTICAS EM COELHOS
TRATADOS COM EXTRATO ALCOÓLICO DE *MORINGA OLEIFERA* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO CONTROLE DA HIPERPLASIA
MIOINTIMAL PÓS-ANGIOPLASTIA DE ILÍACA**

**Maceió
2019**

Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim

Diferença de alterações teciduais hepáticas em coelhos tratados com extrato alcoólico de *Moringa oleifera* em diferentes concentrações no controle da hiperplasia miointimal pós-angioplastia de íliaca

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordestina de Biotecnologia (Renorbio) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta

Maceió
2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

R748d Rolim, Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros.

Diferença de alterações teciduais hepáticas em coelhos tratados com extrato alcoólico de *Moringa oleifera* em diferentes concentrações no controle da hiperplasia miointimal pós-angioplastia de ílfaca / Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim. – 2019.
95 f. : il. color.

Orientador: Guilherme Benjamin Brandão Pitta.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 56-67.

Anexos: f. 73-95.

1. Folhas de planta. 2. Fígado. 3. Histologia. 4. Hiperplasia miointimal. 5. Rim. I. Título.

CDU: 616.61-007.61

LUCÍOLA ABÍLIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIRSO ROLIM

Diferença de alterações hepáticas em coelhos tratados com extrato alcoólico de *Moringa oleifera* em diferentes concentrações no controle da hiperplasia miointimal pós-angioplastia de íliaca

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

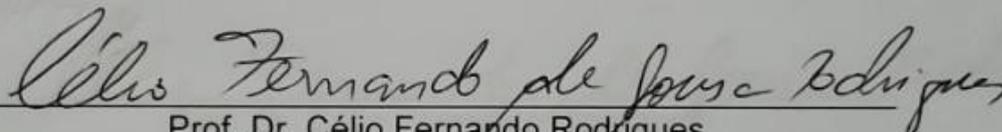
Aprovada em: 10/06/2019.

BANCA EXAMINADORA



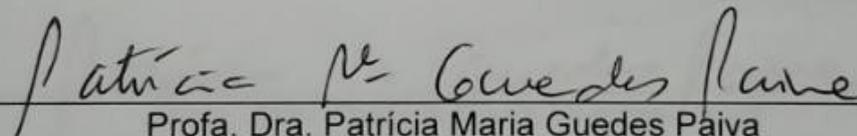
Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta

Orientador – Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL



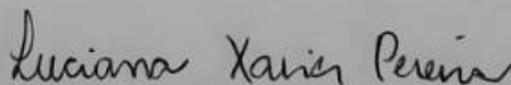
Prof. Dr. Célio Fernando Rodrigues

Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



Profa. Dra. Luciana Xavier Pereira

Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Pedro de Lemos Menezes

Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

Aos meus filhos, Matheus, Lucas e Júlia; ao meu esposo, Jânio; aos meus pais, Bosco e Lúcia; às minhas irmãs, Luanna e Layse Júlia, e aos meus sobrinhos Arthur, Lis e Felipe.

AGRADECIMENTOS

- **A Deus** que possibilitou que eu chegasse até aqui, dando força, saúde e perseverança para vencer os obstáculos e colocou “anjos” em meu caminho, como a minha família e amigos que colaboraram com a realização deste trabalho.
- **A meus filhos, Matheus, Lucas e Júlia**, que são os meus maiores tesouros e a minha maior fonte de motivação de crescer e ser uma pessoa cada vez melhor. Agradeço por todo carinho, compreensão e força que me passaram, mesmo sendo tão difícil termos que, às vezes, ficar distantes.
- **Ao meu esposo Jânio** que foi o grande incentivador desse projeto e que foi meu parceiro em todos os momentos, tanto de dificuldades como de vitórias. Percorremos juntos esse caminho árduo de entusiasmo e, algumas vezes, desilusões durante todo o período da pesquisa, sendo sempre meu porto seguro. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Você foi essencial na realização desse sonho. Agradeço, também, pela ajuda na realização das cirurgias e ultrassonografias nos coelhos.
- **Aos meus pais, Bosco e Lúcia**, que sempre foram os pilares da minha vida, ensinando com amor o valor da família, do amor, do caráter e responsabilidade. Pela ajuda no cuidado com os meus filhos, nunca medindo esforços para viabilizar meus sonhos, sendo minha fortaleza e amparo. Vocês são a força que impulsiona a minha vida. Todo o meu carinho e reconhecimento.
- **Às minhas irmãs, Luanna e Layse Júlia**, minhas melhores amigas, por me apoiarem em todos os momentos, transmitindo força e leveza durante toda essa jornada e dando carinho a mim e aos meus filhos durante o período que em estava ausente. Vocês são muito especiais. Agradeço de forma especial à minha irmã, **Profa. Dra. Luanna Abilio D. M. de Medeiros**, pela valorosa contribuição na revisão do trabalho sempre com sugestões enriquecedoras.
- **Aos meus sobrinhos, Arthur, Lis e Felipe**, por tornarem meus dias mais alegres, dando sempre carinho e sorrisos.
- **Ao meu cunhado João Bosco Júnior** pelo apoio, carinho e por ajudar sempre a resolver os problemas de informática a qualquer hora do dia e da noite.
- **À minha querida avó Fabíola**, que sempre foi muito presente em nossa vida, torcendo, dando carinho, amor e rezando por nós.

- Aos meus sogros, **Geralda e José**, pelo carinho, torcida e orações para que tudo desse certo no decorrer do trabalho e nas viagens que tivemos que enfrentar muitas vezes.
- À **tia Maria, Epaminondas Júnior, Camila, Ricardo, Fernanda e Leonardo**, por me receberem e cuidarem tão bem de mim, quando tive que cursar disciplinas em Fortaleza, estando longe de casa, mas acolhida sempre com muito carinho e amor.
- À **Luzimar Gonçalo de Lima**, pela ajuda e carinho no cuidado com os meus filhos e com nossa família, tornando possível minha dedicação a esse trabalho.
- Ao meu orientador, **Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta**, por todo apoio, conhecimento, amizade e entusiasmo na condução desse trabalho, também, por nunca me deixar desanimar, sendo sempre o suporte necessário nas horas mais difíceis. Sempre disposto a doar seu tempo em prol da ciência e do bem comum. Ao senhor toda a minha admiração e reconhecimento.
- Ao **Prof. Aldemar Araújo Castro** por todo apoio e conhecimento transmitido nas áreas de metodologia científica, informática e estatística.
- A **Prof. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva** pelo incentivo, amizade, encorajamento, sendo desde o meu mestrado meu espelho como professora, pesquisadora e ser humano. Agradeço, também, pela ajuda com os extratos iniciais e por ter disponibilizado seu laboratório para o preparo dos mesmos.
- À **Profa. Dra. Luciana Xavier Pereira** pela inestimável ajuda na interpretação dos resultados, leitura e interpretação das lâminas. Agradeço também pela paciência, dedicação, pelas longas conversas que sempre deram bons frutos, amizade e incentivo.
- Ao **Prof. Dr. Pedro de Lemos Menezes e ao Prof. Dr. Célio Fernando Rodrigues**, pela valiosa contribuição na banca de qualificação e defesa, com sugestões que muito ajudaram a enriquecer o trabalho. Agradeço, também, pela disponibilidade e gentileza em dedicar seu tempo a esse trabalho.
- À **Svetlana Barros e a Marcelo**, respectivamente veterinária e técnico do Centro de Cirurgia Experimental e Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas por terem ajudado nos cuidados com os animais utilizados na pesquisa.
- Ao **Sr. Raimundo Nonato da Silva Filho** pela dedicação e ajuda na extração das folhas de *Moringa oleifera*.
- À **Jéssica Souza** por ajudar no preparo dos blocos de parafina, confecção e fotografia das lâminas.

- **Ao Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva Lima** pela ajuda na interpretação dos resultados, sugestões, presteza e amizade, muito importantes para a concretização dessa pesquisa.
- **À Profa. Dra. Sabrina Oliveira** pelo apoio e conhecimento na escolha dos marcadores de imunohistoquímica, análise das lâminas e suporte científico nessa área. Agradeço, também, por acreditar em mim, estimulando e dando suporte em um momento em que tudo parecia dar errado.
- **Ao Prof. Dr. Fabrício Kleber de Lucena Carvalho**, médico veterinário, pela valiosa contribuição na análise histológica, pela disponibilidade, amizade, incentivo, bom humor e por ter me substituído quando necessário como professor nas aulas do curso de graduação em Medicina no qual coordena o eixo ao qual faço parte.
- **A Dr. Ricardo Houly**, médico patologista, pela valiosa contribuição na análise histológica, pela disponibilidade e presteza.
- **A Ana Amâncio** pela parceria no registro da patente, pelo incentivo, amizade e por estar sempre disponível para ajudar.
- **À Geneci e Magno**, do Cendovascular, que sempre ajudaram em todas as aulas das disciplinas do Prof. Guilherme Pitta para que tudo saísse da melhor forma possível, nos dando sempre suporte.
- **À Ana Paula**, secretária do RENORBIO, pela atenção e gentileza com que sempre resolveu todos os problemas burocráticos.
- **Às Faculdades Integradas de Patos**, pelo apoio, compreensão e incentivo, especialmente à coordenadora do curso de Medicina, **Paula Christianne Souto Maia** e a coordenadora pedagógica, **Vanessa Passos Brustein**.
- Aos meus alunos e ex-alunos, por me inspirarem a buscar mais conhecimento, aperfeiçoamento e pelo carinho e compreensão de ter, muitas vezes, que trocar horários de aulas para acomodar meus compromissos com o doutorado.
- A todos os colegas do Cendovascular que representam uma grande família e que torceram, apoiaram e incentivaram esse projeto.
- Aos colegas do RENORBIO pela parceria e apoio.

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força da sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johann Goethe

RESUMO

O fígado é um órgão crucial no metabolismo, podendo metabolizar muitas drogas, no entanto pode ser prejudicado pelas mesmas. A lesão hepática induzida por drogas representa uma das razões mais frequentemente citadas para a não aprovação de drogas, suspensão, abandono e ações regulatórias pós-comercialização. O extrato alcoólico das folhas de *Moringa oleifera* possui efeito terapêutico na diminuição da hiperplasia miointimal, no entanto, os efeitos adversos do seu uso ainda precisam ser avaliados. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi determinar a diferença de alterações teciduais hepáticas em coelhos tratados com extrato alcoólico de *Moringa oleifera* em diferentes concentrações no controle da hiperplasia miointimal pós-angioplastia de íliaca. Foi realizado um ensaio clínico randomizado em animais de experimentação com cinco semanas de seguimento. Os coelhos foram divididos em quatro grupos, sendo assim denominados: M400 (tratados com extrato alcoólico das folhas de *M. oleifera* 400 mg/kg/dia), M800 (tratados com extrato alcoólico das folhas de *M. oleifera* 800 mg/kg/dia), M1600 (tratados com extrato alcoólico das folhas de *M. oleifera* 1.600 mg/kg/dia) e SF (tratados com solução fisiológica 0,9% 5 mL/dia). A avaliação histológica do fígado mostrou em todos os grupos arquitetura normal no parênquima hepático. Com ausência de infiltrado leucocitário nos lóbulos, no espaço porta e veia central. Também não houve nenhuma alteração no diâmetro e aparência da veia central e espaço porta. Houve diferença estatisticamente significativa com relação à degeneração hidrópica no fígado entre os grupos M400 e M800 em relação ao controle negativo e entre o grupo M800 em relação ao M1600. Não houve alteração histológica estatisticamente significativa nos rins.

Palavras-chave: Folhas, fígado, histologia, hiperplasia miointimal, rim.

ABSTRACT

The liver is a crucial organ in the metabolism, and can metabolize many drugs, however it also may be damaged by them. Drug-induced hepatic lesions represent one of the most frequent cited reasons for the non-approval of drugs, their suspension, abandonment of use and also post-commercialization regulatory actions. The ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves has therapeutic effect in the reduction of the myointimal hyperplasia; however, the adverse effects of its use still need to be evaluated. Therefore, the objective of this study was to determine the difference of hepatic tissue alterations in rabbits treated with ethanolic extract of *Moringa oleifera* in different concentrations in the control of myointimal hyperplasia after iliac angioplasty. A five-week randomized clinical trial was carried out with experimental animals. The rabbits were divided into four groups, being thereby denominated: M400 (treated with ethanolic extract of *M. oleifera* leaves 400 mg/kg/day), M800 (treated with ethanolic extract of *M. oleifera* leaves 800 mg/kg/day), M1600 (treated with ethanolic extract of *M. oleifera* leaves 1600 mg/kg/day) and SS (treated with 0.9% saline solution mL/day). The histological evaluation of the liver showed normal architecture of the hepatic parenchyma in all the groups. With absence of leukocyte infiltrate in the lobes, in the portal space and central vein. There also was no alteration in the diameter and appearance of the central vein and portal space. There was significant statistical difference with regard to the hydropic degeneration in the liver between the groups M400 and M800 in relation to the negative control and between the group M800 in relation to the M1600. There was no statistically significant histological alteration in the kidneys.

Keywords: Leaves, liver, histology, hyperplasia, kidney.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura microscópica dos sinusoides hepáticos.....	20
Figura 2 - Desenho esquemático dos lóbulos hepáticos do fígado.....	21
Figura 3 - Fotomicrografia do fígado.....	22
Figura 4 - Ácinos hepáticos divididos em zonas metabólicas.....	23
Figura 5 - Desenvolvimento da hiperplasia miointimal.....	25
Figura 6 - Hiperplasia miointimal na veia à direita e artéria normal à esquerda.....	25
Figura 7 - Desenvolvimento de hiperplasia miointimal após angioplastia.....	27
Figura 8 – <i>Moringa oleifera</i>	30
Figura 9 - Cronologia para experimentação animal.....	36
Figura 10 - Sobrevida dos animais durante o experimento.....	39
Figura 11 - Hepatócitos normais.....	40
Figura 12 - Espaço porta sem alterações inflamatórias.....	41
Figura 13 - Veia central.....	42
Figura 14 - Degeneração leve.....	43
Figura 15 - Degeneração hidrópica moderada.....	44
Figura 16 - Arquitetura normal do rim.....	46
Figura 17 - Glomérulo renal.....	47
Figura 18 - Média do peso do fígado dos animais.....	49
Figura 19: Média do peso dos rins dos animais.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise estatística da avaliação histológica do fígado.....	45
Tabela 2 – Análise estatística da avaliação histológica do rim.....	48
Tabela 3 – Estatística do peso (g) do animal segundo o grupo.....	48
Tabela 4 – Estatística da relação peso do fígado/peso do animal.....	51
Tabela 5 - Relação peso do rim/peso do animal.....	51
Tabela 6 - Caracterização fitoquímica do extrato de folhas de <i>Moringa oleifera</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AVE	Acidente vascular encefálico
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CML	Células musculares lisas
DCV	Doenças cardiovasculares
DAP	Doença arterial periférica
DL50	Dose letal de 50%
g	Gramma
HE	Hematoxilina-eosina
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
SF	Soro fisiológico
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas

USG	Ultrassonografia
VC	Veia central
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.2	Objetivos.....	19
1.2.1	Objetivos gerais.....	19
1.2.2	Objetivos específicos.....	19
2	DESENVOLVIMENTO.....	20
2.1	Revisão da literatura.....	20
2.1.1	Fígado.....	20
2.1.2	Alterações hepáticas induzidas por drogas.....	23
2.1.3	Hiperplasia miointimal.....	24
2.1.4	Tratamento da hiperplasia miointimal.....	27
2.1.5	<i>Moringa oleifera</i>	29
2.2	Materiais e Métodos.....	33
2.2.1	Tipo de Estudo.....	33
2.2.2	Local.....	33
2.2.3	Amostra.....	33
2.2.3.1	Critérios de Inclusão.....	33
2.2.3.2	Critérios de Exclusão.....	34
2.2.3.3	Amostragem.....	34
2.2.4	Procedimentos.....	35
2.2.4.1	Extrato das folhas de <i>Moringa oleifera</i>	35
2.2.4.2	Grupos estudados.....	35
2.2.4.3	Randomização.....	36
2.2.4.4	Técnica de mascaramento.....	36
2.2.5	Variáveis.....	37

2.2.5.1	Variável primária.....	37
2.2.5.2	Variáveis secundárias.....	37
2.2.6	Método Estatístico.....	38
2.2.6.1	Tamanho da amostra.....	38
2.2.6.2	Análise Estatística.....	38
2.3	Resultados.....	39
2.3.1	Sobrevida dos animais durante o experimento.....	39
2.3.2	Variável primária.....	39
2.3.3	Variáveis secundárias.....	46
2.3.3.1	Avaliação histológica dos rins.....	46
2.3.3.2	Comparação do peso dos animais.....	48
2.3.3.3	Comparação do peso do fígado entre os grupos.....	49
2.3.3.4	Comparação do peso dos rins entre os grupos.....	49
2.3.3.5	Avaliação da relação do peso do fígado com o peso do animal.....	50
2.3.3.6	Avaliação da relação do peso do rim com o peso do animal.....	51
2.4	Dados complementares.....	52
2.4.1	Caracterização fitoquímica do extrato de folhas de <i>Moringa oleifera</i>	52
2.5	Discussão.....	53
3	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

ANEXOS

ANEXO A - Comprovante de pedido de depósito de patente

1 INTRODUÇÃO

Dentre as lesões hepáticas aquela induzida por drogas é frequente (MOTAMEDI; KAPLOWITZ, 2017; KAPLOWITZ, 2005). A susceptibilidade do fígado à lesão ocorre devido a sua função na metabolização de produtos químicos e regulação da resposta imune (YUAN; KAPLOWITZ, 2013; MOTAMEDI; KAPLOWITZ, 2017). O fígado é um órgão crucial no metabolismo, podendo metabolizar muitas drogas, no entanto pode ser prejudicado pelas mesmas (ZAMORA et al., 2014).

A lesão hepática induzida por drogas representa uma das razões mais frequentemente citadas para a não aprovação de drogas, suspensão, abandono e ações regulatórias pós-comercialização (NATHWANI; KAPLOWITZ, 2006; KAPLOWITZ et al., 2015).

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade em todo o mundo (WHO, 2019). O tratamento endovascular é considerado como primeira escolha para a terapia invasiva da estenose e/ou oclusão provocada por placas de ateroma (KITAMOTO; EGASHIRA; TAKESHITA, 2003). Entretanto, este tratamento pode ser comprometido pela ocorrência da hiperplasia miointimal que é a proliferação e migração de células musculares lisas da camada média arterial para a camada íntima, diminuindo, dessa forma, o lúmen vascular (LL'INSKAIA et al., 2004), resultando em reestenose do vaso e falha do tratamento (KUNTZ; BAIM, 2000; DINIS, 2007). A diminuição do fluxo sanguíneo provoca isquemia ou trombose local, levando ao infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular encefálico (AVE) e doença arterial periférica (DAP) (TASSIOPOULOS; GREISLER, 2000).

