

Supplementation with *Moringa oleifera* leaves flour prevents fructose-based metabolic disorders in young rats

Suplementação de farinha de folhas de Moringa oleifera previne distúrbios metabólicos induzidos pela frutose em ratos jovens

Izabel Carolina Bousfield Terranova ¹, Isabelle Coelho Souza ², Isadora Simas Ribeiro ², Milena Fronza Broering ¹, Aline De Faveri ¹, Marina Jagielski Goss ¹, Ana Mara de Oliveira Silva ³, Rivaldo Niero ¹, Eduardo Augusto Steffens ¹, Larissa Benvenuti ¹, Luciano Vitali ⁴, Samantha Gonçalves ⁴, Isabel Daufenback Machado ⁵, Nara Lins Meira Quintão ¹, José Roberto Santin ^{1*}

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, Brazil; ²School of Health Sciences, Nutrition Course, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, Brazil.; ³Nutrition Department (DNUT), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil; ⁴Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; ⁵Postgraduate Program in Biodiversity, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil

corresponding author / autor para correspondência: jrs.santin@univali.br

Abstract

Moringa oleifera leaves flour is amply used to treat metabolic conditions. The aim was to assess the *M. oleifera* flour (MOF) on metabolic changes induced by fructose. Phenolic compounds were determined by LC-ESI-MS/MS. Wistar rats were distributed in groups: 1) Control (normal-chow + water); 2) Fructose (normal-chow + fructose (20%) in water) and 3) Feed with MOF20% + fructose (20%) in water. At the end of the 4th week of treatment, the animals were submitted to insulin resistance (IR) test, blood collection and histological evaluation. MOF contains phenolic compounds such as quercetin and chlorogenic acid. MOF supplementation promotes reduction in glycemia, insulin, triglycerides. The supplementation improved the insulin sensitivity. In the histological analysis, MOF supplementation reduced the adipocyte hypertrophy and the lipid deposition in the liver. The data obtained showed that MOF supplementation presented a protective effect against the harmful consequences of excessive fructose consumption.

Keywords: *Moringa oleifera*, metabolic syndrome, diabetes, fructose, mice

Resumo

A farinha de folhas de *Moringa oleifera* é amplamente utilizada para tratar condições metabólicas. O objetivo foi avaliar o efeito da farinha de *M. oleifera* (MOF) sobre as alterações metabólicas induzidas pela frutose. Os compostos fenólicos foram determinados por LC-ESI-MS/MS. Ratos Wistar foram distribuídos em grupos: 1) Controle (ração normal + água); 2) Frutose (ração normal + frutose (20%) em água) e 3) Alimentação com MOF20% + frutose (20%) em água. Ao final da 4ª semana de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de resistência à insulina (RI), coleta de sangue e avaliação histológica. MOF possui compostos fenólicos como quercetina e ácido clorogênico. A suplementação com MOF promove redução na glicemia, insulina, triglicerídeos. A suplementação melhorou a sensibilidade à insulina. Na análise histológica, a suplementação com MOF reduziu a hipertrofia dos adipócitos e a deposição de lipídios no fígado. Os dados obtidos mostraram que a suplementação com MOF apresentou efeito protetor contra as consequências nocivas do consumo excessivo de frutose.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, síndrome metabólica, diabetes, frutose, ratos

Introduction

Fructose is a common type of sugar in the American diet. A major source of fructose is high fructose corn syrup (HFCS), an inexpensive substitute for cane sugar that was introduced in the 1970s. It is now used to sweeten a variety of foods, including soda, candy, baked goods, and cereals. Studies in humans have linked excessive consumption of HFCS and other added sugars leads to insulin resistance, lipid abnormalities, obesity, hypertension, and renal dysfunction health (1,2). High fructose intake was associated with higher blood pressure and uric acid concentrations among adults in the United States without a history of hypertension. Furthermore, the same metabolic disease prevalence has been observed in younger population, as well as in children (2).

Fructose is metabolized mainly in hepatocytes by fructokinase that rapidly phosphorylates fructose to generate fructose-1-phosphate (2). The metabolism pathway consists of various other steps, resulting in primary metabolites and secondary products including glucose, lactate, free fatty acid, very low-density lipoprotein (VLDL) and uric acid (3).

Moringa oleifera Lam. is a specie within the Moringaceae family, commonly known as Moringa. The flour produced from its leaves is amply used in folk medicine to treat diabetes and other metabolic conditions. In fact, the Moringa leaves are the most used part of the plant, and present a great number of bioactive compounds, mainly phenolic compounds, such as quercetin, chlorogenic acid and caffeic acid (4).

M. oleifera has been extensively studied *in vivo* in several conditions, as it may provide hepatoprotective (5) and hypoglycemic (6,7) effects (8), be protective against diet-induced metabolic diseases (9), and have anti-obesity and *in vitro* antioxidant effects (10).

Flavonoids and saponins present in the plant are reported to increase HDL (High Density Lipoprotein) and to reduce total cholesterol, LDL (Low Density Lipoprotein), and VLDL cholesterol (11). Phytocompounds phenolic acids, including chlorogenic acid (CGA) identified in *M. oleifera* leaves (12), have been shown to have antioxidant and anti-hyperglycemic properties (13–15).

Introdução

A frutose é um tipo comum de açúcar na dieta americana. Uma das principais fontes de frutose é o xarope de milho rico em frutose (HFCS), um substituto barato para o açúcar de cana que foi introduzido na década de 1970. Agora é usado para adoçar uma variedade de alimentos, incluindo refrigerantes, doces, assados e cereais. Estudos associaram o consumo excessivo de HFCS e outros açúcares adicionados a resistência à insulina, anormalidades lipídicas, obesidade, hipertensão e disfunção renal (1,2). A alta ingestão de frutose foi associada a elevação da pressão arterial e concentrações de ácido úrico entre adultos nos Estados Unidos sem histórico de hipertensão. Além disso, a mesma prevalência de doença metabólica tem sido observada na população mais jovem, bem como em crianças (2).

A frutose é metabolizada principalmente nos hepatócitos pela frutosequinase que fosforila rapidamente a frutose para gerar frutose-1-fosfato (2). A via do metabolismo consiste em várias outras etapas e os resultados são metabólitos primários e produtos secundários, incluindo glicose, lactato, ácidos graxos livres, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e ácido úrico (3).

Moringa oleifera Lam. é uma espécie pertencente à família Moringaceae, comumente conhecida como Moringa. A farinha produzida a partir de suas folhas é amplamente utilizada na medicina popular para tratar diabetes e outras doenças metabólicas. De fato, as folhas da Moringa são a parte mais utilizada da planta, que apresenta um grande número de compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos, como quercetina, ácido clorogênico e ácido cafeico (4).