Nesse contexto, a cirurgia vascular reconstrutiva tem enfrentado, na sua história, um fenômeno biológico complexo, comprometendo os resultados dos procedimentos abertos ou endovasculares. A hiperplasia miointimal e fibroplasia da anastomose, desenvolvida na anastomose vascular ou em seguida à angioplastia por balão, leva, muitas vezes, a uma oclusão vascular e insuficiência da revascularização. Diversas pesquisas têm sido dedicadas, ao longo dos anos, ao estudo dos mecanismos envolvidos no processo e tentativas de controlar o fenômeno por agentes farmacoterapêuticos; os

resultados, porém, ainda estão longe de serem considerados satisfatórios (DINIS, 2007; MURPHY et al., 2006; LIMA et al., 2016).

Muitas drogas têm sido testadas (MURPHY et al., 2006; LIMA, et al, 2016; UCHIMURA et al., 2004). Porém há relatos de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade provocadas por medicamentos usados com essa finalidade como o paclitaxel e sirolimus (KARPOVA et al., 2009; JACQUES et al., 2010; LIUZZO; AMBROSE; COPPOLA, 2005; NIEMCZYK 2005; CHOUDHURY et al., 2017). Um estudo recente, realizado através de metanálise e revisão sistemática, mostrou um aumento do risco de morte após a aplicação de balões e stents revestidos com paclitaxel (KATSANOS, 2018).

Dessa forma, há uma grande necessidade de alternativas farmacológicas para prevenir ou reverter a hiperplasia miointimal (LIBBY, 2006) e, como essas drogas, normalmente, apresentam metabolização hepática e excreção renal necessita-se de estudos científicos a respeito da existência ou não de lesão destes órgãos (WAUGH; WAGSTAFF, 2004; WANG et al., 2008). WHO (2000) incorporou estudos toxicológicos agudos e crônicos como forma de avaliação da segurança de produtos à base de plantas.

A *Moringa oleifera* Lam. é uma das espécies mais conhecidas e amplamente distribuídas da família Moringaceae (RAMACHANDRAN et al., 1980). Uma grande variedade de efeitos nutricionais e medicinais tem sido atribuída às suas raízes, vagens, folhas, flores, frutos e sementes (RAMACHANDRAN et al., 1980, ANWAR et al., 2007; KUMAR et al., 2010). A parte mais utilizada da planta são as folhas (LEONE et al., 2015), a qual foi atribuída atividade antioxidante (SANTOS et al., 2012; VATS; GUPTA, 2017), anti-inflamatória (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2017; KOU, 2018; LIAO et al., 2018), hipolipemiante e antiaterosclerótica (CHUMARK et al., 2008; JAIN et al., 2010) e atividade hepatoprotetora (SINGH et al., 2014; OMODONISI et al., 2017), sendo eficaz na redução da severidade do dano hepático induzido por acetaminofeno em ratos (FAKURAZI; SHARIFUDIN; ARULSELVAN, 2012).

Foi detectado, em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, que o extrato das folhas de *Moringa oleifera* na dose de 400 mg/Kg/dia possui efeito terapêutico na diminuição da hiperplasia miointimal, no entanto não há dados com relação aos possíveis efeitos adversos. Sabendo-se que o extrato de *M. oleifera* possui propriedade

hepatoprotetora, é necessário saber se essa propriedade se mantém nas doses utilizadas para o tratamento da hiperplasia miointimal. Dessa forma é relevante responder a seguinte pergunta de pesquisa: qual a diferença de alterações teciduais hepáticas em coelhos tratados com extrato alcoólico de *Moringa oleifera* em diferentes concentrações no controle da hiperplasia miointimal pós-angioplastia de íliaca?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Determinar a diferença de alterações teciduais hepáticas em coelhos tratados com extrato alcoólico de *Moringa oleifera* em diferentes concentrações.

1.2.2 Objetivo específicos

- Avaliar a diferença de alterações teciduais renais;
- Avaliar a sobrevivência dos animais;
- Comparar o peso dos animais entre os grupos;
- Comparar o peso do fígado e rins entre os grupos;
- Avaliar a relação do peso do fígado com o peso do animal entre os grupos;
- Avaliar a relação do peso do rim com o peso do animal entre os grupos;
- Avaliar a degeneração hidrópica no fígado;
- Avaliar inflamação no rim.

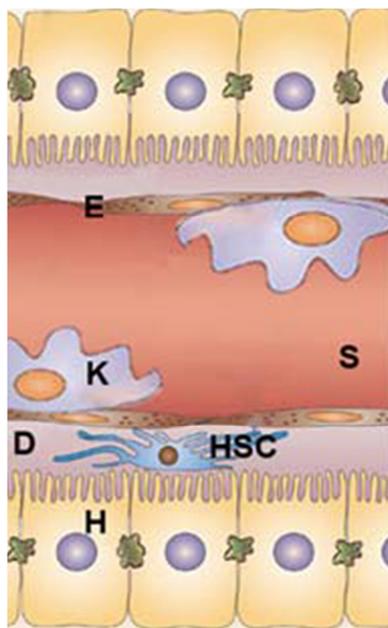
2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão da literatura

2.1.1 Fígado

O fígado é o maior órgão interno do corpo, pesando em média 1,36 kg. Ele está localizado no quadrante superior direito do abdome, abaixo da superfície inferior do diafragma (VANPUTTE et al., 2016). O fígado é um dos órgãos metabólicos mais importantes dos vertebrados com múltiplas funções. Ele recebe sangue oxigenado do coração através da artéria hepática e sangue rico em nutrientes do trato gastrointestinal da veia porta. O sangue flui através dos sinusóides hepáticos (figura 1), desemboca na veia central (centrolobular) e deixa o fígado pela veia hepática (HAMEL et al., 2006). A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos, e para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. A eliminação ocorre na bile, uma secreção exócrina do fígado, importante para a digestão de lipídios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Figura 1 - Estrutura microscópica dos sinusoides hepáticos.

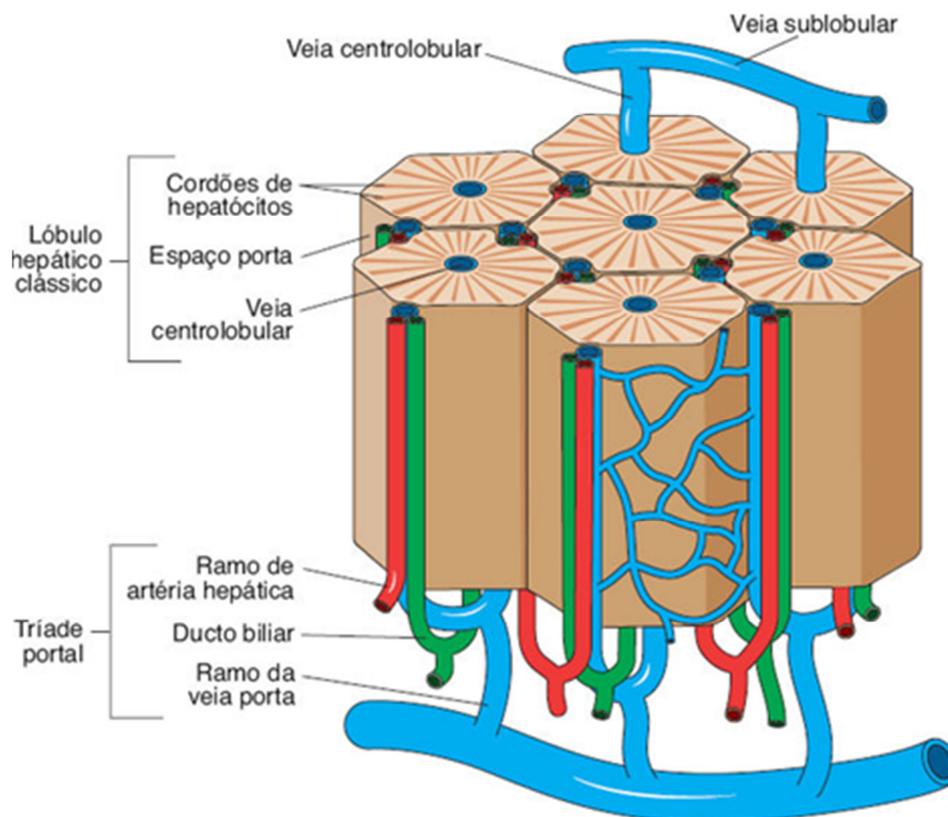


Fonte: WANG et al. (2016).

Notas: H: hepatócito; D: espaço de Disse; HSC: células hepáticas estreladas (células de Ito); K: célula de Kupffer; S: sinusóide; E: célula endotelial.

Os hepatócitos são os componentes estruturais básicos do fígado, representando 70–85% da população de células (HAMEL et al., 2006). Essas células epiteliais estão agrupadas em placas interconectadas. Em cortes histológicos, unidades estruturais denominadas lóbulos hepáticos podem ser observadas. O lóbulo hepático é formado por uma massa poligonal de tecido (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Figura 2 - Desenho esquemático dos lóbulos hepáticos do fígado.



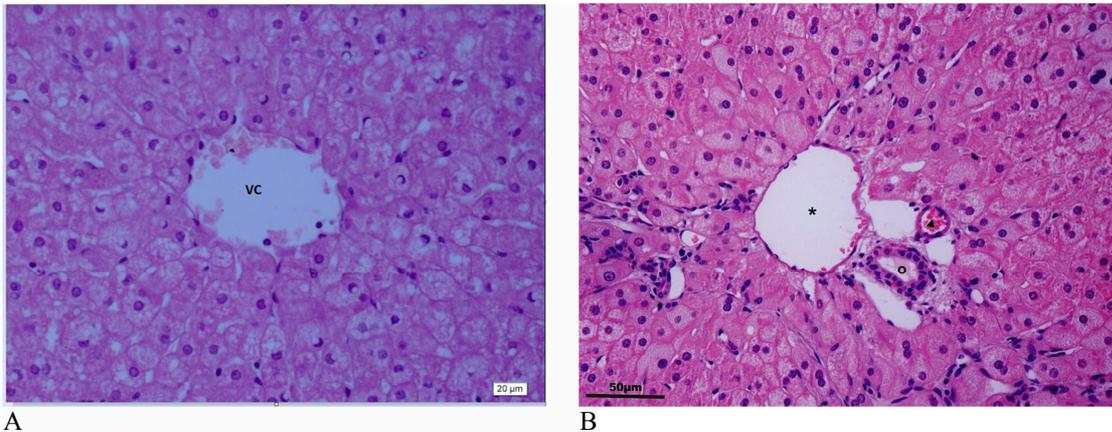
Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO (2018).

Além dos hepatócitos, outras células são encontradas no fígado, como: células de Kupffer que são macrófagos especializados do fígado (LI et al., 2014); células estreladas, também conhecidas como células de Ito, que podem ser ativadas em caso de lesão hepática, levando a formação de colágeno, fibrose e cirrose. As células estreladas estão localizadas no espaço de Disse que está localizado entre os hepatócitos e o endotélio sinusoidal (WU; ZERN, 2000).

Em algumas regiões da periferia dos lóbulos, existe tecido conjuntivo, contendo ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos. Essas regiões, os espaços

porta, são encontradas na periferia dos lóbulos (Figura 3) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Figura 3 - Fotomicrografia do fígado.

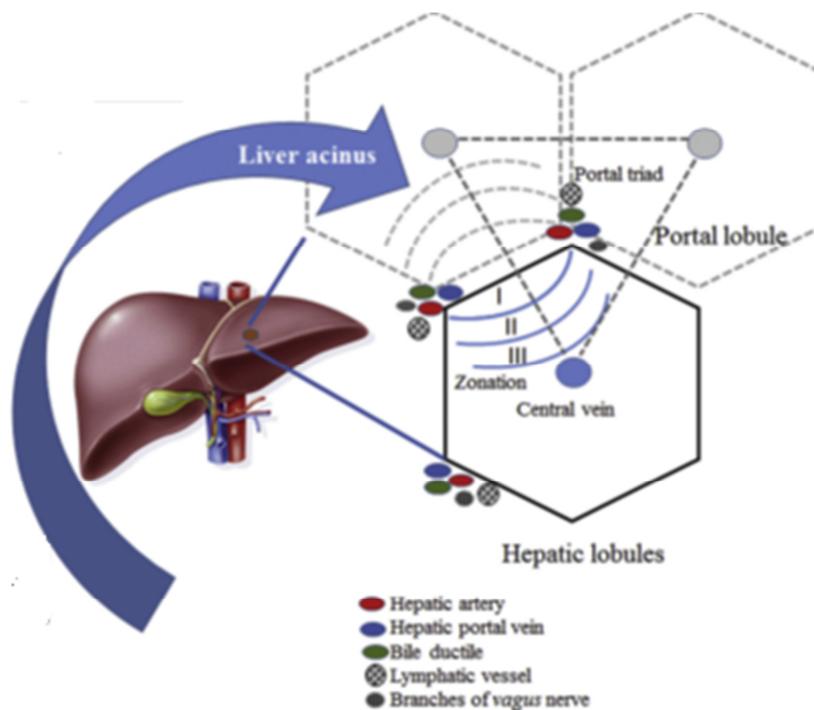


Fonte: O autor (2019).

Notas: A. Veia central (VC). B. Espaço porta contendo ramo da artéria hepática (▲), ramo da veia porta (*) e ducto biliar (o), circundados por tecido conjuntivo.

Existe uma divisão do fígado em zonas metabólicas baseada na tensão de oxigênio. Dessa forma, o fígado é dividido em ácinos hepáticos. Os hepatócitos em cada ácino hepático formam três zonas elípticas concêntricas (HIJMANS et al., 2014). A zona 1, que está mais próxima do suprimento sanguíneo a partir dos ramos da veia porta e da artéria hepática, corresponde à periferia dos lóbulos clássicos; a zona 3 é a mais próxima da veia central; corresponde à parte mais central do lóbulo clássico que circunda a veia hepática terminal; e a zona 2 fica entre as zonas 1 e 3, mas não tem limites bem-definidos (figura 4). O zoneamento é importante na descrição e na interpretação dos padrões de degeneração, regeneração e efeitos tóxicos específicos no parênquima hepático com relação ao grau ou à qualidade da perfusão vascular das células hepáticas (ROSS; PAWLINA, 2018).

Figura 4 - Ácinos hepáticos divididos em zonas metabólicas.



Fonte: Morsiani et al. (2019).

O fígado é essencial para a vida, porque possui um vasto leque de funções bioquímicas e metabólicas, inclusive a de detoxificação de substâncias que seriam danosas se seu acúmulo fosse permitido, e de excretar metabólitos de fármacos (BARRET et al., 2014). Ainda possui função de síntese, produção de calor, regulação, metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, função imune, estocagem de componentes específicos, como vitaminas e íons (GARCÌA; BENDJELID, 2018; MORSIANI et al., 2019).

2.1.2 Alterações hepáticas induzidas por drogas

O papel do fígado no metabolismo das drogas o torna suscetível à lesão tóxica (BADAWI, 2019). A lesão induzida por drogas é uma causa frequente de lesão hepática (MOTAMEDI; KAPLOWITZ, 2017; KAPLOWITZ, 2005), sendo o fígado o órgão mais afetado por toxicidade induzida por medicamentos à base de plantas e suplementos alimentares (MOTAMEDI; KAPLOWITZ, 2017). Essa susceptibilidade à lesão ocorre devido a sua função na metabolização de produtos químicos e regulação da resposta imune (YUAN; KAPLOWITZ, 2013). A lesão hepática induzida por droga resulta em morte do hepatócito e inflamação (IORGA; DARA; KAPLOWITZ, 2017).

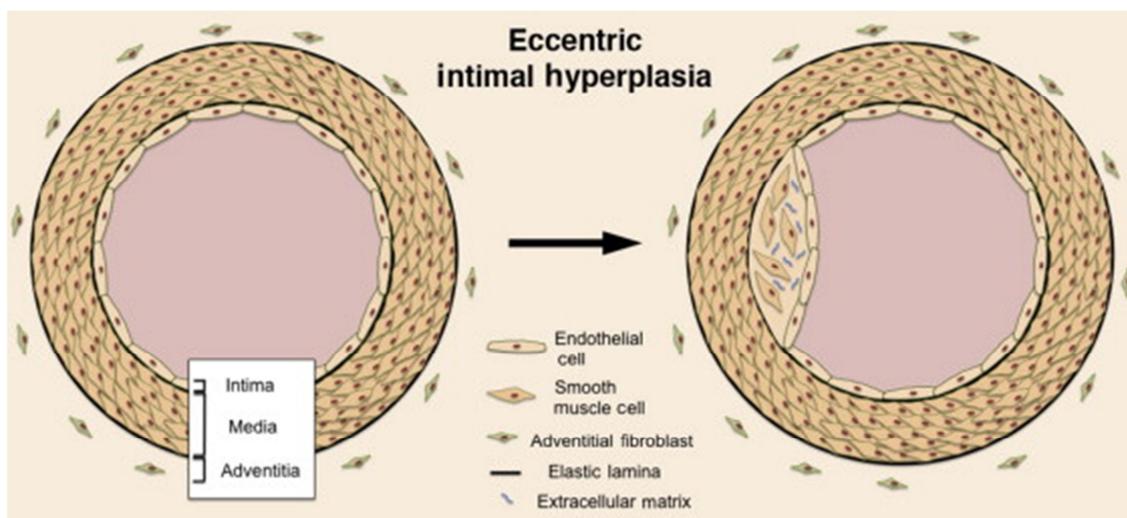
As manifestações clínicas da doença hepática induzida por produtos naturais é semelhante àquelas produzidas pelos medicamentos tradicionais, variando desde as simples alterações das enzimas hepáticas, até hepatites agudas, crônicas, síndrome de obstrução sinusoidal e mesmo cirrose hepática. As hepatites medicamentosas podem ser assintomáticas, manifestando-se tão somente por alterações das enzimas hepáticas ou apresentando-se com espectro clínico variado, muitas vezes como hepatites agudas, de evolução benigna, ou na forma grave, em que seu prognóstico é sombrio (SOUZA, 2019). A manifestação mais séria é a morte do hepatócito, levando à falência aguda do fígado (YUAN; KAPLOWITZ, 2013).

As lesões hepáticas têm se tornado um dos problemas de saúde mais sérios e as drogas sintéticas disponíveis são caras e podem causar dano adicional (STICKEL; SCHUPPAN, 2007).