M. oleifera tem sido extensivamente estudada *in vivo* em várias condições, pois pode fornecer efeito hepatoprotetor (5), hipoglicêmico (6,7,8), protetor contra doenças metabólicas induzidas por dieta (9), anti-obesidade e efeito antioxidante *in vitro* (10).

Flavonoides e saponinas presentes na planta são relatados para aumentar o HDL (lipoproteína de alta densidade) e reduzir o colesterol total, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e colesterol VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (11). Os ácidos fenólicos, incluindo o ácido clorogênico (CGA) identificado nas folhas de *M. oleifera* (12), demonstrou apresentar propriedades antioxidantes e anti-hiperglicêmicas (13–15).

Considering the increased prevalence of diet-induced metabolic dysfunction by fructose consumption, this study was designed to investigate the phenolic compounds in *Moringa oleifera* leaf flour (MOF) and the protective effects of the oral supplementation of MOF on initial metabolic changes induced by fructose consumption in young rats.

Material and Methods

Sample

The *M. oleifera* flour obtained from leaves (MOF) was purchased from an industry in São Paulo, SP, Brazil (registration number 0111.0820.08R-1). The flour was kept in the refrigerator at 4°C in dark hermetically sealed jars throughout the period of the experiment. To produce the extract, the flour (200 g) was subjected to static maceration in methanol for 7 days, and was then subject to phytochemical profile analysis.

Identification of phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS

The analysis was performed in a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technologies, Germany) and a Phenomenex® Synergi 4 µ Polar-RP 80A column (150 mm x 2 mm ID, particle size of 4.6 µm) at a temperature of 30 °C. The mobile phase used was composed of solvent A (95% methanol in water) and solvent B (0.1% formic acid in water). The separations were conducted using segmented elution gradient as follows: 0–5 min, 10% A; 5–7 min, 90% A; 7–10 min, 90% A; 10–17 min, 10% A. The flow rate and sample injection volume were 250 µL/min and 10 µL, respectively. The LC system was coupled to a mass spectrometry system consisting of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (Qtrap® 3200, Applied Biosystems/MDS SCIEX, Waltham, MA, USA, with Turbo Ion Spray® as the ionization source) in negative ionization mode. The MS/MS parameters used were: ion spray interface quadrupole at 400°C; voltage of -4500 V; curtain gas, 10 psi; nebulizer gas, 45 psi; auxiliary gas, 45 psi; collision gas, medium. The Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode was used for analysis. For the identification of phenolic compounds, forty-five standards were dissolved in methanol and analyzed under the same conditions described above. The software Analyst® (version 1.5.1) was used to record and process the data.

Considerando o aumento da prevalência de disfunção metabólica induzida pela dieta pelo consumo de frutose, este estudo foi desenhado para investigar os compostos fenólicos na farinha de folhas de *M. oleifera* (MOF) e os efeitos protetores da suplementação oral de MOF nas alterações metabólicas iniciais induzidas pelo consumo de frutose em ratos jovens.

Material e Métodos

Amostras

A farinha de *M. oleifera* (MOF) obtida a partir das folhas foi adquirida de uma indústria em São Paulo, SP, Brasil (número de registro 0111.0820.08R-1). A farinha foi mantida na geladeira em frascos escuros hermeticamente fechados a 4°C durante todo o período do experimento. Para obtenção do extrato, a farinha (200 g) foi submetida à maceração estática em metanol por 7 dias e depois utilizada para análise fitoquímica.

Identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

A análise foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies, Alemanha) e uma coluna Phenomenex® Synergi 4 µ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm ID, tamanho de partícula de 4,6 µm) à temperatura de 30°C. A fase móvel utilizada foi composta por solvente A (95% metanol em água) e solvente B (0,1% ácido fórmico em água). As separações foram realizadas usando gradiente de eluição segmentado como segue: 0-5 min, 10% A; 5-7 min, 90% A; 7-10 min, 90% A; 10-17 min, 10% A. A taxa de fluxo e o volume de injeção da amostra foram 250 µL/min e 10 µL, respectivamente. O sistema LC foi acoplado a um sistema de espectrometria de massa composto por um espectrômetro de massa híbrido triplo quadrupolo/linear ion trap Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Waltham, MA, EUA) com Turbo Ion Spray® como fonte de ionização, no modo de ionização negativa. Os parâmetros MS/MS utilizados foram quadrupolo de interface de spray iônico a 400°C; tensão de -4500 V; gás de cortina, 10 psi; gás nebulizador, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi; gás de colisão, médio. O modo Multiple Reaction Monitoring (MRM) foi usado na análise. Para a identificação dos compostos fenólicos, quarenta e cinco padrões foram dissolvidos em metanol e analisados nas mesmas condições descritas acima. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para registrar e processar os dados.

Antioxidant activity

The determination of reduction potential of the MOF extract was performed by the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay. Briefly, in a microplate well, 9 μ L of extract at concentrations of 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 μ g/mL or 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (100 μ g/mL) were added to 27 μ L of distilled water and 270 μ L of freshly prepared FRAP solution (acetate buffer pH 3.6 (0.3 mmol/L), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (10 mmol/L) and ferric (FeCl_3)). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min, after which the absorbance was measured at 595 nm. A standard curve for FeSO_4 was plotted and used to calculate the reducing power of the extract.

The antioxidant capacity was measured against the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). Briefly, a reaction mixture containing 50 μ L of MOF extract at 10, 30, 100, 300 and 1000 μ g/mL or Trolox (100 μ g/mL) added with 150 μ L DPPH stock solution (24 μ g/mL) were incubated at room temperature in the dark for 30 min and measured at 517 nm. All determinations were accompanied by a control (blank) without the antioxidant samples. The decrease in the absorbance values of the samples was correlated to the control and the percentage of scavenging of the DPPH radical was expressed by the equation: % of scavenging = $((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$. The results were expressed as percentage of DPPH scavenging activity

Animals and treatment

Male Wistar rats, 21-day-year old, were obtained from the vivarium of the Universidade do Vale do Itajaí. Animals were allowed free access to water and food. The rats were housed in three animals per cage and acclimatized to laboratory conditions (20–23 °C, humidity 60%, 12 h light/dark cycle) for at least one week before each study. All procedures were performed according to the Brazilian Society of Science of Laboratory Animals' guidelines for the proper care and use of experimental animals. All procedures were approved by the local Ethics Committee of the Universidade do Vale Do Itajaí, Brazil (protocol no. 017/17).