2.1.3 Hiperplasia miointimal

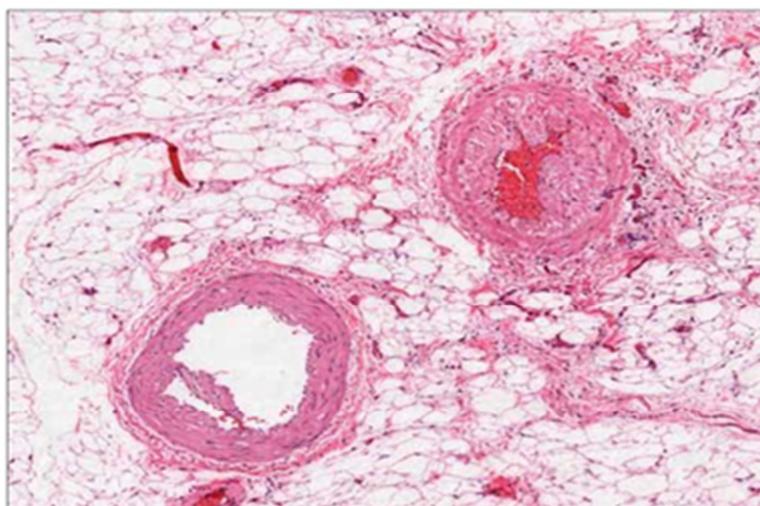
A hiperplasia miointimal é a resposta de vasos à mudança crônica de estrutura que ocorre em artérias desnudas, veias arterializadas e em anastomoses de próteses usadas como enxertos para revascularização (LIBBY, 2006), sendo caracterizada pela proliferação e migração de células musculares lisas da camada média arterial para a camada íntima (endotelial), promovendo um remodelamento vascular patológico, o que diminui, dessa forma, o lúmen vascular (figura 5 e 6) (LL'INSKAIA et al., 2004; VITA et al, 1990; JOHN et al., 1998; RZUCIDLO; MARTIN, POWELL, 2007).

Figura 5 - Desenvolvimento da hiperplasia miointimal.



Fonte: <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/hyperplasia>

Figura 6 - Hiperplasia miointimal na veia à direita e artéria normal à esquerda.



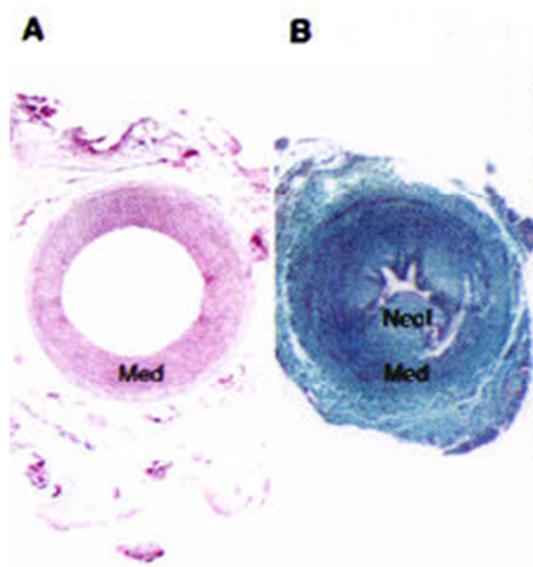
Fonte: STUBBENDORFF et al. (2014).

Notas: coloração em hematoxilina-eosina. Aumento 10x.

O processo envolve uma complexa cadeia de reações celulares, moleculares e imunológicas, que variam na sua intensidade e expressão dependendo do tipo de trauma inicial, da localização na árvore arterial e de fatores associados (BRITO, 2008).

O endotélio apresenta um papel central na manutenção do equilíbrio vascular, através dos efeitos anti-inflamatório e anticoagulante das células endoteliais (FUKE et al., 2007). Imediatamente após angioplastia, com implante de stent, a superfície endotelial desnuda e a túnica média da parede arterial lesada devido ao trauma mecânico, provocam um processo inflamatório, o que leva à adesão plaquetária, ativação, agregação e deposição de fibrina e, posteriormente, a formação de trombos dentro do stent ou do vaso (LIU; ROUBIN; KING, 1989). Esses microtrombos, bem como a lesão por estiramento da parede do vaso, atraem células inflamatórias, tais como macrófagos e linfócitos, que migram a partir da corrente sanguínea e também a partir da *vasa vasorum*. Essas células inflamatórias estimulam a produção de vários fatores de crescimento e citocinas, localmente, que estimulam a diferenciação de células musculares lisas (CML) quiescentes do estado contrátil para o de síntese, no qual exibem um aumento da capacidade de proliferação, migração e secreção (SCHWARTZ; HENRY, 2002; RZUCIDLO; MARTIN, POWELL, 2007). Possivelmente, também, recrutam as células-tronco circulantes para reentrar no ciclo celular e replicar, formando uma camada neointimal dentro do lúmen do vaso. Essa plasticidade fenotípica das CML é reconhecida na atualidade por desempenhar um papel significativo no desenvolvimento da hiperplasia intimal (VITA et al., 1990; JOHN et al., 1998). Mesmo que a proliferação celular cesse em menos de 2 semanas, após a lesão inicial, essas células musculares lisas continuam a produzir matriz extracelular abundante, o que leva ao aumento do volume da neointima. Se esse processo de crescimento neointimal for exuberante e significativo, teremos o desenvolvimento de reestenose intra stent (Figura 7) (SCHWARTZ; HENRY, 2002). Como uma lesão da parede vascular profunda estimula um maior grau de hiperplasia miointimal, a lesão de implantação do stent, na verdade, pode induzir o crescimento do tecido mais neointimal do que a lesão por balão de angioplastia (SCHWARTZ; 1992).

Figura 7 - Desenvolvimento de hiperplasia miointimal após angioplastia.



Fonte: CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO (1997).

Notas: A. artéria normal; B. intensa redução do lúmen arterial obtida quatro semanas após angioplastia experimental, causada por hiperplasia miointimal. Coloração hematoxilina-eosina em A e tricrômio de Masson em B. Med - túnica média. Neol - neoíntima.

O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) é conhecido por exercer ações pleiotrópicas no fenótipo de proliferação das células musculares lisas (CML) e síntese de matriz extracelular (GHOSH et al., 2005). TGF- β é um potente regulador do fenótipo e função das CML na homeostase e na doença (TEN; HILL, 2004). Estudos *in vitro* e em animais suportam a hipótese de que a homocisteína é um importante fator de risco para a hiperplasia miointimal (HANSRANI; GILLESPIE; STANSBY, 2002).

2.1.4 Tratamento da hiperplasia miointimal

A prevenção ou tratamento da reestenose/aterosclerose é um grande desafio para a clínica (KITAMOTO; EGASHIRA; TAKESHITA, 2003). O tratamento da hiperplasia miointimal após agressão endotelial através de procedimentos endovasculares avançou de maneira substancial nas últimas décadas por meio do uso de drogas inibidoras da resposta inflamatória endotelial (SOUSA et al., 2003; SOUSA et al., 2017). Estas drogas apresentam eliminação hepática e renal, necessitando de estudos científicos para responder se existe ou não lesão destes órgãos (WAUGH; WAGSTAFF, 2004; WANG

et al., 2008). WHO (2000), incorporou estudos toxicológicos agudos e crônicos como forma de avaliação da segurança de produtos à base de plantas.

Diversas pesquisas têm sido dedicadas, ao longo dos anos, ao estudo dos mecanismos envolvidos no processo e tentativas de controlar a hiperplasia miointimal por agentes farmacoterapêuticos; os resultados, porém, ainda estão longe de serem considerados satisfatórios (DINIS, 2007; MURPHY et al., 2006; LIMA et al., 2016).

Muitas drogas têm sido testadas (MURPHY et al., 2006; LIMA, et al, 2016; UCHIMURA et al., 2004). Agentes com propriedades anti-inflamatórias ou antiproliferativas foram incorporados na superfície do stent e testados clinicamente. Muitos desses agentes têm mais de um mecanismo de ação (SOUSA et al., 2001; SOUSA et al., 2003). Apenas dois agentes antiproliferativos, sirolimus e paclitaxel, têm provado ser eficazes em ensaios clínicos (SOUSA; SERRUYS; COSTA, 2003a,b).

O sirolimus (rapamicina) mostrou efeito redutor no espessamento da íntima, inibindo a progressão do ciclo celular por inibição da síntese de DNA (UCHIMURA et al., 2004). O paclitaxel é usado, principalmente, para o tratamento de câncer de ovário, de pulmão e de outros tipos de câncer (GELMON, 1994), mas, também tem sido usado para inibir a hiperplasia miointimal, pois demonstrou inibir a proliferação de células musculares lisas *in vitro* e em coelhos após lesão por balão *in vivo* (AXEL et al, 1997). Os inibidores de migração são destinados a prevenir a migração de células do músculo liso para o interior do vaso. Se as células musculares lisas migrarem para o lado luminal do stent, elas podem produzir matriz extracelular e estreitar o lúmen vascular (TANABE et al., 2004).

O paclitaxel, usado na prevenção e tratamento da hiperplasia miointimal, é fortemente hepatotóxico, aumentando a atividade de enzimas hepáticas que normalizam em até 30 dias após o tratamento, no entanto, alterações morfológicas persistem por um período mais longo (KARPOVA et al., 2009). Há também relato de hepatotoxicidade severa com o uso do sirolimus (JACQUES et al., 2010) e de nefrotoxicidade com o uso de paclitaxel (CHOUDHURY et al., 2017).

Portanto, tornam-se necessárias alternativas de tratamento/medicamentos que sejam seguros do ponto de vista de toxicidade. Nesse contexto, destacam-se os

medicamentos de origem vegetal que têm ganhado atenção pela fácil acessibilidade e por não necessitarem de procedimentos de síntese laboriosos (RAVICHANDIRAN et al., 2012), sendo bastante procurados por serem acessíveis e por provocarem menos efeitos colaterais (MODAK et al., 2015).

2.1.5 *Moringa oleifera*

A *Moringa oleifera* Lam. é uma das espécies mais conhecidas e amplamente distribuídas da família Moringaceae (figura 8) (RAMACHANDRAN et al., 1980), sendo a espécie mais cultivada entre as treze existentes (PADAYACHEE; BAIJNATH, 2012). Nativa do Himalaia, Índia, Paquistão, Ásia menor, África e Arábia (SOMALI et al., 1984; MUGHAL et al., 1999) e atualmente distribuída nas Filipinas, Camboja, América do sul, central, do norte e Caribe (MORTON, 1991).

Figura 8 - *Moringa oleifera*.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

Fonte: SANTOS (2007).

Notas: A. Árvore; B. inflorescência; C. Vagem; D. Sementes; E. Folhas.

A *Moringa oleifera* é resistente a seca e tolera uma ampla variedade de solo e condições de pluviosidade (TSAKNIS; LALAS, 2002). Sua altura chega a 10 m (PADAYACHEE; BAIJNATH, 2012).

A *Moringa oleifera* tem sido reconhecida por um grande número de componentes bioativos (MARTIN, 2013; SAINI; SIVANESAN; KEUM, 2016). As folhas são a parte mais usada da planta, sendo ricas em vitaminas (A, C e E)

carotenoides, polifenóis, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, glucosinolatos, isotiocianatos, taninos e saponinas (LEONE et al., 2015; EFIONG et al., 2013; FERREIRA; FARIAS; OLIVEIRA, 2008; RAMACHANDRAN et al., 1980).

Quase todas as partes desta árvore têm sido bastante consumidas por seres humanos e utilizadas para diversos fins domésticos como: o cultivo em alamedas, forragem animal, biogás, agente de limpeza doméstica, corante azul, fertilizante, nutriente foliar, adubação verde, goma (a partir de troncos de árvores), suco clarificador (pó de sementes), plantações ornamentais, biopesticida, celulose, corda, tanino para curtimento de peles, purificação de água, lubrificante (óleo), fabricação de perfumes e produtos de cuidados capilares (FUGLIE, 1999).

Uma grande variedade de efeitos nutricionais e medicinais tem sido atribuída às suas raízes, vagens, folhas, flores, frutos e sementes (RAMACHANDRAN et al., 1980, ANWAR et al., 2007; KUMAR et al., 2010; KOU et al., 2018). As folhas, frutas, flores e vagens imaturas são usadas em diversos países como vegetais altamente nutritivos (ANWAR; BHANGER, 2003; ANWAR et al., 2005). As folhas são uma fonte significativa de β -caroteno, vitamina C, proteína, ferro e potássio, podendo ser consumidas frescas, cozidas ou o pó guardado sem refrigeração durante muitos meses sem perda do valor nutricional (PARROTA, 2001). Frutas (vagem), caule e folhas têm sido usadas para combater a desnutrição, especialmente entre crianças e em lactantes para aumentar a produção de leite (DILLARD; GERMAN, 2000; ESTRELLA et al., 2000).

Foi ainda demonstrada atividade antioxidante no extrato aquoso e salino das folhas, flores e inflorescências (SANTOS et al., 2012). A vagem mostrou efeito hipotensor (FAIZI et al., 1998), antidiabético e atividade antioxidante (GUPTA et al., 2012). As sementes são um dos melhores coagulantes naturais usados para diminuir a turbidez da água (NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998), tendo sido demonstrado que não apresenta potencial genotóxico nas concentrações recomendadas para essa finalidade (ROLIM et al., 2011). Adicionalmente as sementes apresentam atividade antimicrobiana, antitumoral e larvicida contra o *Aedes aegypti* (GUEVARA; VARGAS, 1999, COELHO et al., 2009). As raízes possuem atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e, ainda, parecem possuir atividade anti-espasmódica, através do bloqueio

dos canais de cálcio, o que constitui a base para a sua utilização tradicional nos casos de diarreia (EZEAMUZLE et al., 1996; CÁCERES et al., 1992; FAIZI et al., 1994).

Os frutos possuem atividade hipolipidêmica (MEHTA et al., 2003). A flor da moringa tem alto valor medicinal como estimulante central, afrodisíaco, abortivo, anti-inflamatório, antitumoral, age em doenças musculares, diminui o colesterol sérico, triglicerídeos, VLDL, LDL, melhora o índice aterogênico, diminui o perfil lipídico no coração, no fígado e na aorta de coelhos hipercolesterolêmicos, aumenta a excreção fecal de colesterol (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980).

As folhas são utilizadas, principalmente, com propósito nutricional e medicinal, sendo os efeitos farmacológicos justificados pelo grande número de compostos bioativos (POPOOLA; OBEMBE, 2013). Estudos determinaram que as folhas possuem componentes bioativos que protegem contra doenças crônicas (VEGARA-JIMENEZ; ALMATRAFI; FENANDEZ, 2017), regulam a tireóide, possuem efeito radioprotetor (RAO et al., 2001), hipolipemiante (JAIN et al., 2010; GHASI; NWOBODO; OFILI, 2000), antitumoral (MURAKAMI et al., 1998), potencial hipoglicêmico e antidiabético (JAISWAL et al., 2009), bem como potencial cardioprotetor (PANDA et al., 2013). Alguns trabalhos mostram que o extrato alcoólico e metanólico das folhas de *Moringa oleifera* apresenta atividade hepatoprotetora (SINGH et al., 2014; OMODONISI et al., 2017; FARID; HEGAZI, 2019) e que o extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Moringa oleifera* mostrou-se eficaz na redução da severidade do dano hepático induzido por acetaminofeno em ratos (FAKURAZI; SHARIFUDIN; ARULSELVAN, 2012). O extrato metanólico das folhas de *Moringa oleifera* possui efeito hepatoprotetor, que possivelmente seja devido à presença de quercetina (ANWAR et al., 2007; SELVAKUMAR; NATARAJAN, 2008; TEJAS et al., 2012). Adeyemi e Elebiyo (2014), observaram que o extrato de *Moringa oleifera* melhora o dano hepático induzido por drogas.

Devido às várias funções reportadas, a *M. oleifera* tem ganhado uma enorme atenção, levando ao aumento da exploração e entendimento das suas funções farmacológicas e mecanismos de ação (KOU et al., 2018).

2.2 Materiais e métodos

Este projeto de pesquisa foi encaminhado, para avaliação, ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), Maceió, AL, tendo sido aprovado o início da pesquisa sob o protocolo número 104 “A”.

O projeto está de acordo com a lei 6638, de 08 de maio de 1979, que trata das Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais; além da Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15 de outubro de 1978; Lei de Crimes Ambientais (Lei Nº 9.605/1998), bem como as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, de 1991, sobre os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

2.2.1 Tipo de Estudo

Ensaio clínico aleatório em animais de experimentação com 5 semanas de seguimento.

2.2.2 Local

Centro de Cirurgia Experimental e Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (Universidade pública, estadual, com cursos de graduação na área da saúde, Maceió, AL).

2.2.3 Amostra

2.2.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos 40 coelhos (10 em cada grupo) machos, adultos jovens (12 meses de idade), pesando mais de 2 Kg, da espécie *Oryctolagus cuniculus* da linhagem Nova Zelândia. Inicialmente os coelhos foram sorteados para serem colocados nas gaiolas numeradas, sendo submetidos, posteriormente à angioplastia da artéria ilíaca comum direita após tratamento com dieta hiperlipidêmica para indução da hiperplasia miointimal.

Para a dieta hiperlipidêmica foram utilizados 10 mL de gema de ovo de galinha Carnáuba® Tipo Grande, duas vezes ao dia durante 100 dias. Para a ingestão da gema os ovos foram limpos e abertos no momento da utilização, evitando assim deterioração e contaminação da dieta. A gema foi ofertada crua aos coelhos (SANTOS, 2008), através do uso de seringa sem agulha.

Após os 100 dias iniciais da dieta hiperlipidêmica (SANTOS, 2008), foi realizada angioplastia por balão (NOGUEIRA et al., 2012; BANDEIRA, 2015; ROLIM et al., 2016; LIMA et al., 2016). A angioplastia foi realizada com o animal sob anestesia geral com xilazina (4mg/Kg) e ketamina (25 mg/Kg), administradas por via intramuscular. Após os procedimentos de antisepsia operatória, a artéria femoral direita foi dissecada para realização de arteriotomia transversa com introdução do catéter balão para dar acesso à artéria ilíaca, onde foi realizado o procedimento. Com o balão posicionado na artéria ilíaca, o mesmo foi insuflado na pressão nominal por 60 segundos. A escolha do diâmetro do balão a ser usado levou em consideração a razão balão:artéria ilíaca de 1:1,5, tendo sido o diâmetro interno da artéria previamente medido por ultrassonografia (USG) (adaptado de GRUENTZIG, 1979).

2.2.3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo coelhos com anomalias anatômicas, identificadas por deformidades nas patas que dificultavam o acesso arterial, os que morreram antes da intervenção medicamentosa (extrato de folhas de *Moringa oleifera*) e aqueles em que houve perda do material durante o processamento.

2.2.3.3 Amostragem

Os coelhos selecionados formaram uma amostra não probabilística por conveniência. Os animais foram adquiridos de um cunicultor de animais para fins comerciais, onde os critérios de seleção foram apenas a idade, o peso e o sexo.

2.2.4 Procedimentos

2.2.4.1 Extrato das folhas de *Moringa oleifera*

Dez quilos de folhas de *Moringa oleifera* foram coletadas do herbário da fazenda Santa Helena, Juazeiro, BA. As folhas foram resfriadas para evitar deterioração e transportadas até o Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde o foi preparado o extrato bruto das folhas de *Moringa oleifera* em etanol a 95%. As folhas frescas foram trituradas e colocadas em um percolador de aço inox à temperatura ambiente (26 °C) com 10 L de etanol a 95% durante 72h, seguido de filtração, por meio da inserção de algodão na parte inferior do percolador. O resíduo foi novamente extraído com 7,5 L de etanol a 95% durante 4 dias e, depois, com 8 L durante 5 dias, sempre seguido de filtração. O extrato etanólico foi passado em rotaevaporador da marca BUCHI® (230 V 50/60 Hz) a vácuo e à temperatura de 48° C, conforme técnica realizada no Laboratório de Bioquímica da UFPB para a retirada de água e álcool. Ao final dessa etapa, foi obtido 732,2 g do extrato das folhas de *M. oleifera*.

Foi realizada a triagem fitoquímica do extrato das folhas de *Moringa oleifera* para detectar presença ou a ausência de metabólitos secundários utilizando reagentes de coloração ou precipitação. Foram pesquisados os seguintes grupos químicos: alcaloides, com as reações de Bouchardat, Mayer, Dragendorff e ácido sílico-tungstico; esteroides, pela reação de Liebermann-Buchard; taninos, pela reação de gelatina e com cloreto férrico; flavonoides, utilizando fita de magnésio e fluorescência; saponinas, utilizando-se o teste de espuma.

2.2.4.2 Grupos estudados

A partir do dia seguinte à angioplastia, cada grupo, determinado por randomização, recebeu o seguinte tratamento durante 35 dias: M400 recebeu 400 mg/Kg/dia do extrato alcoólico da folhas de *Moringa oleifera*; M800 recebeu 800 mg/Kg/dia do extrato alcoólico da folhas de *Moringa oleifera*; M1600 recebeu 1600 mg/Kg/dia do extrato alcoólico da folhas de *Moringa oleifera*; e SF (controle negativo) que recebeu 5mL/dia de soro fisiológico 0,9%. Para a administração aos coelhos, o extrato foi diluído em solução fisiológica 0,9% (SF), sendo 1mL de SF para cada 200

mg do extrato (200 mg/mL). A administração foi realizada por via oral com o uso de seringa sem agulha para facilitar a ingestão. Posteriormente, os coelhos foram eutanasiados com dose letal de propofol na dose de 150mg/kg (71), endovenosa (Quadro 1).

Figura 9 – Cronologia para experimentação animal.

Quarentena	Dieta hipercolesterolêmica 10 mL/2 x ao dia	USG + Rand.	Angioplastia	Tratamento Mo, SF	E
40 dias	100 dias	2 dias	4 dias	35 dias	

Fonte: O autor (2019).

Notas: USG: ultrassonografia, Rand.: randomização, Mo: Moringa oleifera, SF: soro fisiológico, E: eutanásia.

2.2.4.3 Randomização

A randomização foi realizada por permutação de blocos. O sorteio dos animais foi feito aleatoriamente para cada grupo com o auxílio de um programa gratuito, o Research Randomize, no site <http://www.randomizer.or/form.htm>, sendo 4 blocos com 10 números. Cada bloco correspondia a um grupo a ser estudado (SF, M400, M800 e M1600) e os números gerados foram dos coelhos que compuseram cada grupo.

2.2.4.4 Técnica de mascaramento

A avaliação das lâminas histológicas foi realizada por dois patologistas de forma cega. Para isso, foi feita uma codificação, onde foram atribuídos números às lâminas, de forma que o indivíduo que quantificou as variáveis não tenha tido acesso aos grupos estudados.

2.2.5 Variáveis

2.2.5.1 Variável primária

Diferença das alterações teciduais hepáticas: Após eutanasiados, os animais foram submetidos à cirurgia para retirada do fígado para pesagem e análise histopatológica de toxicidade do extrato.

As peças cirúrgicas foram fixadas em formalina a 10% e levadas para o preparo rotineiro de lâminas histológicas, de seguinte forma:

1. Desidratação progressiva em álcool de diferentes concentrações (70% à 99%);
2. Diafanização em xilol;
3. Embebição em parafina líquida à 60°C, para preparação dos blocos de parafina;
4. Corte dos blocos de parafina, com espessura de 3 micras;
5. Montagem em lâminas de vidro;
6. Coloração em hematoxilina eosina (HE);

As lâminas foram fotografadas em microscópio trinocular, acoplado à uma câmera digital (OLYMPUS BX51®).

2.2.5.2 Variáveis secundárias

Diferença das alterações teciduais renais: Após eutanasiados, os animais foram submetidos à cirurgia para retirada dos rins para análise histopatológica de toxicidade do extrato. A fixação e preparo das lâminas seguiu o mesmo protocolo adotado para o fígado.

Relação massa do órgão pela massa corporal (hepática e renal): Cada animal foi pesado antes de ser eutanasiado e o fígado e os rins, também, foram pesados para que a relação massa do órgão pela massa corporal pudesse ser calculada. Os pesos dos animais e dos órgãos foram verificados através do uso de balança.

2.2.6 Método Estatístico

2.2.6.1 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi arbitrado em 40 coelhos, sendo 10 coelhos em cada grupo, com base na literatura (ROLIM et al., 2016; LIMA et al., 2016), atendendo a princípios bioéticos e respeitando as normas do COBEA.

2.2.6.2 Análise Estatística

Os dados foram expressos através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas da média, desvio padrão e mediana das variáveis numéricas. Para a comparação entre os grupos foram utilizadas técnicas de estatística inferencial através dos testes estatísticos: F (ANOVA) nas variáveis contínuas, teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas do referido teste na variável na escala ordinal e teste Exato de Fisher na variável categórica. Ressalta-se que a escolha do teste F (ANOVA) ocorreu devido à verificação da hipótese de normalidade dos dados em cada um dos grupos. A normalidade dos dados verificada através do teste de Shapiro-Wilk.

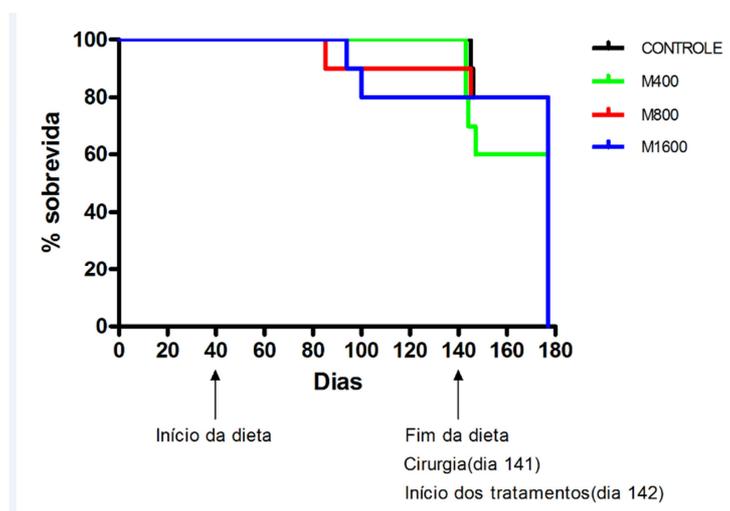
A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

2.3 Resultados

2.3.1 Sobrevida dos animais durante o experimento

A sobrevida dos animais foi acompanhada durante todo o experimento. A curva de sobrevivência mostrou que não houve morte de coelhos ao longo do período de tratamento. As mortes ocorreram durante o período da dieta hiperlipidêmica e/ou logo após a cirurgia (angioplastia), sugestivo ser devido a complicações das mesmas (figura 10). Além disso, não foram observados sinais clínicos de toxicidade.

Figura 10 - Sobrevida dos animais durante o experimento.

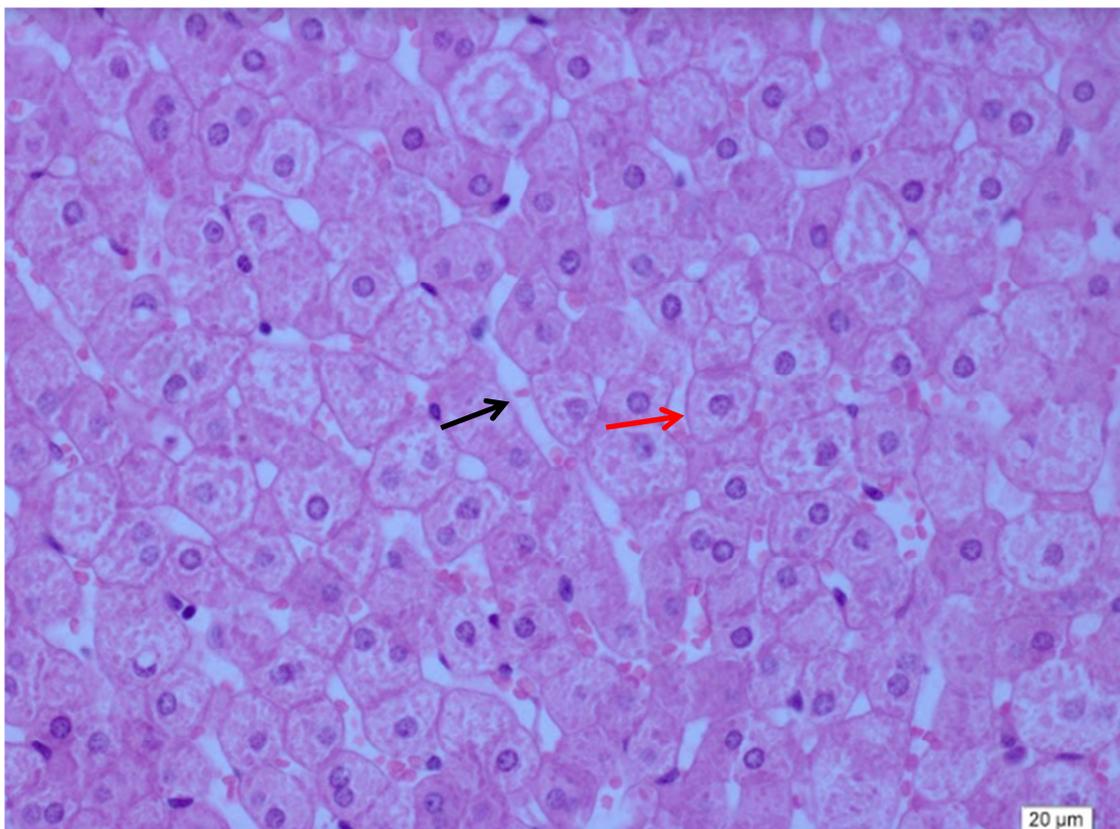


Fonte: O autor (2019).

2.3.2 Variável primária

A avaliação histológica do fígado mostrou em todos os grupos arquitetura normal no parênquima hepático. Com ausência de infiltrado leucocitário nos lóbulos (figura 11), espaço porta (figura 12) e veia central (figura 13). Também não houve nenhuma alteração no diâmetro e aparência da veia central e espaço porta (figuras 12 e 13).

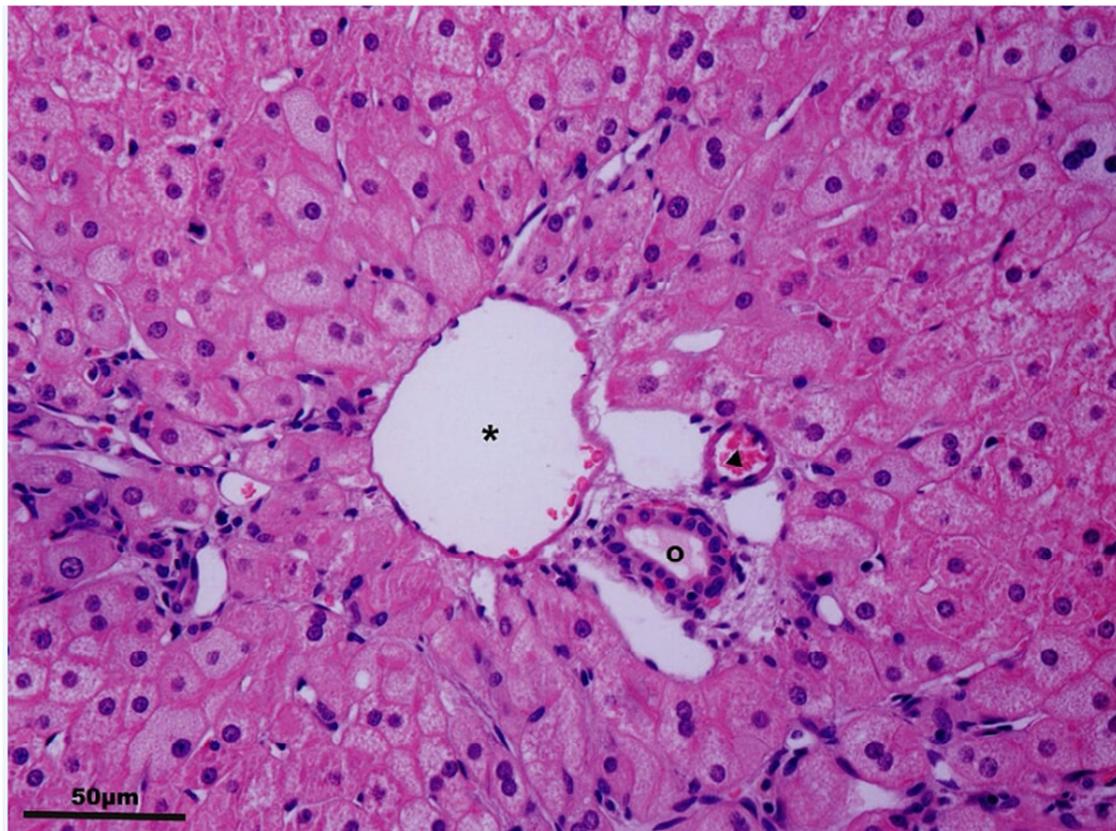
Figura 11 - Hepatócitos normais.



Fonte: O autor (2019).

Notas: Fotomicrografia de um lóbulo hepático, onde podem ser observados hepatócitos normais (seta vermelha) entremeados por capilares sinusoides (seta preta). Grupo controle negativo (SF). Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

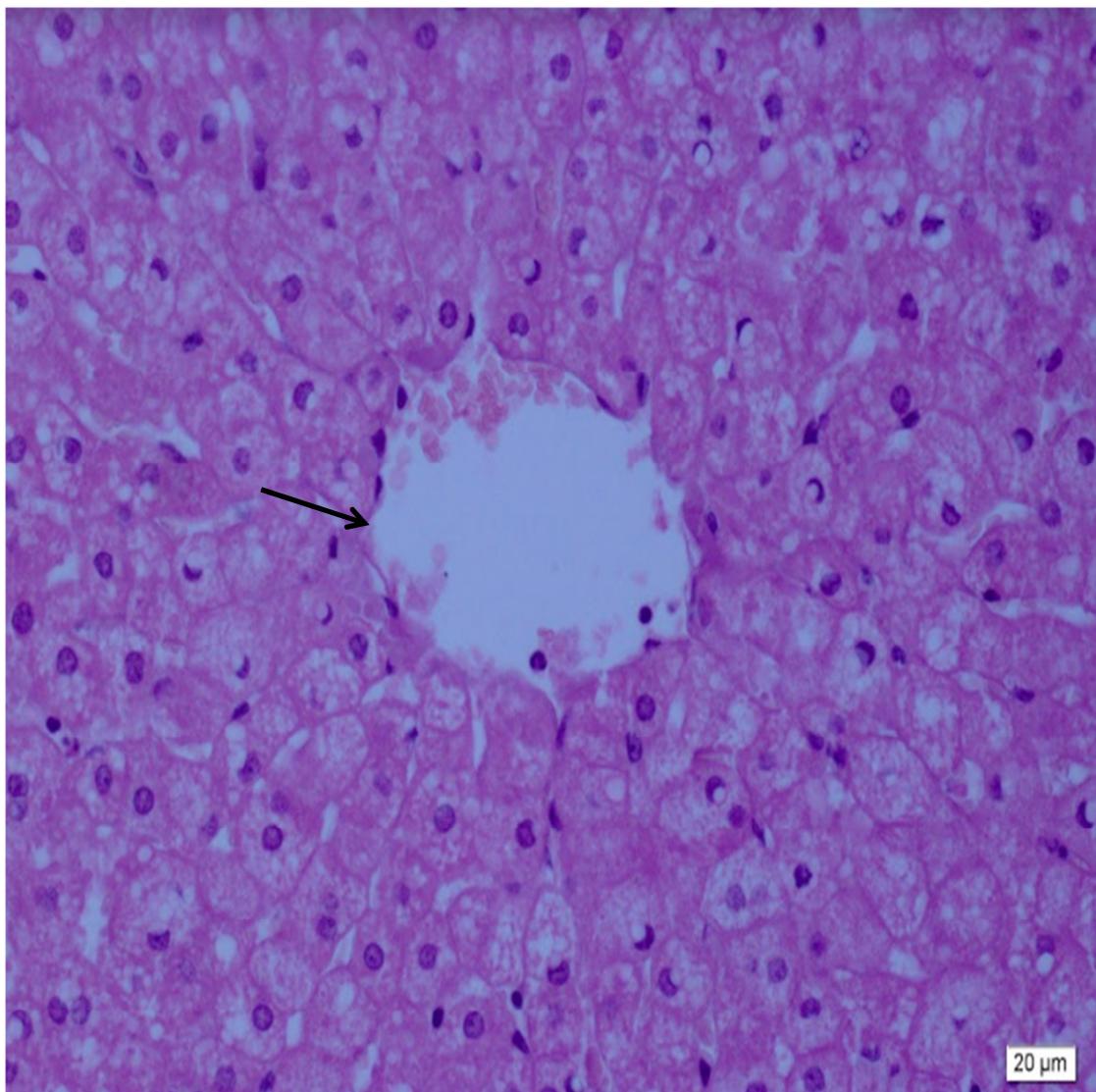
Figura 12 - Espaço porta sem alterações inflamatórias.



Fonte: O autor (2019).

Notas: Espaço porta com Espaço porta contendo ramo da artéria hepática (▲), ramo da veia porta (*) e ducto biliar (o). Grupo M400. Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

Figura 13 - Veia central.