All rats were weighed, and the consumption of water and feeds were quantified every two days. Fructose was supplied in the drinking water at a concentration of 20%. Twenty-seven rats were distributed in different groups (n=9): (1) control: water and standard feed; (2) water with 20% fructose solution (w/v, prepared every

Atividade antioxidante

A determinação do potencial redutor do extrato de MOF foi realizada pelo ensaio de poder redutor/antioxidante férrico (FRAP). Resumidamente, em um poço de microplaca, 9 μ L de extrato em concentrações de 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 μ g/mL ou ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (100 μ g/mL) foram adicionados a 27 μ L de água destilada e 270 μ L de solução FRAP recém-preparada (tampão acetato pH 3,6 (0,3 mmol/L), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (10 mmol/L) e férrico (FeCl_3)). A mistura de reação foi incubada a 37 °C por 30 min. Em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm. Uma curva padrão para FeSO_4 foi plotada e usada para calcular o poder redutor do extrato.

A capacidade antioxidante foi avaliada contra o modelo do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Resumidamente, uma mistura de reação contendo 50 μ L de extrato de MOF a 10, 30, 100, 300 e 1000 μ g/mL ou Trolox (100 μ g/mL) adicionado com 150 μ L de solução estoque DPPH (24 μ g/mL) foi incubada à temperatura ambiente no escuro por 30 min e ler a 517 nm. Todas as determinações foram acompanhadas por um controle (em branco) sem as amostras de antioxidantes. A diminuição dos valores de absorbância das amostras foi correlacionada com o controle e a porcentagem de eliminação do radical DPPH foi expressa pela equação: % de eliminação = $((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade de eliminação de DPPH

Animais e tratamento

Ratos Wistar machos, com 21 dias de idade, foram obtidos do biotério da Universidade do Vale do Itajaí. Os animais tiveram livre acesso a água e comida. Os ratos foram alojados em três animais por gaiola e aclimatados às condições de laboratório (20-23 °C, umidade 60%, ciclo claro/escuro de 12 h) por pelo menos uma semana antes de cada estudo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório para o cuidado e uso adequado de animais de experimentação. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local da Universidade do Vale do Itajaí, Brasil (protocolo n° 017/17).

Todos os ratos foram pesados e o consumo de água e ração foi quantificado a cada dois dias. A frutose foi fornecida na água na concentração de 20%. Vinte e sete ratos foram distribuídos em diferentes grupos (n=9): (1) controle: água e ração padrão; (2) água com solução de frutose a 20% (p/v, preparada a cada dois dias) e ração

two days) and normal feed; (3) water with 20% fructose solution and standard feed supplemented with 20% of MOF for four weeks. The methodology concerning the amount of *M. oleifera* flour added to chow was based on previous work with flour of vegetable products (16,17), and the amount of fructose supplemented in water was proposed by Mamikutty *et al.* (2014) (18).

Abdominal circumference

The abdominal circumference of animals was measured at the beginning of the experiment and at the end of the fourth week. The measurement was performed with the animal in the prone position with a tape measure in the region corresponding to the line above the iliac crest. The initial and final measurements were considered in the calculation of the percentage of increase in abdominal circumference.

Insulin Resistance Test (IRT)

The ITT was performed using a method previously described for rats (19). The food was removed from the cages at 08:00 a.m. on the study day, and the procedure was initiated at 1:00 p.m. Human insulin (Humulin®) was administered intraperitoneally in rats at a dose of 0.75 U/kg body weight. Tail blood was collected at 0 (before insulin infusion), 30, 60, 90, and 120 min (post infusion). Blood glucose levels were measured with a glucometer (Accu-chek® Active, Roche Diagnosis, Basel, Switzerland) at each time point. The area under the glucose decay curve (AUC) was calculated for each mouse and the mean was calculated for each group (20).

Biochemical parameters

The biochemical analysis was performed with the blood samples collected at the end of the experiment. After the fasting protocol, the animals were anaesthetized (ketamine and xylazine) and their blood samples were taken from the brachial artery. The samples were centrifuged at 4,000 g, at 4 °C for 10 min to separate the serum. The total cholesterol (CT), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), no-HDL cholesterol, triglyceride, glucose, and the activity of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) concentrations were measured using corresponding commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) by spectrophotometry and serum insulin concentration was measured by electrochemiluminescence assay.

normal; (3) água com solução de frutose a 20% e ração padrão suplementada com 20% de MOF por 4 semanas. A metodologia referente à quantidade de farinha de *M. oleifera* adicionada à ração foi baseada em trabalho anterior com farinha de produtos vegetais (16,17), e a quantidade de frutose suplementada em água foi proposta por Mamikutty *et al.* (2014) (18).

Circunferência abdominal

No início do experimento e no final da 4ª semana foi medida a circunferência abdominal dos animais. A medida foi realizada com o animal em decúbito ventral com fita métrica na região correspondente à linha acima da crista ilíaca. Para acessar o percentual de aumento do ganho de circunferência abdominal, considerou-se a medida inicial e final.

Teste de resistência a insulina (TRI)

O TRI foi realizado por um método previamente descrito para ratos (19) O alimento foi retirado às 08h00 no dia do estudo, e o procedimento foi iniciado às 13h00. A insulina humana (Humulin®) foi administrada por via intraperitoneal em ratos na dose de 0,75 U/kg de peso corporal. O sangue da cauda foi coletado em 0 (antes da infusão de insulina), 30, 60, 90 e 120 min (pós infusão). Os níveis de glicose no sangue foram medidos com um glicosímetro (Accu-chek® Active, Roche Diagnosis, Basel, Suíça) em cada ponto de tempo. A área sob a curva de decaimento da glicose (AUC) foi calculada para cada camundongo e a média foi calculada para cada grupo (20).

Parâmetros bioquímicos

A análise bioquímica foi realizada com as amostras de sangue coletadas ao final do experimento. Após o protocolo de jejum, os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina) e suas amostras de sangue foram retiradas da artéria braquial. As amostras foram centrifugadas a 4.000 g, a 4 °C por 10 min para separação do soro. As concentrações de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-c), colesterol sem HDL, triglicerídeos, glicose e a atividade da aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) foram medida usando kits comerciais correspondentes (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria e a concentração sérica de insulina foi medida por ensaio de eletroquimioluminescência.