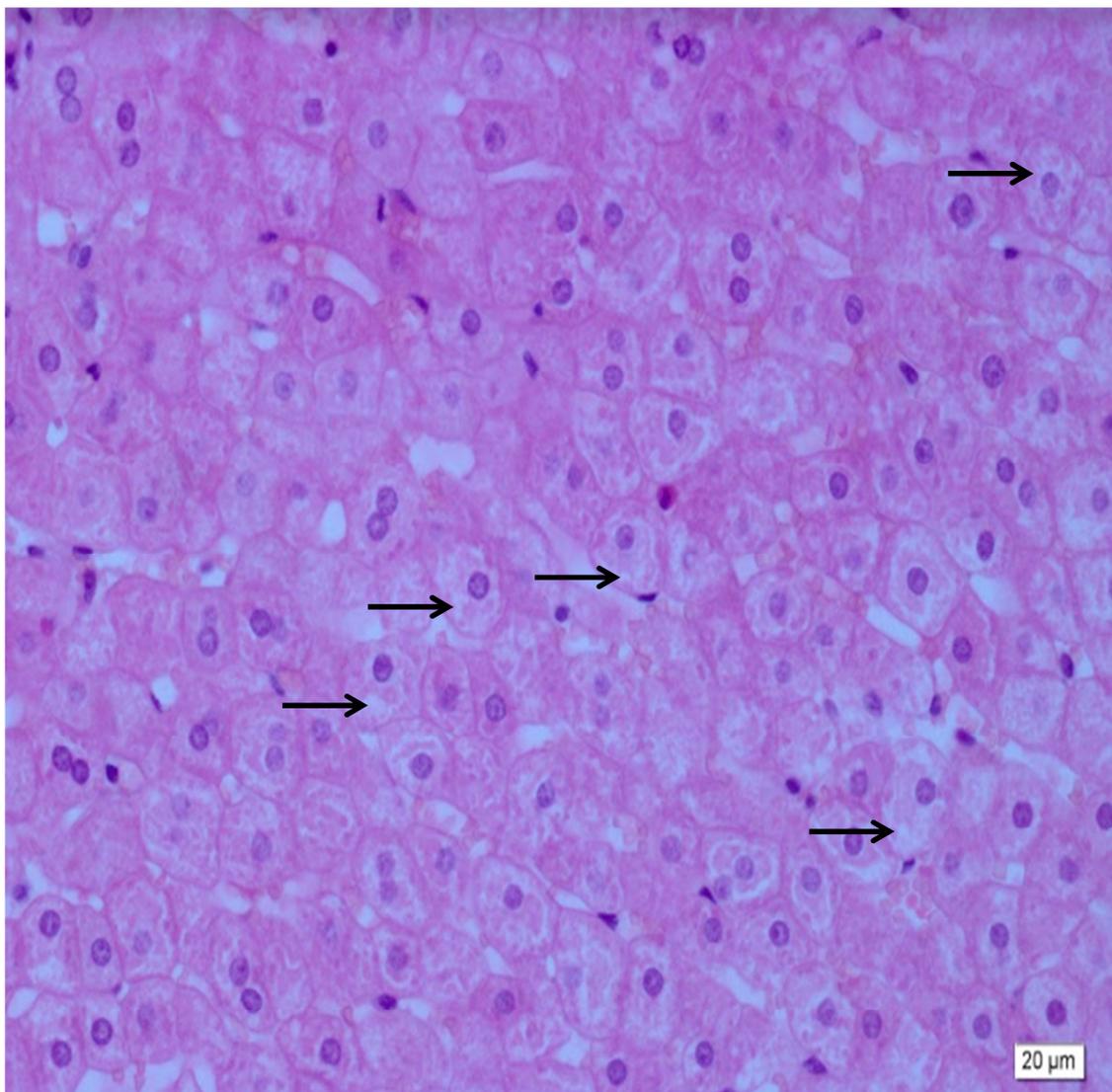


Fonte: O autor (2019).

Notas: Veia central (seta) sem alterações no diâmetro e aparência. Grupo M800. Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

Em todos os grupos foi observada a presença de algum grau de degeneração hidrópica, através de tumefação dos hepatócitos com áreas mais pálidas do citoplasma. No grupo SF apenas 14,3% dos animais apresentaram degeneração hidrópica, mesmo assim, em grau leve (figura 14). Já nos grupos experimentais M400 e M800, 83,3% e 80% dos animais, respectivamente, apresentaram esse tipo de degeneração, inclusive na forma moderada (figura 15). No grupo M1600 50% dos animais apresentaram degeneração hidrópica, no entanto, apenas leve.

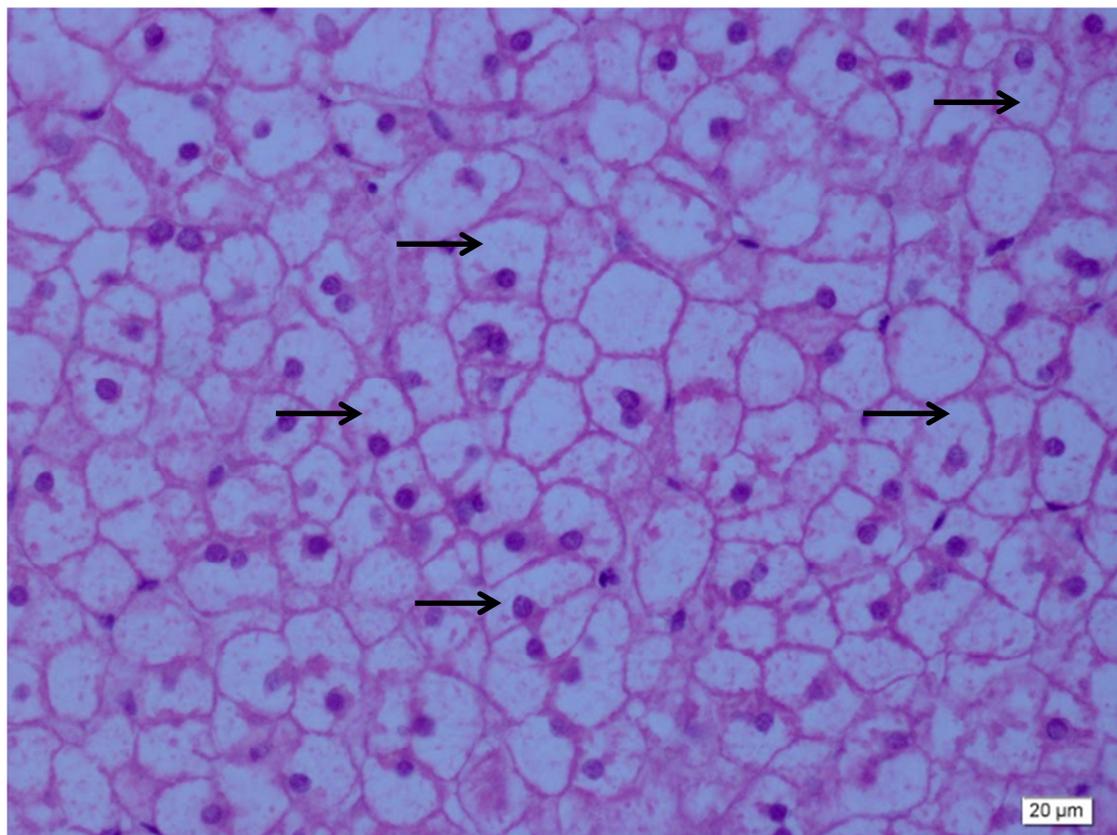
Figura 14 - Degeneração leve.



Fonte: O autor (2019).

Notas: Hepatócitos apresentando degeneração hidrópica leve, caracterizada por tumefação dos hepatócitos com áreas mais pálidas do citoplasma em grau leve (setas). Grupo M1600. Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

Figura 15 - Degeneração hidrópica moderada.



Fonte: O autor (2019).

Notas: Hepatócitos apresentando degeneração hidrópica moderada, caracterizada por tumefação dos hepatócitos com áreas mais pálidas do citoplasma em grau moderado (setas), apresentando distorção arquitetural dos cordões hepatocitários com compressão dos sinusoides. Grupo M800. Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da avaliação histológica do fígado segundo o grupo. A média e a mediana correspondentemente mais elevadas ocorreram no grupo M800 (1,60 e 2,00), seguida do grupo M400 (1,17 e 1,00), a menos elevada ocorreu no grupo controle negativo (0,14 e 0,00). O teste de Kruskal-Wallis indicou diferença significativa entre os grupos e as comparações múltiplas do referido teste mostraram diferenças significativas entre o grupo controle dos grupos M400 e M800 e do grupo M800 do grupo M1600.

Tabela 1 – Análise estatística da avaliação histológica do fígado.

Grupo	Negativo n	+	++	Total n	Média	Mediana	P25; P75
Soro fisiológico (Controle negativo) ^(A)	6	1	-	7	0,14	0,00	0,00; 0,00
Extrato dose M400 mg/kg/dia ^(BC)	1	3	2	6	1,17	1,00	0,75; 2,00
Extrato dose M800 mg/kg/dia ^(B)	1	-	4	5	1,60	2,00	1,00; 2,00
Extrato dose M1600 mg/kg/dia ^(AC)	3	3	-	6	0,50	0,50	0,00; 1,00
Valor de p	p ⁽¹⁾ = 0,016*						

Fonte: O autor (2019).

Notas: (*) Diferença significativa a 5%.

(+) Degeneração hidrópica leve.

(++) Degeneração hidrópica moderada.

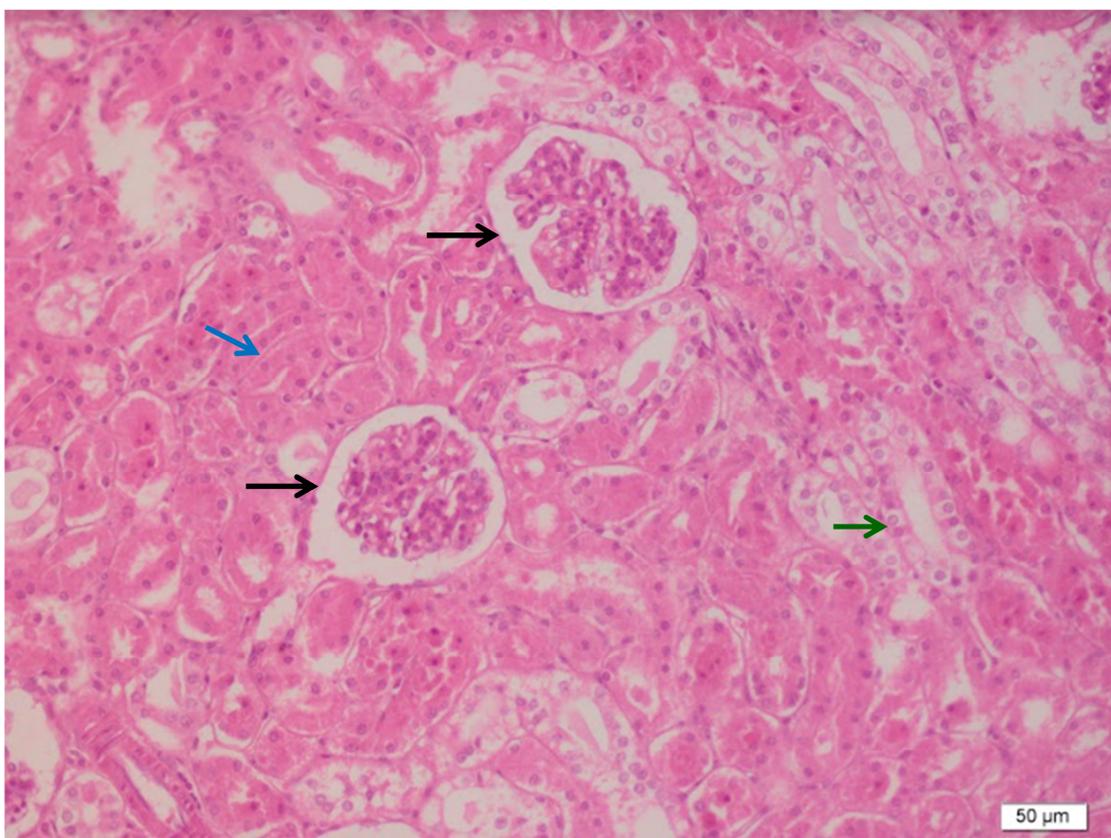
(1) Através do teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pareadas do referido teste.

2.3.3 Variáveis secundárias

2.3.3.1 Avaliação histológica dos rins

A análise histológica dos rins mostrou, tanto no grupo controle como nos grupos tratados com o extrato alcoólico das folhas de *Moringa oleifera*, conservação da estrutura renal normal (figura 16 e 17).

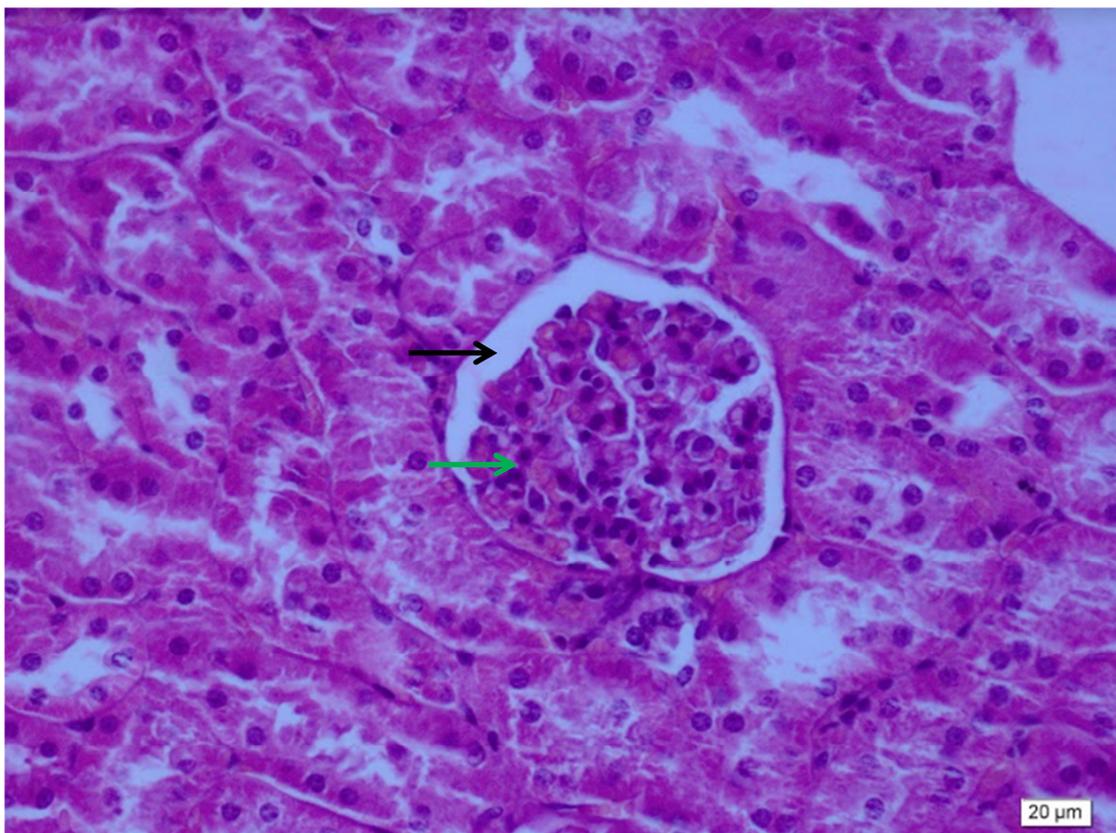
Figura 16 - Arquitetura normal do rim.



Fonte: O autor (2019).

Notas: Glomérulos (setas pretas); túbulo cortado proximal (seta azul); túbulo cortado distal (seta verde). Grupo M400. Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

Figura 17 - Glomérulo renal.



Fonte: O autor (2019).

Notas: Espaço de Bowman (seta preta); tufos capilares (seta verde). Grupo SF. Coloração: hematoxilina-eosina, aumento de 40x.

Alguns animais apresentaram inflamação renal leve, sendo: 14,3% no grupo SF, 16,6% no grupo M400 e 28,6% no grupo M1600. Não houve alterações no grupo M800. Não se verificou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos em relação a variável em estudo (tabela 2).

Tabela 2 – Análise estatística da avaliação histológica do rim.

Grupo	Com inflamação n	Normal	Total n
Soro fisiológico (Controle negativo)	1	6	7
Tratado extrato dose M400 mg/kg/dia	-	6	6
Tratado extrato dose M800 mg/kg/dia	1	4	5
Tratado extrato dose M1600 mg/kg/dia	1	5	6
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,875		

Fonte: O autor (2019).

Nota: (1) Através do teste Exato de Fisher.

2.3.3.2 Comparação do peso dos animais

As médias do peso dos animais variaram de 2864,29 (grupo soro fisiológico) a 3040,00 (grupo M400), sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (tabela 3). A variabilidade foi reduzida desde que os valores dos desvios padrão foram inferiores a 1/3 das médias correspondentes.

Tabela 3 – Estatística do peso (g) do animal segundo o grupo.

Grupo	Média	Estatística		P25; P75
		Desvio Padrão	Mediana	
Soro fisiológico (n = 7)	2864,29	533,82	2740,00	2540,00; 3290,00
Extrato dose M400 mg/kg/dia (n = 6)	3040,00	323,23	3110,00	2875,00; 3215,00
Extrato dose M800 mg/kg/dia (n = 5)	2946,00	700,16	3350,00	2185,00; 3505,00
Extrato dose M1600 mg/kg/dia (n = 6)	2946,00	509,18	2905,00	2535,00; 3547,00
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,946			

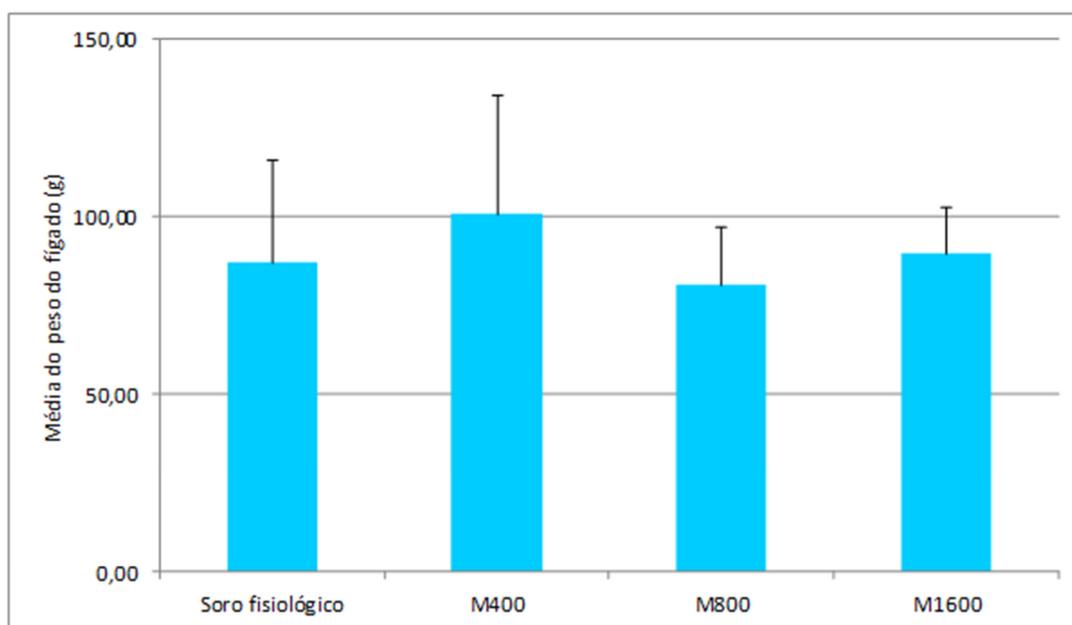
Fonte: O autor (2019).