Histological analysis

Small samples of hepatic, pancreatic and adipose tissues, extracted at the end of the experiment were fixed in 10% formalin. Then, followed the dehydration protocol, they were embedded in paraffin, sliced and stained using hematoxylin-eosin (HE). Images of the histological sections were taken using an optical microscope (Olympus CBA, Bartlett, TN, USA). For analysis of the pancreas, 15 images were captured for each animal in each group using a 10x objective. The image analysis was determined using Image J software, which quantified the areas of the respective functional units of each tissue. The results were expressed in $\mu\text{m}^2/\text{field}$. For the adipose tissue, 10 images of each animal in each group were captured using 10x objective, and the images were analyzed using Adiposoft Software (CIMA/Universidade de Navarra, Spain) (21)

Extraction of hepatic lipids

The liver cholesterol and triglyceride were extracted according Folch's method (1957) (22). At the end of the experiment, fresh livers were extracted and homogenized using chloroform/methanol (2:1, 3.75 mL). Chloroform and distilled water were then added to the homogenate and the solution was vortexed. After centrifugation (1500 g for 10 min), the lower organic phase was transferred to a new glass tube and lyophilized. The lyophilized powder was dissolved in a chloroform:methanol (1:2) mixture and then stored at -20°C . Cholesterol and triglyceride concentrations were determined spectrophotometrically using commercial diagnostic kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in the liver

The evaluation of lipid peroxidation was determined by the concentration of malondialdehyde in the liver tissue. The amount of present TBARS were determined as described by Uchiyama and Mihara (1978) (23). Livers were removed and 10 % homogenates were prepared in 15 % KCl solution. To 0.5 mL of 10 % homogenate was added 3.0 mL 1% H_3PO_4 and 1 mL 0.6% thiobarbituric acid solution. Each mixture was heated for 45 min, cooled, and extracted with n-butanol and the absorbance of the color at 535 nm was measured. The results were expressed as nmol MDA/mg tissue.

Análise histológica

Pequenas amostras de tecidos hepático, pancreático e adiposo, extraídas ao final do experimento, foram fixadas em formol a 10%. Em seguida, seguindo o protocolo de desidratação, foram incluídos em parafina, fatiados e corados com hematoxilina-eosina (HE). As imagens dos cortes histológicos foram obtidas usando um microscópio óptico (Olympus CBA, Bartlett, TN, EUA). Para análise do pâncreas, foram capturadas 15 imagens de cada animal em cada grupo experimental usando uma objetiva de 10x. A análise das imagens foi determinada pelo software Image J, que quantificou as áreas das respectivas unidades funcionais de cada tecido. Os resultados foram expressos em $\mu\text{m}^2/\text{campo}$. Para o tecido adiposo, 10 imagens de cada animal em cada grupo experimental foram capturadas com objetiva de 10x, e as imagens foram analisadas com Adiposoft. Software (CIMA/Universidade de Navarra, Espanha) (21).

Extração de lipídeos hepáticos

O colesterol e os triglicerídeos do fígado foram extraídos de acordo com o método de Folch (1957) (22). No final do experimento, fígados frescos foram extraídos e homogeneizados usando clorofórmio/metanol (2:1, 3,75 mL). Clorofórmio e água destilada foram então adicionados ao homogenato e a solução foi agitada em vórtex. Após centrifugação (1500 g por 10 min), a fase orgânica inferior foi transferida para um novo tubo de vidro e liofilizada. O pó liofilizado foi dissolvido em uma mistura de clorofórmio:metanol (1:2) e então armazenado a -20°C . As concentrações de colesterol e triglicerídeos foram determinadas por meio de kits comerciais de diagnóstico (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria.

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado

A avaliação da peroxidação lipídica foi determinada pela concentração de malondialdeído no tecido hepático. A quantidade de TBARS presentes foi determinada conforme descrito por Uchiyama e Mihara (1978) (23). Os fígados foram removidos e homogeneizados a 10% foram preparados em solução de KCl a 15%. A 0,5 mL de homogeneizado a 10% foram adicionados 3,0 mL de H_3PO_4 a 1% e 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. Cada mistura foi aquecida por 45 min, resfriada e extraída com n-butanol e a absorbância da cor a 535 nm foi medida. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de tecido.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error mean (SEM) of 9 rats per group (n=9). For weight evolution analysis and insulin resistance tests, two-way ANOVA was used followed by Bonferroni test. All other statistical comparisons were performed using one-way analyses of variance (one way-ANOVA) followed by Tukey's test. P-values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered significant. All analyses were performed using GraphPad PRISM 6[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Characterization of MOF extract by determination of total phenol content and LC-ESI- MS/MS analysis

Total phenol content in MOF extract was 122.96 ± 0.18 mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract, showing 2.27 ± 0.33 g EAG/100 g MOF. The phytochemical profile of MOF presented several compounds, seven of which could be identified (Figure 1 and Table 1). The seven major phenolic compounds were identified as (1) protocatechuic acid, (2) chlorogenic acid, (3) caffeic acid, (4) p-coumaric acid, (5) rutin, (6) quercetin, (7) eriodictyol, and the concentration of each was determined (Table 1). Among the identified compounds, the major compound of the extract is the compound 6, identified as quercetin with 103.01 mg/g, followed by protocatechuic and chlorogenic acid with 4.03 and 1.03 mg/g, respectively.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão médio (SEM) de 9 ratos por grupo (n=9). Para a análise de evolução do peso e testes de resistência a insulina, foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. Todas as outras comparações estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância de uma via (ANOVA), seguidas do pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad PRISM 6[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

Caracterização do extrato de MOF por determinação do teor de fenol total e análise LC-ESI-MS/MS

O teor total de fenol no extrato de MOF foi de $122,96 \pm 0,18$ mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por grama de extrato, apresentando $2,27 \pm 0,33$ g EAG/100 g MOF. O perfil fitoquímico do MOF apresentou diversos compostos, dos quais foi possível identificar sete compostos (Figura 1 e Tabela 1). Os sete principais compostos fenólicos detectados foram identificados como: (1) Ácido protocatecuico; (2) ácido clorogênico; (3) ácido cafeico; (4) ácido p-cumárico; (5) rutina; (6) quercetina; (7) eriodictiol. As concentrações desses compostos foram determinadas e estão apresentadas na Tabela 1. Dentre os compostos identificados, o composto majoritário do extrato é o composto 6, identificado como quercetina com 103,01 mg/g, seguido de ácido protocatecuico e clorogênico com 4,03 e 1,03 mg/g, respectivamente.