Nota: (1) Através do teste F (ANOVA) com um fator.

2.3.3.3 Comparação do peso do fígado entre os grupos

Pode-se observar que as médias do peso do fígado variaram de 80,72 (grupo M800) a 100,76 (grupo M400) e para a margem de erro fixada (5%) não se comprova diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (figura 18). A variabilidade expressa através do desvio padrão não se mostrou elevada desde que as referidas medidas foram inferiores a metade das médias correspondentes.

Figura 18 - Média do peso do fígado dos animais.

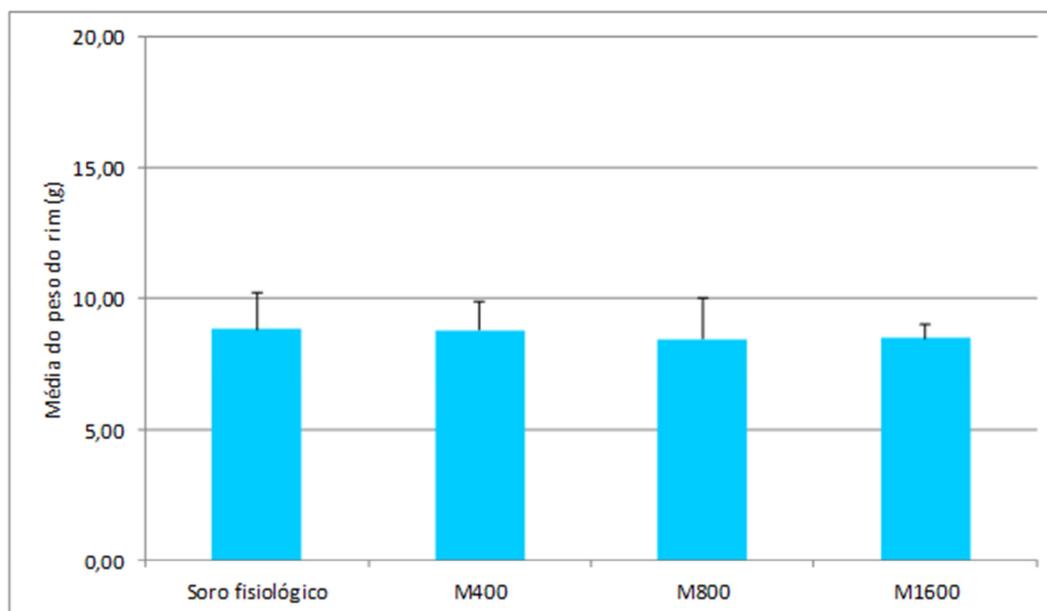


Fonte: O autor (2019).

2.3.3.4 Comparação do peso dos rins entre os grupos

Na figura 19 pode-se observar que as médias do peso do rim variaram de 8,47 (grupo M800) a 8,82 (grupo soro fisiológico) e não se comprova diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). A variabilidade foi reduzida (desvios padrão inferiores a 1/3 das médias correspondentes).

Figura 19: Média do peso dos rins dos animais.



Fonte: O autor (2019).

2.3.3.5 Avaliação da relação do peso do fígado com o peso do animal

As médias da relação peso do fígado/peso do animal variaram de 0,028 (Grupo soro fisiológico) a 0,035 (M400), sem diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). A variabilidade mais elevada ocorreu no grupo M400 conforme resultados apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Estatística da relação peso do fígado/peso do animal.

Grupo	Média	Estatística		
		Desvio padrão	Mediana	P25; P75
Soro fisiológico (n = 7)	0,030	0,007	0,029	0,026; 0,035
Extrato dose M400 mg/kg/dia (n = 6)	0,035	0,016	0,029	0,027; 0,042
Extrato dose M800 mg/kg/dia (n = 5)	0,028	0,002	0,028	0,026; 0,030
Extrato dose M1600 mg/kg/dia (n = 6)	0,031	0,005	0,032	0,026; 0,036
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,683			

Fonte: O autor (2019).

Nota: (1) Através do teste F (ANOVA) com um fator.

2.3.3.6 Avaliação da relação do peso do rim com o peso do animal.

As médias da relação peso do rim/peso do animal variaram de 0,0029 a 0,0031, sem diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). A variabilidade foi reduzida desde que os valores dos desvios padrão foram inferiores a 1/3 das médias correspondentes (tabela 5).

Tabela 5 - Relação peso do rim/peso do animal.

Grupo	Média	Estatística		
		Desvio padrão	Mediana	P25; P75
Soro fisiológico (n = 7)	0,0031	0,0004	0,0026	0,0027; 0,0034;
Extrato dose M400 mg/kg/dia (n = 6)	0,0029	0,0006	0,0028	0,0025; 0,0033
Extrato dose M800 mg/kg/dia (n = 5)	0,0029	0,0005	0,0031	0,0025; 0,0033
Extrato dose M1600 mg/kg/dia (n = 6)	0,0029	0,0004	0,0028	0,0026; 0,0033
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,859			

Fonte: O autor (2019).

Nota: (1) Através do teste F (ANOVA) com um fator.

2.4 Dados complementares

2.4.1 Caracterização fitoquímica do extrato de folhas de *Moringa oleifera*

Na análise fitoquímica do extrato etanólico de *Moringa oleifera* foi encontrado a presença de esteroides, taninos e flavonoides, conforme pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6: Caracterização fitoquímica do extrato de folhas de *Moringa oleifera*.

Classes de compostos orgânicos	Reagente revelador	Resultado
Alcaloides	Bouchardat Mayer Dragendorff Ácido sílico-tungstíco	Negativo
Esteroides	Lieberman-Buchard	Positivo
Taninos	Gelatina 0,5% FeCl ₃ 2%	Positivo
Flavonoides	Fita magnésio Fluorescência	Positivo
Saponinas	Espuma	Negativo

Fonte: O autor (2019).

2.5 Discussão

O efeito do extrato alcoólico das folhas de *Moringa oleifera* no tratamento da hiperplasia miointimal já vem sendo estudado, não tendo demonstrado efeito terapêutico na diminuição da hiperplasia miointimal na dose de 200 mg/Kg/dia (ROLIM et al., 2016), no entanto esse efeito foi obtido na dose de 400 mg/Kg/dia (PORDEUS, 2019, no prelo). Dessa forma, foi observada a importância de avaliar se o extrato na concentração terapêutica utilizada para a diminuição da hiperplasia miointimal provoca alterações histológicas hepáticas e renais, já que a lesão hepática induzida por drogas representa uma das razões mais frequentemente citadas para a não aprovação de drogas, suspensão, abandono e ações regulatórias pós-comercialização (NATHWANI; KAPLOWITZ, 2006; KAPLOWITZ et al., 2015). O uso de medicamentos à base de plantas é relativamente seguro (JEONG et al., 2012), no entanto existem muitos relatos indicando efeitos adversos (AWODELE et al., 2012).

Além da dose de 400 mg/Kg/dia, que apresentou efeito terapêutico para hiperplasia miointimal, foram utilizadas, nesse estudo, também, doses maiores, de 800 mg/Kg/dia e 1600 mg/Kg/dia, a fim de avaliar se essas doses provocariam alterações tóxicas nos órgãos alvo do estudo. A dose de 1600 mg/Kg/dia foi escolhida com base na dose letal de 50% (DL50) de 1.585 mg/Kg/dia estabelecida em um estudo em ratos (AWODELE et al., 2012), pela falta de referência da dose letal em estudos utilizando coelhos.

O coelho foi escolhido por ser um modelo animal muito utilizado para avaliação da hiperplasia miointimal (GELLMAN et al., 1991; ASADA et al., 1996; 2010; NOGUEIRA et al., 2012; BANDEIRA, 2015; ROLIM et al., 2016; LIMA et al., 2016), tendo sido demonstrado que a hiperplasia que ocorre em coelhos é similar à que ocorre em artéria coronárias humanas (TAKAGI et al., 1997), de modo que o estudo foi realizado no intuito da descoberta de uma droga que possa ser usada em humanos para diminuir a hiperplasia miointimal e que ao mesmo tempo seja segura.

O rápido aumento no consumo de medicamentos à base de plantas em todo o mundo tem sido estimulado por muitos fatores, incluindo a noção de que todos esses produtos são seguros e efetivos (AWODELE et al., 2012), no entanto podem representar sério risco à saúde (ALASTAIR; WOOD, 2002), pois frequentemente as doses não são

quantificadas e os efeitos tóxicos são largamente desconhecidos (Galati; O'Brien, 2004). Dessa forma, é importante avaliar se o extrato alcoólico das folhas de *Moringa oleifera* que se mostrou efetivo na diminuição da hiperplasia miointimal não provoca alterações hepáticas e nem renais que tornem o seu uso seguro. O estudo contribui para a segurança do uso da *Moringa oleifera* com potencial terapêutico.

A preocupação em se avaliar fígado foi devido ao fato de que ele é o primeiro órgão de detoxificação de drogas e a estrutura do fígado pode ser prejudicialmente alterada devido à exposição a substâncias tóxicas (AL-ATTAR, 2011). O rim também foi avaliado, devido sua importante função na excreção drogas (LEGALLAIS et al., 2018), sendo o uso de drogas durante um longo período de tempo, uma das principais causas de nefropatia (PORTILLA, 2013).

Muitos trabalhos utilizaram a histologia para avaliar a toxicidade de drogas em órgãos como fígado e rim (KIM et al., 2018; DA LUZ et al., 2015; NIGATU et al., 2017; FARID; HEGAZY, 2019; MOHAMED; ABD-ELHAKIM; FAROUK, 2016), sendo, dessa forma, uma metodologia bastante aceita.

No presente estudo não foram encontradas alterações inflamatórias e nem necrose no fígado, apenas degeneração hidrópica, onde foram observadas diferenças significativas entre os grupos M400 e M800 em relação ao grupo controle e entre o grupo M1600 em relação ao M800. A degeneração hidrópica é o resultado de um desequilíbrio eletrolítico e acúmulo de água no citoplasma (ABDELHALIM; JARRA et al., 2011), caracterizando-se como uma lesão celular reversível, podendo ser causada por agentes físicos, químicos ou biológicos, sendo a lesão não letal mais frequente. Como se trata de lesão reversível, eliminada a causa, as células voltam ao aspecto normal. A degeneração hidrópica sozinha, quase sempre, não leva a consequências funcionais (BRASILEIRO FILHO, 2018).

O tratamento utilizado na dose de 1.600 mg/Kg/dia do extrato das folhas de *Moringa oleifera* foi o que provocou um menor grau de degeneração hidrópica no fígado. Seria interessante estudos para avaliar a dose de 1.600 mg/Kg/dia no tratamento da hiperplasia miointimal.

Um outro estudo que utilizou o extrato aquoso oralmente com algumas das doses semelhantes às utilizadas nesse estudo, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg e 1500 mg/Kg, o extrato mostrou-se relativamente seguro, não provocando destruição da arquitetura renal e nem destruição dos hepatócitos e da arquitetura hepática. O extrato provocou apenas congestão sinusoidal leve, no entanto, foi utilizado por um período de tempo de 60 dias, sendo um maior que no nosso estudo (AWODELE et al., 2012).

O uso de dieta hipercolesterolêmica por 5 semanas provocou degeneração hidrópica e lipídica em fígado de coelhos (HAKIMOGLU ET AL., 2007), o que leva a suspeitar que a degeneração hidrópica encontrada na presente pesquisa possa ser devido ao uso da gema de ovo e não do extrato de Moringa. Além disso, alguns trabalhos mostram a atividade hepatoprotetora das folhas de *Moringa oleifera* (STOHS, 2015).

O extrato das folhas de *Moringa oleifera* em etanol a 70%, usado na dose de 300 mg/Kg (via oral) em ratos Wistar durante 2 semanas, melhorou a disfunção hepática induzida por levofloxacino recuperando a atividade das enzimas hepáticas: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e GGT (gama glutamil transferase) para os níveis normais (FARIG; HEGAZI, 2019). O extrato hidroetanólico (etanol a 80%) das folhas administrado nas doses de 200 mg/Kg e 400 mg/Kg, por via intraperitoneal, reduziu significativamente o dano hepático induzido por acetaminofeno diminuindo os níveis de ALT em ratos (FAKURAZI et al., 2008). O extrato etanólico (etanol a 95%) reduziu o dano hepático induzido por drogas antituberculose (isoniazida, rifampicina e pirazinamida), diminuindo significativamente as alterações histológicas em ratos tratados por 45 dias nas doses de 150, 200 e 250 mg/Kg (PARI; KUMAR, 2002). Folhas de *M. oleifera* foram usadas como suplementação na dieta durante 21 dias nas concentrações de 5%, 10% e 15%, diminuindo o dano hepático induzido por níquel, restaurando a arquitetura celular e a integridade do fígado de ratos Wistar (STEPHEN; SOKOLAYEMJI; ADEWUMI, 2017). A suplementação do pó das folhas de *Moringa oleifera* na dose de 50 mg/Kg em camundongos albinos da linhagem Swiss reduziu a hepatotoxicidade induzida por arsênico (SHEIKH et al., 2014). A suplementação de *Moringa oleifera*, 500 mg/Kg (oral), em ratos Wistar durante 28 dias apresentou efeito protetor contra hepatotoxicidade induzida por cádmio (TOPPO et al., 2015). O uso de folhas em altas doses na dieta (15g de Moringa por 100g de peso) durante 6 semanas

diminuiu o grau de esteatose e acúmulo de lipídeos no fígado de cobaias (ALMATRAFI et al., 2017).

A atividade hepatoprotetora da *Moringa* deve-se provavelmente a presença de quercetina (ANWAR et al., 2007), pertencente à classe dos flavonoides (SULTANA; ANWAR; 2007). A quercetina possui distribuição ubíqua na forma de glicosídeo ao qual é atribuído um grande número de efeitos terapêuticos (LAKHANPAL; RAI, 2007).

Não houve alterações histológicas estatisticamente significativas nos rins. Foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico (etanol a 80%) das folhas de *Moringa oleifera* na dose de 300 mg/Kg por 10 dias diminui o dano renal em coelhos tratados com gentamicina (OUÉDRAOGO et al., 2013).

Não houve diferença no peso dos animais entre os grupos, nem no peso do fígado e dos rins comparando o grupo controle com os grupos tratados. Não foi observado, também, diferença na relação peso do fígado/peso do animal e nem na relação peso do rim/peso do animal. A degeneração hidrópica observada no fígado dos animais não foi suficiente para alterar o peso dos animais e nem a relação do peso do órgão pelo peso do animal. Essa observação pode indicar que o extrato não alterou o metabolismo dos animais tratados o que poderia afetar subsequentemente os hormônios e o peso (CAJUDAY; POSCIDIO, 2010).

Vale ressaltar, ainda, que no extrato obtido não houve a presença de saponinas. As saponinas são tradicionalmente consideradas como fatores antinutricionais (THOMPSON, 1993) e, em alguns, casos seu uso é limitado devido ao seu sabor amargo (RIDOUT et al., 1991). O termo fator antinutricional tem sido usado para descrever compostos presentes em uma grande variedade de plantas que, quando consumidas, diminuem o seu valor nutricional, interferindo com a sua digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes, podendo causar efeitos nocivos a saúde se ingeridos em altas concentrações (LOPES et al., 2009; BENEVIDES et al., 2011).

Diante do exposto, ressalta-se a contribuição da pesquisa para a segurança de uso de uma preparação vegetal com potencial de uso terapêutico. Dessa forma, o extrato alcoólico das folhas de *Moringa oleifera* mostra-se promissor no tratamento da hiperplasia miointimal em humanos, já que apresenta efeito na diminuição da

hiperplasia miointimal e não provocou toxicidade hepática e nem renal a nível histológico como aqui demonstrado, diferente do que acontece com o uso do sirolimus e paclitaxel, que são os agentes mais utilizados com essa finalidade e eficácia comprovada, no entanto esses agentes são hepatotóxicos (KARPOVA et al., 2009; JACQUES et al., 2010). Além disso, há relato de nefrotoxicidade com o uso de paclitaxel (CHOUDHURY et al., 2017) e do aumento do risco de morte 2 anos após a aplicação de balão revestido com paclitaxel comparado ao grupo controle, reforçando a necessidade da descoberta de uma nova droga (KATSANOS et al., 2018).

3 CONCLUSÃO

Houve diferença estatisticamente significativa com relação à degeneração hidrópica no fígado, sendo maior nos grupos M400 e M800 em relação ao controle negativo e maior no grupo M800 em relação ao M1600. Não houve alteração histológica estatisticamente significativa nos rins.

REFERÊNCIAS

- ABDELHALIM, M. A.; JARRAR, B. M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. **Lipids Health Dis.**, n. 10, p. 166, 2011.
- ADEYEMI, O. S.; ELEBIYO, T. C. Moringa oleifera supplemented diets prevented nickel-induced nephrotoxicity in Wistar rats. **J. Nutri. Metab.**, 2014.
- ALASTAIR, J. J.; WOOD, M. D. Herbal remedies. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2046-2056, 2002.
- AL-ATTAR, A. M. Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. **Saudi J Biol Sci.**, n. 18, p. 395-401, 2011.
- 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.
- 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, p. 6558-6563, 2003.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.
- ASADA Y, KISANUKI A, TSUNEYOSHI A, MARUTSUKA K, HATAKEYAMA K, SUMIYOSHI A. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 45-53, 1996.
- AWODELE, O.; OREAGBA, I. A.; ODOMA, S.; DA SILVA, J. A.; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). **J Ethnopharmacol.**, v. 139, n. 2, p. 330-336, 2012.
- AXEL, D. I.; KUNERT, W.; GÖGGELMANN, C.; OBERHOFF, M.; HERDEG, C.; KÜTTNER, A.; WILD, D. H.; BREHM, B. R.; RIESSEN, R.; KÖVEKER, G.; KARSCH, K. R. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. **Circulation**. v. 96, n. 2, p. 636-645, 1997.
- BADAWI, M. S. Histological study of the protective role of ginger on piroxicam-induced liver toxicity in mice. **J Chin Med Assoc.**, v. 82, p. 1, p. 11-18, 2019.

- BANDEIRA, Francisco Chavier Vieira. Estudo comparativo da *Moringa oleifera* com cilostazol no tratamento da hiperplasia miointimal em artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose. 2015. 126f. Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2015.
- BARRET, Kim E.; BARMAN, Susan M.; BOIOTANO, Scott; BROOKS, Heddwen L. Fisiologia médica de Ganong [recurso eletrônico] 24. ed., **AMGH Editora LTDA**, 2014.
- BENEVIDES, C. M. J., SOUZA, M. V., SOUZA, R. D. B., LOPES, M. V. (2011) Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2. p. 67-79, 2011.
- BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo - Patologia Geral**. 6. ed. - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2018.
- BRITO, Carlos José; DUQUE, Alberto; MERLO, Ivanésio; ROSSI, Murilo; FONSECA FILHO, Vasco Lauria. Cirurgia Vascular, Cirurgia Endovascular, Angiologia. 2º edição. Volume 1. 2008
- CÁCERES, A. et al. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 233-237, jun. 1992.
- CAJUDAY, A.L., POSCIDIO, L.G. Effects of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) on the reproduction of male mice (*Mus musculus*). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 12, p. 1115–1121, 2010.
- CARAMORI, P. R.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Postangioplasty restenosis. Physiopathogeny. **Arq Bras Cardiol.**, v. 69, n. 2, p. 141-150, 1997.
- CHOUDHURY, H.; GORAIN, B.; TEKADE, R. K.; PANDEY, M.; KARMAKAR, S.; PAL, T. K. Safety against nephrotoxicity in paclitaxel treatment: Oral nanocarrier as an effective tool in preclinical evaluation with marked in vivo antitumor activity. **Regul Toxicol Pharmacol.**, n. 91, p. 179-189, 2017.
- CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWAT, S.; PONGRAPEEPORN, K. U. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **J Ethnopharmacol.**, v. 116, n. 3, p. 439-46, 2008.
- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.
- DA LUZ, S. C.; DAUBERMANN, M. F.; THOMÉ, G. R.; DOS SANTOS, M. M.; RAMOS, A.; TORRES, SALAZAR G.; DA ROCHA, J. B.; BARBOSA, N. V. Diphenyl ditelluride intoxication triggers histological changes in liver, kidney, and lung of mice. **Anal Cell Pathol (Amst)**, 2015.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 12, p. 1744–1756, 15 set. 2000.

DINIS, GAMA A. New trends in the prevention of myointimal hyperplasia and anastomotic fibroplasia. **Rev Port Cir Cardiorac Vasc.**, v. 4, p. 211-215, 2007.

EFIONG, E. E.; IGILE, G. O.; MGBEJE, B. I. A. OUT, E. A.; EBONG, P. E. Hepatoprotective and anti-diabetic effect of extracts of *Moringa oleifera* and *Vernoniamygdalina* in streptozotocin-induced diabetic albino Wistar rats. **J. Diabetes Endocrinol.**, n. 4, p. 45-50, 2013.

ESTRELLA, M. C. P. et al. A double-blind, randomized controlled trial on the use of malunggay (*moringa oleifera*) for augmentation of the volume of breastmilk: among non-nursing of preterm infants. **Philippine Journal of Pediatrics**, v. 49, n. 1, p. 3-6., Jan-Mar. 2000.

EZEAMUZLE, I. C. et al. Antiinflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract . **International journal of pharmacognosy**, n. 34, p. 207-212, 1996.

FAIZI, S. et al. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 9, p. 1256-1261, sep. 1994.

FAIZI, S. et al. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. **Planta Medica**, n. 64, p. 225-228, 1998.

FAKURAZI, S.; HAIRUSZAH, I.; NATHINI, U. *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 2611–2615, 2008.

FAKURAZI, S.; SHARIFUDIN, S. A.; ARULSELVAN, P. *Moringa oleifera* hydroethanolic extracts effectively alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats through their antioxidant nature. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8334-8350, 2012.

FARID, A. S.; HEGAZY, A. M. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* leaf extract on levofloxacin-induced hepatic toxicity in rats. **Drug Chem Toxicol.**, 2019.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. D. A.; CARVALHO, A. D. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Rev. Nutri.**, n. 21, p. 431-337, 2008.

FUGLIE, L. J. The Miracle Tree: *Moringa oleifera* Natural Nutrition for the topics. **Church World Service**, Dakar, 1999.

FUKE, S. et al. Impaired endothelial vasomotor function after sirolimus-eluting stent implantation. **Circulation Journal**, v. 71, n. 2, p. 220-225, feb. 2007.

- GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004 Aug 1;37(3):287-303.
- GARCÍA MARTÍNEZ, J. J.; BENDJELID, K. Artificial liver support systems: what is new over the last decade? *Ann Intensive Care*, v. 8, n. 1, p.109, 2018.
- GELLMAN, J.; EZEKOWITZ, M. D.; SAREMBOCK, I. J.; AZRIN, M. A.; NOCHOMOWITZ, L. E.; LERNER, E. et al. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol.*, v. 17, n. 1, p. 251–259, 1991.
- GELMON, K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet*, v. 344, p. 1267-1272, 1994.
- GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 69, p. 21-25, 2000.
- GHOSH, J.; MURPHY, M. O.; TURNER, N. et al. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol*, n. 14, p. 28-36, 2005.
- GUEVARA, A. P. et al. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research*, v. 440, n. 2, p. 181-188, 6 apr. 1999.
- GUPTA, R. et al. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of Diabetes*, v. 4, n. 2, p.164-171, 2012.
- GRÜNTZIG, A. Zur perkutanen Behandlung atherosklerotischer Stenosen mit dem Dilatationskatheter. In: Blümchen G, editor. Beiträge zur Geschichte der Kardiologie. Roderbirken: Roderbirken Hospital (1979). p. 245–53.
- HAKIMOĞLU, F.; KIZIL, G.; KANAY, Z.; KIZIL, M.; ISI, H. The effect of ethanol extract of *Hypericum lysimachioides* on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its in vitro antioxidant activity. *Atherosclerosis.*, v. 192, n. 1, p. 113-122, 2007.
- HAMEL, F.; GRONDIN, M.; DENIZEAU, F.; AVERILL-BATES DA, SARHAN F. Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng.* v. 95, n. 4, p. 661-670, 2006.
- HANSRANI, M.; GILLESPIE, J. I.; STANSBY, G. Homocysteine in myointimal hiperplasia. *Eur J Endovasc Surg*, n. 23, p. 3-10, 2002.
- HIJMANS, B. S.; GREFFHORST, A.; OOSTERVEER, M. H.; GROEN, A. K.; Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie*, n. 96, p. 121-129, 2014.
- IORGA, A.; DARA, L.; KAPLOWITZ, N. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int J Mol Sci.*, v. 18, n. 5, 2017.

JACQUES, J.; DICKSON, Z.; CARRIER, P.; ESSIG, M.; GUILLAUDEAU, A.; LACOUR, C.; BOCQUENTIN, F.; ALDIGIER, J. C.; REROLLE, J. P. Severe sirulimus-induced acute hepatitis in a renal transplant recipient. **Tranpl. Int**, v. 23, n. 9, p. 967-970, 2010.

JAIN, P. G.; PATIL, S. D.; HASWANI, N. G.; GIRASE, M. V.; SURANA, S. J. Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 969-973, 2010.

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

JEONG, T. Y.; PARK, B. K.; CHO, J. H.; KIM, Y. I.; AHN, Y. C.; SON, C. G. A prospective study on the safety of herbal medicines, used alone or with conventional medicines. **J Ethnopharmacol.**, v. 143, n. 3, p. 884-888, 2012.

JOHN, S.; SCHLAICH, M.; LANGENFELD, M.; WEIHPRECHT, H.; SCMITZ, G.; WEIDINGER, G.; SCHMIEDER, R. E. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients : a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Circulation**, n. 98, v. 3, p. 211-216, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 13. ed. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2018.

KARPOVA, G. V.; FORMINA, T. I.; VETOSHKINA, T. V.; DUBSKAIA, T. I. U.; ERMOLAEVA, L. A.; CHURIN, A. A. Hepatotoxic of antineoplastic agents. **Vestn Ross Akad Med Nauk**, n. 11, p. 17-20, 2009.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 489-499, 2005.

KAPLOWITZ, N. et al. Targeting signal transduction pathways which regulate necrosis in acetaminophen hepatotoxicity. **Journal of Hepatology**, v. 63, p. 5-7, 2015.

KATSANOS, K; SPILIOPOULOS, S; KITROU, P; KROKIDIS, M; KARNABATIDIS, D. Risk of Death Following Application of Paclitaxel-Coated Balloons and Stents in the Femoropopliteal Artery of the Leg: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **J Am Heart Assoc.**, v. 7, n. 24, 2018.

KITAMOTO, S.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. **J Pharmacol Sci.**, v. 91, n. 3, p. 192-196, 2003.

KIM, Y.; JAJA-CHIMEDZA, A.; MERRILL, D.; MENDES, O.; RASKIN, I. A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from *Moringa oleifera* Lam. seeds in rats. **Toxicol Rep.**, n. 5, p. 418-426, 2018.

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

- KUMAR, P. S. et al. Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. **International Journal of Phytomedicine**, v. 2, p. 210-216, 2010.
- KUNTZ, R. E.; BAIM, D. S. Prevention of coronary restenosis : the evolving evidence base for radiation therapy. **Circulation**, v. 101, n. 18, p. 2130-2133, 2000.
- LAKHANPAL, P.; RAI, D. K. Quercetin: a versatile flavonoid. **Internet J Med Update**, v. 2, n. 2, p. 22–37, 2007.
- LEGALLAIS, C.; KIM, D.; MIHAILA, S. M.; MIHAJLOVIC, M.; FIGLIUZZI, M.; BONANDRINI, B.; SALERNO, S.; YOUSEF, Y. F. A.; ROOKMAAKER, M. B.; SANCHEZ, R. N.; SAINZ-ARNAL, P.; PEREIRA, U.; PASQUA, M.; GERRITSEN, K. G. F.; VERHAAR, M. C.; REMUZZI, A.; BAPTISTA, P. M.; DE BARTOLO, L.; MASEREEUW, R.; STAMATIALIS, D. Bioengineering Organs for Blood Detoxification. **Adv Healthc Mater.**, v. 7, n. 21, 2018.
- LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. **Int J Mol Sci.**, v. 16, n. 6, p. 12791-12835, 2015.
- LI, P. Z.; LI, J. Z.; LI, M.; GONG, J. P.; HE, K. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells. **Immunol. Lett.**, n. 158, p. 52–56, 2014.
- LIAO, P. C.; LAI, M. H.; HSU, K. P.; KUO, Y. H.; CHEN, .,; TSAI, M. C.; LI, C. X.; YIN, X. J.; JEYASHOKE, N.; CHAO, L. K. Identification of β -Sitosterol as in Vitro Anti-Inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. **J Agric Food Chem.**, v. 66, n. 41, p. 10748-10759, 2018.
- LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 4565-4605, 2006.
- LIMA, P. R. S. et al. *Allium sativum* Compared to Cilostazol as an Inhibitor of Myointimal Hyperplasia. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 31, n. 4, p. 291-299, 2016.
- LIU, M. W.; ROUBIN, G.S.; KING, S. B. Restenosis after coronary angioplasty potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. **Circulation**, v. 79, n. 6, p. 1374-1387, jun. 1989.
- LIUZZO, J. P.; AMBROSE, J. A.; COPPOLA, J. T. Sirolimus- and taxol-eluting stents differ towards intimal hyperplasia and re-endothelialization. **J. Invasive Cardiol.**, n. 17, p. 497–502, 2005.
- LL'INSKAIA, O. P. et al. A new concept of development of neointimal hyperplasia. **Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I.M. Sechenova**, v. 90, n. 10, p. 1203-1214, oct. 2004.

LOPES, C. O.; DESSIMONI, G. V.; DA SILVA, M. C.; VIEIRA, G.; PINTO, N. A. V. D. Aproveitamento, composição nutricional e antinutricional da farinha de quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 669-675, 2009.

MARTIN, C.; MARTIN, G.; GARCIA, A.; FERNÁNDEZ, T.; HERNÁNDEZ, E.; PULS, L. Potential applications of *Moringa oleifera*. A critical Review. **Pastosy Forrajes**, n. 36, p. 150-158, 2013.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C. L.; MARTÍNEZ, L.; MARTÍNEZ-ORTIZ, E. J.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; VENTURA-MARTÍNEZ, R. *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, n. 87, p. 482-488, 2017.

METHA, L. K. et al. Effects Of fruits of *Moringa Oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 191-195, 2003.

MODAK, B.; GORAI, P.; DHAN, R.; MUKHERJEE, A. Tradition in treating taboo: Folkloric medicinal wisdom of the aboriginals of Purulia district, West Bengal, India against sexual, gynaecological and related disorders. **J. Ethnopharmacol.**, n. 169, p. 370–386, 2015.

MOHAMED, W. A.; ABD-ELHAKIM, Y. M.; FAROUK, S. M. Protective effects of ethanolic extract of rosemary against lead-induced hepato-renal damage in rabbits. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 68, n. 8, p. 451-61, 2016.

MORSIANI, C.; BACALINI, M. G.; SANTORO, A.; GARAGNANI, P.; COLLURA, S.; D'ERRICO, A.; DE EGUILEOR, M.; GRAZI, G. L.; CESCO, M.; FRANCESCHI, C.; CAPRI, M. The peculiar aging of human liver: A geroscience perspective within transplant context. **Ageing Res Rev.**, n. 51, p. 24-34, 2019.

MORTON, J. F. The horseradish tree, *Moringa pterigosperma* (*Moringaceae*). A boon to arid lands. **Economic Botany**, v. 45, p. 318-333, 1991.

MOTAMEDI, N. D. L.; KAPLOWITZ, N. Clinical considerations of drug-induced hepatotoxicity. **In Comprehensive Toxicology**, 3rd ed.; McQueen, C., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017.

MUGHAL, M. H. et al. Improvement of drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) - a unique source of food and medicine through tissue culture. **Hamdard Medicus**, v. 42, p. 37-42, 1999.

MURAKAMI A. et al. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p 319-323, May. 1998.

MURPHY, M. O; GHOSH, J.; HALKA, A.; CARTER, A.; TURNER, N.; FERGUSON, M. W. J.; KIELTY, C. M.; WALKER, M. G. In vivo attenuation of myointimal hiperplasia using transforming growth factor-beta-3 in an interposition graft model. **J Endovasc Ther**, n. 13, p. 389-399, 2006.

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

NATHWANI, R. A.; KAPLOWITZ, N. Drug hepatotoxicity. **Clinical Liver Disease**. v. 10, p. 207-217, 2006.

NIGATU, T. A.; AFEWORK, M.; URGA, K.; ERGETE, W.; MAKONNEN, E. Toxicological investigation of acute and chronic treatment with *Gnidia stenophylla* Gilg root extract on some blood parameters and histopathology of spleen, liver and kidney in mice. **BMC Res Notes**., v. 10, n. 1, p. 625, 2017.

NOGUEIRA, M.R. S. Diferença da média de hiperplasia médio-intimal pós angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com extrato seco de *Curcuma longa*. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

OMODASINI, E. I.; ABOUA, Y. G.; CHEGOU, N. N.; OGUNTIBEJU, O.O. Hepatoprotective, Antihyperlipidemic, and Anti-inflammatory Activity of *Moringa oleifera* in Diabetic-induced Damage in Male Wistar Rats. **Pharmacognosy Res.**, v. 9, n. (2), p. 182-187, 2017.

PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, H. An overview of the medicinal importance of *Moringaceae*. **J. Med. Plants Res.**, n. 6, p. 5831-5839, 2012.

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

PARI, L.; KUMAR, N. A. Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats. **J Med Food**, n. 5, p. 171–177, 2002.

PARROTA, J. A. Healing plants of peninsular india. **CABI Publication**, p. 528-530, 2001.

PORDEUS, M. A. A.; LIMA, P. R. S.; BANDEIRA, F. C. V.; ROLIM, J. C.; MANOEL NOGUEIRA, R. S; PITTA, G. B. B.; CASTRO, A. A.; PEREIRA, A. H. Difference in mean intimal hyperplasia thickness following iliac artery angioplasty in rabbits treated with different concentrations of an ethanolic extract of the *Moringa oleifera* leaf. 2019. No prelo.

PORTILLA, D; SAFAR, A. M.; SHANNON, M. L.; PENSON, R. T. in: P.M. Palevsky (Ed.), *Cisplatin Nephrotoxicity*, UpToDate, Waltham, MA : UpToDate, 2013.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, n. 3, p. 276-283, 1980.

- RAVICHANDIRAN, V.; SHANMUGAM, K.; ANUPAMA, K. THOMAS, S.; PRINCY, A. Structure-based virtual screening for plant-derived SdiA-selective ligands as potential antivirulent agents against uropathogenic *Escherichia coli*. **Eur J Med Chem.**, v. 48, p. 200-5, 2012.
- RIDOUT, C. L.; PRICE, K. R.; DUPONT, M. S.; PARKER, M. L.; FENWICK, G. R. Quinoa saponins-Analysis and preliminary investigations into the effects of reduction by processing. **J. Sci. Food Agric.**, v. 54, p. 165–176, 1991.
- ROLIM, L. A. D. M. M. et al. Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 53–58, 2011.
- ROLIM, J. C. et al. Hiperplasia miointimal na artéria ilíaca em coelhos submetidos à angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 28-34, 2016.
- ROSS, Michael H; PAWLINA, Wojciech. Histologia: texto e atlas. 7. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2018.
- RZUCIDLO, E. M.; MARTIN, K. A.; POWELL, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation, **J Vasc Surg**, n. 45, suppl A: A 25-32, 2007.
- SANTOS, J. A. B. D. Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*). Macéio, AL: UFA, 2008. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado, Universidade Federal de alagoas, 2008.
- SANTOS, A. F. S. et al. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* tissue extracts. **Phytotherapy Research**, v.26, p.1366-1370, 2012.
- SCHWARTZ, R. S.; HENRY, T. D. Pathophysiology of coronary artery restenosis. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v. 3, n. 5, p. 4-9, 2002.
- SCHWARTZ, R. S. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 19, n. 2, p. 267-274, feb. 1992.
- SELVAKUMAR, D; NATARAJAN, P. Hepato-protective activity of *Moringa oleifera* Lam leaves in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats, **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 13, 2008.
- SHEIKH, A.; YEASMIN, F.; AGARWAL, S.; RAHMAN, M.; ISLAM, K.; HOSSAIN, E.; HOSSAIN, S.; KARIM, M. R.; NIKKON, F.; SAUD, Z. A.; HOSSAIN, K. Protective effects of *Moringa oleifera* Lam. leaves against arsenic-induced toxicity in mice. **Asian Pac J Trop Biomed.**, n. 4, suppl 1, 2014.
- SINGH, D. Evaluation of Antioxidant and Hepatoprotective Activities of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats. **Antioxidants (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 569-591, 2 Sep. 2014.

SOMALI, M. A.; BAJNEDI, M. A.; AL-FAIMANI, S. S. Chemical composition and characteristics of *Moringa peregrina* seeds and seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, p.85-86, 1984.