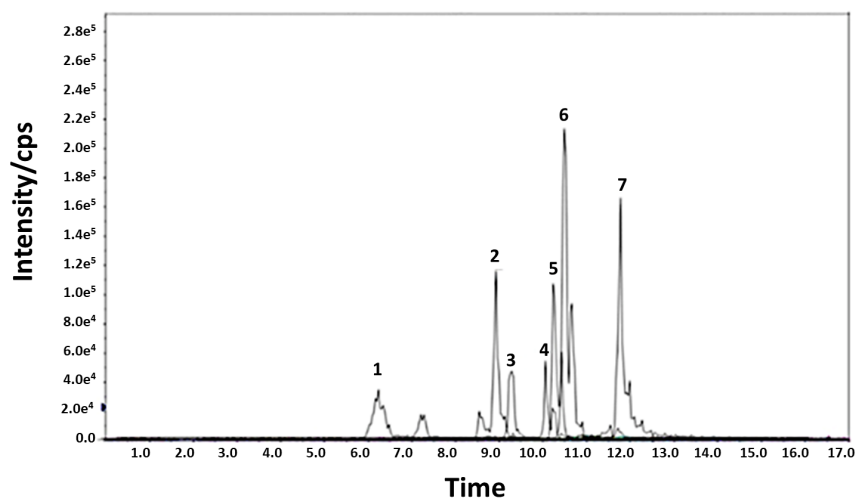


Figure 1 - Total ion chromatogram from methanolic extract of *Moringa oleifera* flour (MOF). Protocatechuic acid (1); Chlorogenic acid (2); Caffeic acid (3); p-Coumaric acid (4); Rutin (5); Quercetin (6); Eriodictyol (7).

Figura 1 - Cromatograma iônico total do extracto metanólico da farinha de *Moringa oleifera* (MOF). Ácido Protocatecuico (1); Ácido Clorogênico (2); Ácido Cafeico (3); Ácido p-Cumárico (4); Rutina (5); Quercetina (6); Eriodictiol (7).

Table 1 - Content of phenolic compounds from methanolic extract of *Moringa oleifera* flour (MOF). LOD, limit of detection; LOQ; limit of quantification; R², coefficient of determination. Concentration values ± SEM. **Tabela 1** - Teor de compostos fenólicos do extracto metanólico da farinha de *Moringa oleifera* (MOF). LOD, limite de detecção; LOQ; limite de quantificação; R², coeficiente de determinação. Valores expressos ± EPM.

Compounds	Linearity (mg mL ⁻¹)	R ²	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Concentration (mg/g)
Protocatechuic acid (1)	0.08 - 1.00	0.996	0.021	0.068	4.03 ± 0.47
Chlorogenic acid (2)	0.03 - 2.36	0.995	0.003	0.009	1.03 ± 0.29
Caffeic acid (3)	0.05 - 4.00	0.992	0.015	0.050	0.45 ± 0.16
<i>p</i> -Coumaric acid (4)	0.31 - 4.08	0.994	0.001	0.005	0.02 ± 0.01
Rutin (5)	0.05 - 6.24	0.998	0.032	0.108	0.11 ± 0.02
Quercetin (6)	0.08 - 3.20	0.997	0.011	0.036	103.01 ± 28.70
Eriodictyol (7)	0.06 - 2.03	0.992	0.001	0.004	0.01 ± 0.01

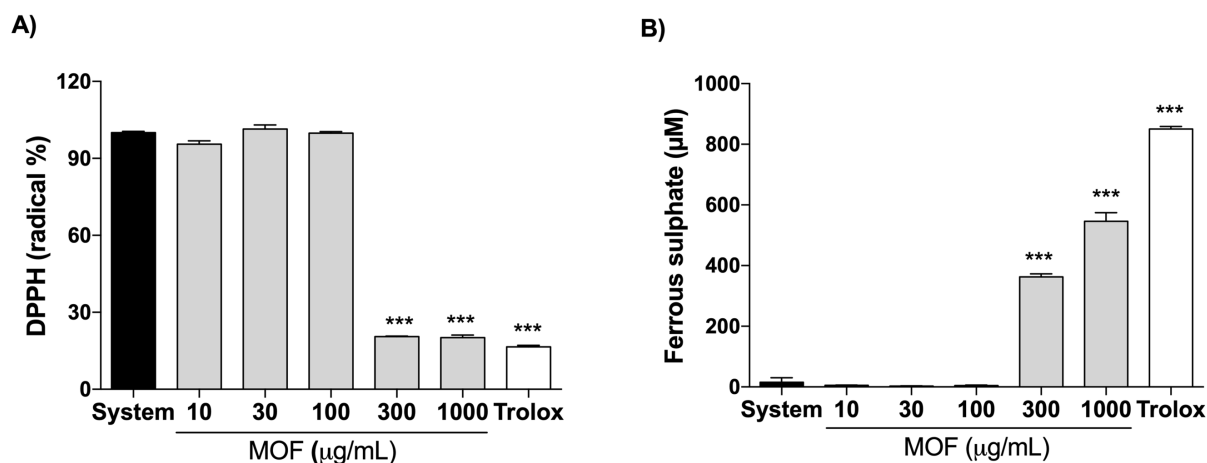


Figure 2 - Antioxidant activity of the methanolic extract of *Moringa oleifera* flour (MOF) *in vitro*. (A) MOF was tested in the DPPH radical assay (B) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Experiments were performed in triplicate. Trolox was used as standard antioxidant. ***p < 0.001 vs. respective system (reaction medium without antioxidants).

Figura 2 - Atividade antioxidante do extracto metanólico da farinha de *Moringa oleifera* (MOF) *in vitro*. (A) MOF foi avaliado nos testes DPPH (B) e antioxidante redutor férrico (FRAP). As concentrações são indicadas para as soluções de reserva e os valores resultantes representam a média ± EPM. As experiências foram realizadas em triplicado. O Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. ***p < 0,001 vs. o respectivo sistema (meio de reação sem antioxidantes).

In vitro antioxidant activity of MOF methanolic extract

The extract was evaluated for antioxidant activity *in vitro* by the DPPH radical assay and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Figure 2A shows that the MOF methanolic extract significantly decreased the DPPH radical from of 300–1000 $\mu\text{g/mL}$. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) also significantly reduced the DPPH radical in comparison to the system. Data presented in Figure 2B demonstrates that MOF methanolic extract significantly increased the reducing potential from of 300–1000 $\mu\text{g/mL}$, when compared with the system. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) also presented this activity ($p < 0.001$). Taken together, the data shows that MOF extract has antioxidant activity, probably due to the presence of phenolic compounds in the plant.

Effect of MOF in weight gain and abdominal circumference measurement

Figure 3 demonstrates that MOF and fructose supplementation did not interfere with weight gain after 4-week period of intervention (Figure 3A and 3B). Additionally, abdominal circumference was unaffected (Figure 3C).

Atividade antioxidante in vitro do extrato metanólico MOF

O extrato foi avaliado quanto à atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio do radical DPPH e pelo ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP). A Figura 2A mostra que o extrato metanólico MOF diminuiu significativamente o radical DPPH de 300–1000 $\mu\text{g/mL}$. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) também reduziu significativamente o radical DPPH em comparação com o sistema. Os dados apresentados na Figura 2B demonstram que o extrato metanólico MOF aumentou significativamente o potencial redutor de 300–1000 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com o sistema. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) também apresentou essa atividade ($p < 0,001$). Em conjunto, os dados mostram que o extrato de MOF possui atividade antioxidante, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos na planta.

Efeito do MOF no ganho de peso e medida da circunferência abdominal

A Figura 3 demonstra que a suplementação com MOF e frutose não interferiu no ganho de peso após 4 semanas de intervenção (Figura 3A e 3B). Além disso, também não houve diferença na medida da circunferência abdominal (Figura 3C).

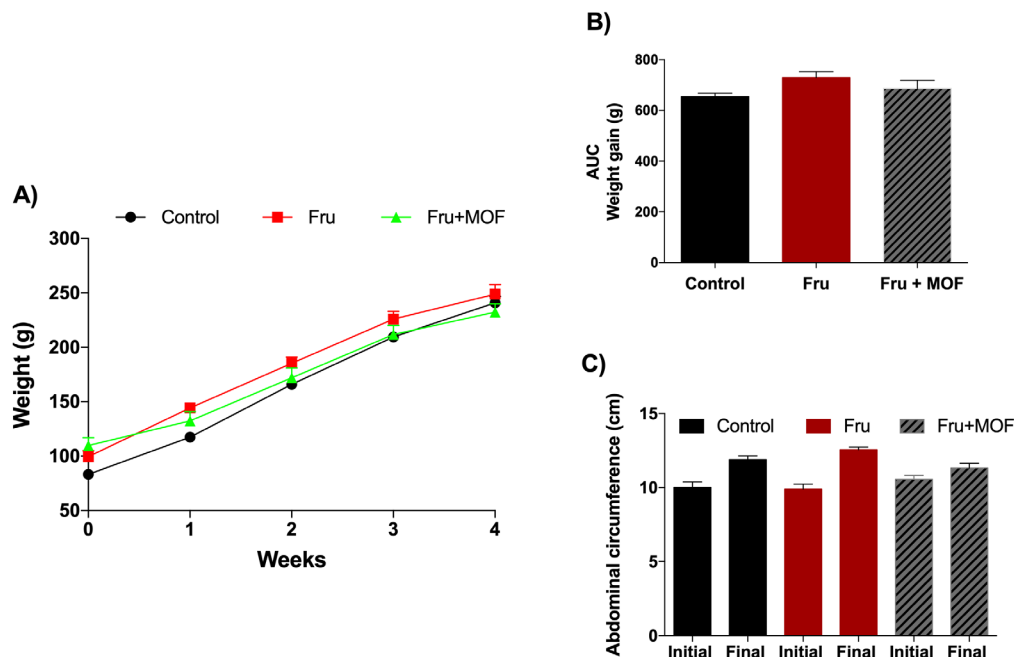


Figure 3 - Data obtained during the four-week period of intervention. (A) Weight Evolution; (B) Area under the curve of the weight evolution chart; (C) Abdominal Circumference. The results represent the mean \pm SEM of the values ($n = 9$ per group). Control = normal chow + drinking water; Fru = normal chow + 20% fructose solution; Fru+MOF = *M. oleifera* leaves flour added to chow + 20% fructose solution.

Figura 3 - Dados obtidos durante as 4 semanas de intervenção. (A) Evolução do Peso; (B) Área sob a curva do gráfico de evolução do peso; (C) Circunferência Abdominal. Os resultados representam a média \pm EPM dos valores ($n = 9$ por grupo). Controle = papa normal + água potável; Fru = papa normal + 20% de solução de frutose; Fru+MOF = farinha de *M. oleifera* adicionada à papa + 20% de solução de frutose.