SOUSA, J.E.; COSTA, M. A.; ABIZAID, A. C.; RENSING, B. J.; ABIZAID, A. S.; TANAJURA, L. F.; KOZUMA, K.; VAN LANGENHOVE, G.; SOUSA, A. G. FALOTICO, R.; JAEGER, J.; POPMA, J. J.; SERRUYS, P. W. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. **Circulation**, v. 104, n. 17, p.2007-2011, 2001.

SOUSA, J.E.; COSTA, M. A.; SOUSA, A. G.; ABIZAID, A. C.; SEIXAS, A. C.; ABIZAID, A. S.; FERES, F.; MATTOS, L. A.; FALOTICO, R.; JAEGER, J.; POPMA, J. J.; SERRUYS, P. W. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 381-3, 2003.

SOUSA, J. E.; SERRUYS, P. W.; COSTA, M. A. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part I. **Circulation**., v. 107, n. 17, p. 2274-2279, 2003a.

SOUSA, J. E.; SERRUYS, P. W.; COSTA, M. A. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part II. **Circulation**., v. 107, n. 18, p. 2383-2389, 2003b.

SOUZA, Aécio Flávio Meirelles. Toxicidade hepática de chás, ervas e fitoterápicos. Sociedade Brasileira de Hepatologia. Disponível em: <http://www.sbhepatologia.org.br/fasciculos/25.pdf>. Acesso em: 26/03/2019.

STEPHEN, A. O.; SOKOLAYEMJI, A. C.; ADEWUMI, A. M. Moringa oleifera-based diet protects against nickel-induced hepatotoxicity in rats. **J Biomed Res.**, v. 31, n. 4, p. 350-357, 2017.

STICKEL, F.; SCHUPPAN, D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases, **Dig. Liver Dis.**, n. 39, p. 293–304, 2007.

STOHS, S. J.; HARTMAN, M. J. Review of the Safety and Efficacy of Moringa oleifera. **Phytother Res.**, v. 29, n. 6, p. 796-804, 2015 .

STUBBENDORFF, M.; HUA, X.; DEUSE, T.; ALI, Z.; REICHENSPURNER, H.; MAEGDEFESSEL, L.; ROBBINS, R. C.; SCHREPFER, S. Inducing myointimal hyperplasia versus atherosclerosis in mice: an introduction of two valid models. **J. Vis. Exp.**, n. 87, 2014.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chem.** v. 108, n. 3, p. 879-884, 2008.

TAKAGI, M.; UEDA, M.; BECKER, A. E.; TAKEUCHI, K.; TAKEDA, T. The Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit is a suitable experimental model to study differences in tissue response between intimal and medial injury after balloon angioplasty. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 17, n. 12, p. 3611–3619, 1997.

TANABE, K.; REGAR, E.; LEE, C. H.; HOYE, A.; GIESSEN, W. J.; SERRUYS, P. W. Local Drug Delivery Using Coated Stents: New Developments and Future Perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 4, p. 357-367, 2004.

TASIOPOULOS, A. K.; GREISLER, H. P. Angiogenic mechanisms of endothelialization of cardiovascular implants: a review of recent investigative strategies. **J. Biomater. Sci., Polym. Ed.** 11:1275–1284, 2000.

TEN, D; HILL, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling, **Trends Biochem. Sci.**, v. 29, n. 5, p. 265-273, 2004.

THOMPSON, L.U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Res. Int.**, v. 26, p. 131–149, 1993.

TOPPO, R.; ROY, B. K.; GORA, R. H.; BAXLA, S. L.; KUMAR, P. Hepatoprotective activity of Moringa oleifera against cadmium toxicity in rats. **Vet World.**, v. 8, n. 4, p. 537-40, 2015.

TSAKNIS, J; LALAS, S. Stability during frying of Moringa oleifera seed oil variety “Periyakulam 1”. **J Food Comp Anal.** n. 15, p. 79-102, 2002).

UCHIMURA, N.; PERERA, G. B.; FUJITANI, R. M.; TOBIS, J. M.; ISHIMARU, S.; WILSON, S. E.; GORDON, I. L. Dose-dependent inhibition of myointimal hyperplasia by orally administered rapamycin. **Ann Vasc Surg.**, v. 18, n. 2, p. 172-177, 2004.

VANPUTTE, Cinnamon L.; REGAN, Jennifer L.; RUSSO, Andrew F.; SEELEY, Rod; STEPHENS, Trent; TATE, Philip. Anatomia e fisiologia de Seeley [recurso eletrônico]. 10. ed. – Porto Alegre: **AMGH**, 2016.

VATS, S.; GUPTA, T. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of Moringa oleifera Lam from Rajasthan, India. **Physiol Mol Biol Plants**, 2017.

VEGARA-JIMENEZ, M.; ALMATRAFI, M. M.; FENANDEZ, M. L. Bioactive components in Moringa oleifera leaves protect against chronic disease. **Antioxidants**, v. 6, n. 91, 2017.

VITA, J. A.; TREASURE, C. B.; NABEL, E. G.; MCLENACHAN, J. M.; FISH, R. D.; YEUNG, A. C.; VEKSHTEIN, V. I.; SELWYN, A. P.; GANZ, P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. **Circulation**, n. 81, v. 2, p. 491-497, 1990.

WAUGH, J.; WAGSTAFF, A. J. The paclitaxel (TAXUS)-eluting stent: a review of its use in the management of de novo coronary artery lesions. **Am J Cardiovascular Drugs**, v. 4, n. 4, p. 257-268, 2004.

WHO. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine (WHO/EDM/TRM/2000.1) Geneva: World Health Organization; 2000.

WHO. Health statistics and information systems. Disease burden and mortality estimates. Cause-specific mortality, 2000–2016. Global Summary Estimates. Disponível em: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/, Acesso em: 09/04/2019.

WU, J.; ZERN, M. A. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. **J Gastroenterol.**, v. 35, n. 9, p. 665-672, 2000.

WUANG, Y; LI, Y; ZHANG, L.; FANG, X. Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel-loaded pluronic p105 polymeric micelles. **Arch Pharm Res**, vol. 31, n.4, p. 530-538, 2008.

YUAN, L.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of drug-induced liver injury. **Clinical Liver Disease**, v. 17, p. 507-518, 2013.

ZAMORA, N. L. E.; AGUIRRE, V. J.; CHÁVEZ-TAPIA, N. C.; TORRE, A. Acute-on-chronic liver failure: a review. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 10, p. 295-303, 2014.

ANEXOS



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 004366 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: ANA AMANCIO SANTOS DA SILVA

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 05069555405

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua s j

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57040-510

País: Brasil

Telefone: 82991302000

Fax: 8291302000

Email: ana.amanciophysio@gmail.com

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: LUCÍOLA ABILIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIROS ROLIM

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 00983379475

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote
- Bairro: Maternidade

Cidade: PB

Estado: PB

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): STENT IMPREGNADO COM EXTRATO DE MORINGA OLEIFERA.

Utilidade (54):

Resumo: STENT IMPREGNADO COM EXTRATO DE MORINGA OLEIFERA.

Figura a publicar: 0

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: LUCÍOLA ABILIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIROS ROLIM

CPF: 00983379475

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote
- Bairro: Maternidade - Patos - Pb

Cidade: PB

Estado: PB

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 4

Nome: GUILHERME BENJAMIM BRANDÃO PITTA

CPF: 34764186420

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Desportista Humberto Guimaraes

Cidade: MACEIO

Estado: AL

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 4

Nome: JÂNIO CIPRIANO ROLIM

CPF: 87251230410

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote
- Bairro: Maternidade – Patos - Pb

Cidade: PB

Estado: PB

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 4

Nome: ANA AMANCIO SANTOS DA SILVA

CPF: 05069555405

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: R S J

Cidade: MACEIO

Estado: AL

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	RESUMO.pdf
Relatório Descritivo	RELATORIO DESCRITIVO.docx.pdf
Reivindicação	REINVIDICAÇÃO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante DE PAGTO.pdf
FQ1	FQ001.dados-1.pdf
Desenho	DESENHO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

RESUMO**“STENT IMPREGNADO COM EXTRATO DE MORINGA OLEIFERA”**

O stent impregnado com extrato de *Moringa oleifera* é invenção que se diferencia por apresentar uma impregnação no stent com extrato de folhas de *Moringa oleifera*. O stent é um dispositivo utilizado para desobstruir artérias estenosadas ou ocluídas por placas de ateroma, entretanto, este tratamento pode ser comprometido pela hiperplasia miointimal que diminui o lúmen vascular, levando a reestenose do vaso e a falha do tratamento. A impregnação com extrato das folhas de *Moringa oleifera* utiliza uma substância inovadora na prevenção/tratamento da hiperplasia miointimal, tem baixo custo, é livre de elementos sintéticos, possui efeito cicatrizante, antiinflamatório e antiaterosclerótico, sendo uma substância promissora para a prevenção/tratamento da hiperplasia miointimal.

A invenção diferencia-se por evitar inconvenientes como o alto custo de produção das substâncias utilizadas para impregnação, já que a Moringa é uma planta facilmente cultivada e sobrevive bem em locais de baixa pluviosidade, e ainda, por ser um produto natural, provavelmente, é mais bem tolerado pelo organismo, diminuindo o risco de efeitos colaterais.

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 3
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim
- 1.2 Qualificação: Farmacêutica-Bioquímica
- 1.3 CNPJ/CPF: 009833794-75
- 1.4 Endereço Completo: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote - Bairro: Maternidade
- 1.5 CEP: 58701380
- 1.6 Telefone: 83993086537
- 1.7 Fax:
- 1.8 E-mail: luciolajanio@yahoo.com.br

2. Depositante (71):

- 2.1 Nome: Guilherme Benjamin Brandão Pitta
- 2.2 Qualificação: Médico
- 2.3 CPF: 34764186420
- 2.4 Endereço: Rua Desportista Humberto Guimarães

3 Depositante (71):

- 3.1 Nome: Jânio Cipriano Rolim
- 3.2 Qualificação: Médico
- 3.3 CPF: 872512304-10
- 3.4 Endereço: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago – Quara 8 – Lote 3 – Bairro: Maternidade – Patos, PB.
- 3.5 CEP: 58701310

3.6 Telefone:83996860808

3.7 E-mail: janio_rolim@hotmail.com

4 Depositante (71):

4.1 Nome: Ana Amancio Santos da Silva

4.2 Qualificação: Fisioterapeuta

4.3 CPF: 05069555405

4.4 Endereço: Rua São José, 52, Jacintinho, Maceió, AL.

4.5 CEP: 57040510

4.6 Telefone: 82987424223

4.7 E-mail: ana.amanciophysio@gmail.com

5 **Natureza:** Patente de invenção

6 Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

**“STENT IMPREGNADO COM EXTRATO DE MORINGA
OLEIFERA”.**

continua em folha anexa

**Pedido de Divisão: do
pedido
Nº294091618015582660**

Data de Depósito:

12.02.19

7 Prioridade:

Interna (66)

Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

" continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

DIRPA

**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Sistema de Gestão
da Qualidade
Diretoria de
Patentes**

	tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Titulo do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

8 Inventor (72):

Nome: Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim

Qualificação: Farmacêutica-Bioquímica

CNPJ/CPF: 009833794-75

Endereço Completo: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote
- Bairro: Maternidade - Patos - Pb

CEP: 58701380

Telefone: 83993086537

8.1 Fax:

E-mail: luciolajanio@yahoo.com.br

Inventor (72):

Nome: Guilherme Benjamim Brandão Pitta

Qualificação: Médico

CPF: 347641864-20

Endereço Completo: Rua Desportista Humberto Guimaraes

CEP: 57035-7512

Telefone: 6.7 FAX:

E-mail:

Inventor (72):

Nome: Jânio Cipriano Rolim

Qualificação: Médico

CPF: 872512304-10

Endereço Completo: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote -
Bairro: Maternidade - Patos - Pb

CEP: 58701380

Telefone: 8396860808

6.7 FAX:

E-mail: janio_rolim@hotmail.com

Inventor (72):

Nome: Ana Amancio Santos da Silva

Qualificação: Fisioterapeuta

CPF: 05069555405

Endereço Completo: Rua São José, 52 ,
Jacintinho - Maceió- AL

CEP: 57040510

Telefone:
8396860808

6.7 FAX:

E-mail: ana.amanciophysio@gmail.com

Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.
Informe no item 11.13 os documentos anexados,
se houver.

continua em folha anexa

9 Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

10 Procurador (74):

10.1 Nome:

10.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

11 Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

12 Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
	11.2	Procuração.	
	11.3	Documentos de Prioridade.	
	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	1
	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n ^o , _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ n ^o de CDs ou DVDs (original e cópia).	
	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Formulário FQ001	6

13 Total de folhas anexadas: 11 **fls.**

14 Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

MACEIÓ AL, 12/02/2018

Local e Data

Assinatura e Carimbo

REINVINDICAÇÕES

1. O stent impregnado com extrato de *Moringa oleífera* é uma invenção, **caracterizado por** impregnar stents, utilizados para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (angioplastia), com extrato de folhas de *Moringa oleífera*.
2. O stent impregnado com extrato de *Moringa oleífera* é uma invenção, **caracterizado por** evitar inconvenientes como o alto custo de produção das substâncias utilizadas para impregnação, já que a *Moringa* é uma planta facilmente cultivada e sobrevive bem em locais de baixa pluviosidade, e ainda, por ser um produto natural, provavelmente, é mais bem tolerado pelo organismo, diminuindo o risco de efeitos colaterais

12/02/2019 - BANCO DO BRASIL - 19:37:49
333203332 0014

COMPROVANTE DE PAGAMENTO DE TITULOS

CLIENTE: ANA AMANCIO SANTOS SILVA
AGENCIA: 3332-4 CONTA: 24.779-0 VAR:51

=====

BANCO DO BRASIL

00190000090294091619601230430173178270000007000

BENEFICIARIO:

INSTITUTO N P I - INPI

NOME FANTASIA:

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE I

CNPJ: 42.521.088/0001-37

PAGADOR:

ANA AMANCIO SANTOS DA SILVA

CPF: 050.695.554-05

NR. DOCUMENTO	21.201
NOSSO NUMERO	29409161901230430
CONVENIO	02940916
DATA DE VENCIMENTO	13/03/2019
DATA DO PAGAMENTO	12/02/2019
VALOR DO DOCUMENTO	70,00
VALOR COBRADO	70,00

=====

Total debitado na variacao: 51 70,00

NR.AUTENTICACAO 8.E99.275.080.3B0.EAC

=====

Central de Atendimento BB

4004 0001 Capitais e regioes metropolitanas

0800 729 0001 Demais localidades

Consultas, informacoes e servicos transacionais.

SAC

0800 729 0722

Informacoes, reclamacoes e cancelamento de
produtos e servicos.

Ouvidoria

0800 729 5678

Reclamacoes nao solucionadas nos canais
habituais: agencia, SAC e demais canais de
atendimento.

Atendimento a Deficientes Auditivos ou de Fala

0800 729 0088

Informacoes, reclamacoes, cancelamento de
cartao, outros produtos e servicos de Ouvidoria.

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 3
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim
- 1.2 Qualificação: Farmacêutica-Bioquímica
- 1.3 CNPJ/CPF: 009833794-75
- 1.4 Endereço Completo: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote - Bairro: Maternidade
- 1.5 CEP: 58701380
- 1.6 Telefone: 83993086537
- 1.7 Fax:
- 1.8 E-mail: luciolajanio@yahoo.com.br

2. Depositante (71):

- 2.1 Nome: Guilherme Benjamin Brandão Pitta
- 2.2 Qualificação: Médico
- 2.3 CPF: 34764186420
- 2.4 Endereço: Rua Desportista Humberto Guimarães

3 Depositante (71):

- 3.1 Nome: Jânio Cipriano Rolim
- 3.2 Qualificação: Médico
- 3.3 CPF: 872512304-10
- 3.4 Endereço: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago – Quara 8 – Lote 3 – Bairro: Maternidade – Patos, PB.
- 3.5 CEP: 58701310

3.6 Telefone:83996860808

3.7 E-mail: janio_rolim@hotmail.com

4 Depositante (71):

4.1 Nome: Ana Amancio Santos da Silva

4.2 Qualificação: Fisioterapeuta

4.3 CPF: 05069555405

4.4 Endereço: Rua São José, 52, Jacintinho, Maceió, AL.

4.5 CEP: 57040510

4.6 Telefone: 82987424223

4.7 E-mail: ana.amanciophysio@gmail.com

5 **Natureza:** Patente de invenção

6 Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

**“STENT IMPREGNADO COM EXTRATO DE MORINGA
OLEIFERA”.**

continua em folha anexa

**Pedido de Divisão: do
pedido
Nº294091618015582660**

Data de Depósito:

12.02.19

7 Prioridade:

Interna (66)

Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

" continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

DIRPA

**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Sistema de Gestão
da Qualidade
Diretoria de
Patentes**

	tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Titulo do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

8 Inventor (72):

Nome: Lucíola Abilio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim

Qualificação: Farmacêutica-Bioquímica

CNPJ/CPF: 009833794-75

Endereço Completo: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote - Bairro: Maternidade - Patos - Pb

CEP: 58701380

Telefone: 83993086537

8.1 Fax:

E-mail: luciolajanio@yahoo.com.br

Inventor (72):

Nome: Guilherme Benjamim Brandão Pitta

Qualificação: Médico

CPF: 347641864-20

Endereço Completo: Rua Desportista Humberto Guimaraes

CEP: 57035-7512

Telefone: 6.7 FAX:

E-mail:

Inventor (72):

Nome: Jânio Cipriano Rolim

Qualificação: Médico

CPF: 872512304-10

Endereço Completo: Rua Severino Soares, 70, Condomínio Villas do Lago, quadra 8, lote -
Bairro: Maternidade - Patos - Pb

CEP: 58701380

Telefone: 8396860808

6.7 FAX:

E-mail: janio_rolim@hotmail.com

Inventor (72):

Nome: Ana Amancio Santos da Silva

Qualificação: Fisioterapeuta

CPF: 05069555405

Endereço Completo: Rua São José, 52 ,
Jacintinho - Maceió- AL

CEP: 57040510

Telefone:
8396860808

6.7 FAX:

E-mail: ana.amanciophysio@gmail.com

Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.
Informe no item 11.13 os documentos anexados,
se houver.

continua em folha anexa

9 Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

10 Procurador (74):

10.1 Nome:

10.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

11 Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

12 Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
	11.2	Procuração.	
	11.3	Documentos de Prioridade.	
	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	1
	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n ^o , _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ n ^o de CDs ou DVDs (original e cópia).	
	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Formulário FQ001	6

13 Total de folhas anexadas: 11 fls.

14 Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

MACEIÓ AL, 12/02/2018

Local e Data

Assinatura e Carimbo

DESENHO

A fig. 1 mostra-o em perspectiva montado;

A fig. 2 mostra-o em perspectiva de detalhamento;