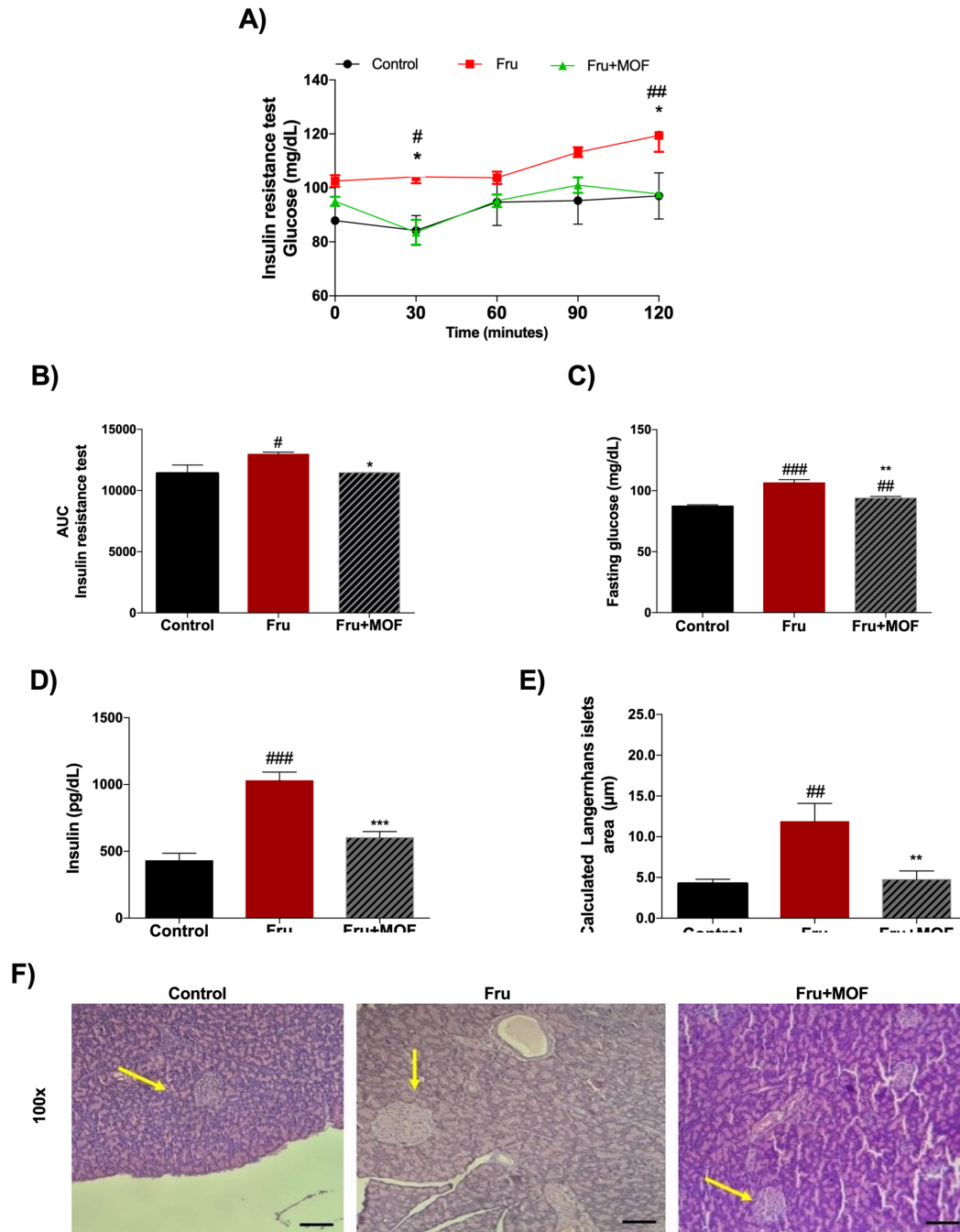


Figure 4 - Effects of MOF supplementation on insulin resistance test (A) and area under curve (AUC) of the respective line graph (B); levels of fasting glycemia (C) and insulin (D). Histomorphometric (E) and histomorphological analysis (F) of the Langerhans islets. The results represent the mean \pm SEM of the values (n = 9 per group). #p<0.05 ##p<0.01 e ###p<0.001 vs. control group and *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 vs. Fru group. Control= Normal chow + drinking water; Fru= normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF = chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution. Scale bar = 100 μ m.

Figura 4 - Efeitos da suplementação de MOF no teste de resistência à insulina (A) e área sob curva (AUC) do respectivo gráfico de linhas (B); níveis de glicemia de jejum (C) e insulina (D). Histomorfometria (E) e análise histomorfológica (F) das ilhotas de Langerhans. Os resultados representam a média \pm EMP dos valores (n = 9 por grupo). #p<0.05 ##p<0.01 e #####p<0.001 vs. grupo de controle e *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 vs. grupo Fru. Control= papa normal + água potável; Fru= papa normal +20% de solução de frutose; Fru+MOF = papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose. Escala = 100 μ m.

Effect of MOF on insulin and glucose sensitivity, fasting blood glucose, and pancreatic parameters

The results obtained showed that rats supplemented with fructose for four weeks developed insulin resistance (Figure 4A and 4B) with increased fasting blood glucose (Figure 4C). Corroborating to this data, the animals also presented increased insulin levels (Figure 4D) and Langerhans islets hypertrophy (Figure 4F), which was confirmed by the measurement of Langerhans islets area (Figure 4E). On the other hand, the animals that received MOF supplementation presented a reduction in the glucose levels, without other metabolic changes correlated to insulin metabolism (Figure 4A, 4B and 4D). In fact, the histological evaluation of the pancreas in MOF-treated animals was very similar the animals from control group (Figure 4F). Moreover, in this group, the Langerhans islets cell volume remained close to normal (Figure 4E and F).

Effect of MOF on serum lipid profile

The effect of the MOF supplementation on serum lipid profile is demonstrated in Figure 5. The triglycerides (TGL) concentration was significantly decreased ($p < 0.05$) (Figure 5A), while high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration increased significantly compared to fructose group ($p < 0.01$) (Figure 5C). The fructose group demonstrated a decrease in HDL values, as expected, and had a considerable increase in TGL when compared to both groups (Figure 5A). Total cholesterol and non-HDL cholesterol values did not show differences between groups (Figures 5B and 5D respectively).

Characterization of liver tissue lipids

The data presented in Figure 6 shows the hepatic lipid profile following the four-week period of intervention. The histological analysis of H&E-stained hepatocytes (magnification x 400) demonstrated lower deposition of lipids in the hepatic tissue in animals that received MOF supplementation (Figure 6A). The hepatocytes from the fructose-treated group presented plaques separated by irregular blood sinusoids. The areas were characterized as histological manifestation of intracytoplasmic lipids, close to the central lobular vein (Figure 6A). No such abnormalities were found in the MOF supplementation group, indicating that MOF supplementation prevented the deleterious effect of fructose on hepatic lipid storage. In fact, the biochemical analysis demonstrated that MOF supplementation prevented the increase of hepatic cholesterol and TGL concentrations (Figures 6B and C).

Efeito do MOF na sensibilidade à insulina e à glicose, glicemia de jejum e parâmetros do pâncreas

Os resultados obtidos mostraram que ratos suplementados com frutose por quatro semanas desenvolveram resistência à insulina (Figura 4A e 4B) com aumento da glicemia em jejum (Figura 4C). Corroborando com esses dados, os animais também apresentaram aumento do nível de insulina (Figura 4D) e hipertrofia das ilhotas de Langerhans (Figura 4F), o que foi confirmado pela medida da área das ilhotas de Langerhans (Figura 4E). Por outro lado, os animais que receberam suplementação com MOF apresentaram redução nos níveis de glicose, sem outra alteração metabólica correlacionada ao metabolismo da insulina (Figura 4A, 4B e 4D). De fato, a avaliação histológica do pâncreas em animais tratados com MOF foi muito semelhante aos animais do grupo controle (Figura 4F). Além disso, neste grupo, as ilhotas de Langerhans mantiveram o volume celular próximo da normalidade (Figura 4E e F).

Efeito do MOF no perfil lipídico sérico

O efeito da suplementação de MOF no perfil lipídico sérico é demonstrado na Figura 5. A concentração de triglicerídeos (TGL) foi significativamente diminuída ($p < 0,05$) (Figura 5A), enquanto a concentração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) aumentou significativamente em comparação com grupo frutose ($p < 0,01$) (Figura 5C). O grupo frutose apresentou diminuição dos valores de HDL, como esperado, e teve aumento considerável de TGL quando comparado aos dois grupos (Figura 5A). Os valores de colesterol total e colesterol não HDL não mostraram diferenças entre os grupos (Figuras 5B e 5D respectivamente).

Caracterização dos lipídios do tecido hepático

Os dados apresentados na Figura 6 mostram o perfil lipídico hepático após o período de quatro semanas de intervenção. A análise histológica dos hepatócitos corados por H.E. (ampliação x 400) demonstrou menor deposição de lipídios no tecido hepático em animais que receberam suplementação de MOF (Figura 6A). O fígado do grupo tratado com frutose, os hepatócitos, apresentou placas separadas por sinusóides sanguíneos irregulares. As áreas foram caracterizadas como manifestação histológica de lipídios intracitoplasmáticos, próximo à veia lobular central (Figura 6A). A suplementação com MOF foi capaz de prevenir o efeito da frutose no armazenamento de lipídios hepáticos e não foram encontradas anormalidades. De fato, a análise

In addition, the lipid peroxidation was evaluated according to appropriate methods through malondialdehyde (MDA) measurement. As expected, liver tissue samples from rats that consumed only fructose revealed increase in MDA compared to both other groups. Moreover, MOF addition improved oxidative stress, reducing hepatic MDA formation (Figure 6D).

bioquímica demonstrou que a suplementação com MOF preveniu o aumento das concentrações hepáticas de colesterol e TGL (Figuras 6B e C).

Além disso, a peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com métodos apropriados através da dosagem de malondialdeído (MDA). Como esperado, amostras de tecido hepático de ratos que consumiram apenas frutose revelaram aumento no MDA em comparação com os outros dois grupos. Além disso, a adição de MOF melhorou o estresse oxidativo, reduzindo a formação de MDA hepático (Figura 6D).

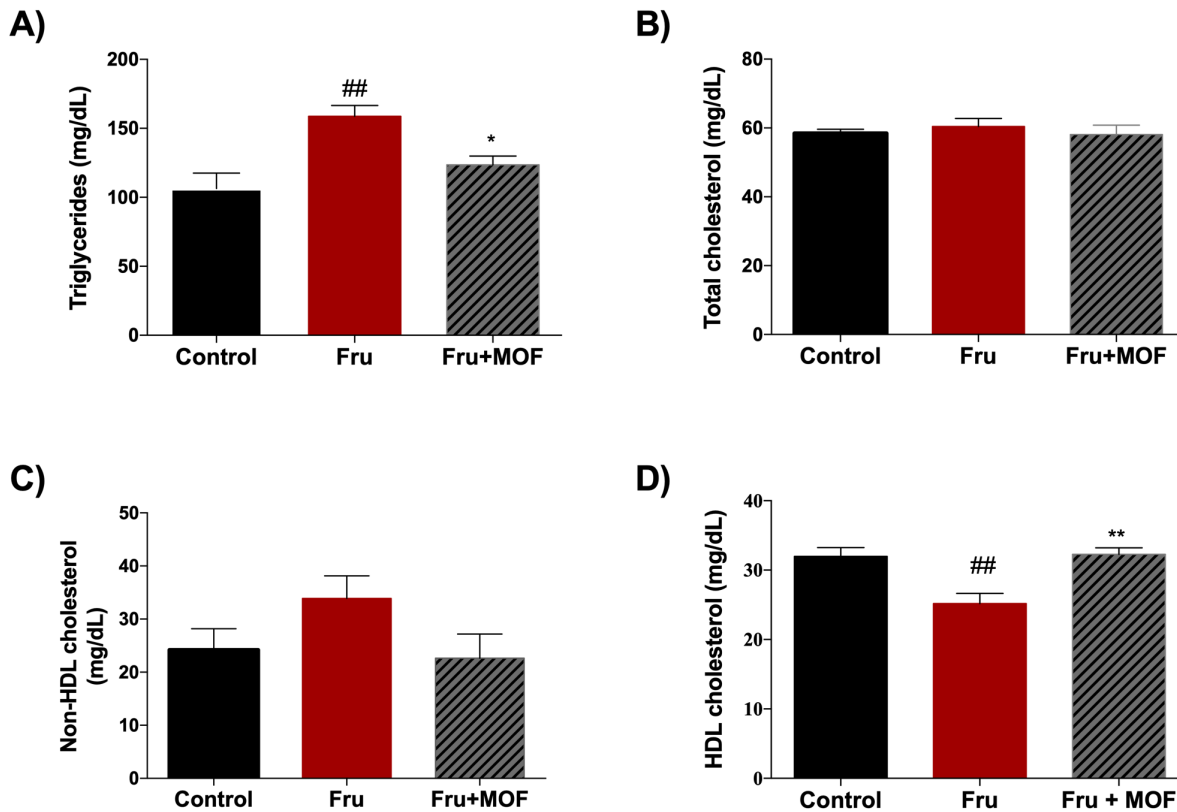


Figure 5 - Lipid profile of animals treated with MOF. (A) Measurement of triglycerides; (B) Total cholesterol; (C) Non-HDL cholesterol; (D) HDL cholesterol. The results represent the mean \pm SEM of the values (n = 9 per group). ##p<0.01 vs. control group and *p<0.05 **p<0.01 vs. Fru group. Control = Normal chow + drinking water; Fru = normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF = chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution.

Figura 5 - Perfil lipídico dos animais tratados com MOF. (A) Medição de triglicéridos; (B) colesterol total; (C) colesterol não-HDL; (D) colesterol HDL (D). Os resultados representam a média \pm EMP dos valores (n = 9 por grupo). ##p<0,01 vs. grupo de controle e *p<0,05 **p<0,01 vs. grupo Fru. Controle = papa normal + água potável; fruta = papa normal +20% de solução de frutose; fruta+MOF = papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose.

Effect of MOF on adipose tissue parameters

The fructose group presented an increase in the absolute weight of visceral and epididymal adipose tissue (Figures 7A and 7D) after 4-week treatment period, as shown in Figure 7. However, no significant difference was observed between the relative weight for both tissues (Figures 7B and 7E). Noteworthy, the histology (Figure 7C) and morphometry (Figure 7F) from epididymal adipose tissue showed that fructose induces a higher cellular volume in the adipocytes. However, animals treated with MOF exhibited cellular area size similar to the control group.

Efeito do MOF nos parâmetros do tecido adiposo

Os dados apresentados na Figura 7 mostram que o grupo Frutose apresentou aumento no peso absoluto do tecido adiposo visceral e epididimal (Figuras 7A e 7D) após 4 semanas de tratamento. No entanto, não foi observada diferença significativa entre o peso relativo para ambos os tecidos (Figuras 7B e 7E). Destaca-se que a histologia (Figura 7C) e morfometria (Figura 7F) do tecido adiposo do epidídimo mostraram que a frutose induz maior volume celular nos adipócitos. No entanto, os animais tratados com MOF exibiram tamanho de área celular semelhante ao grupo controle.

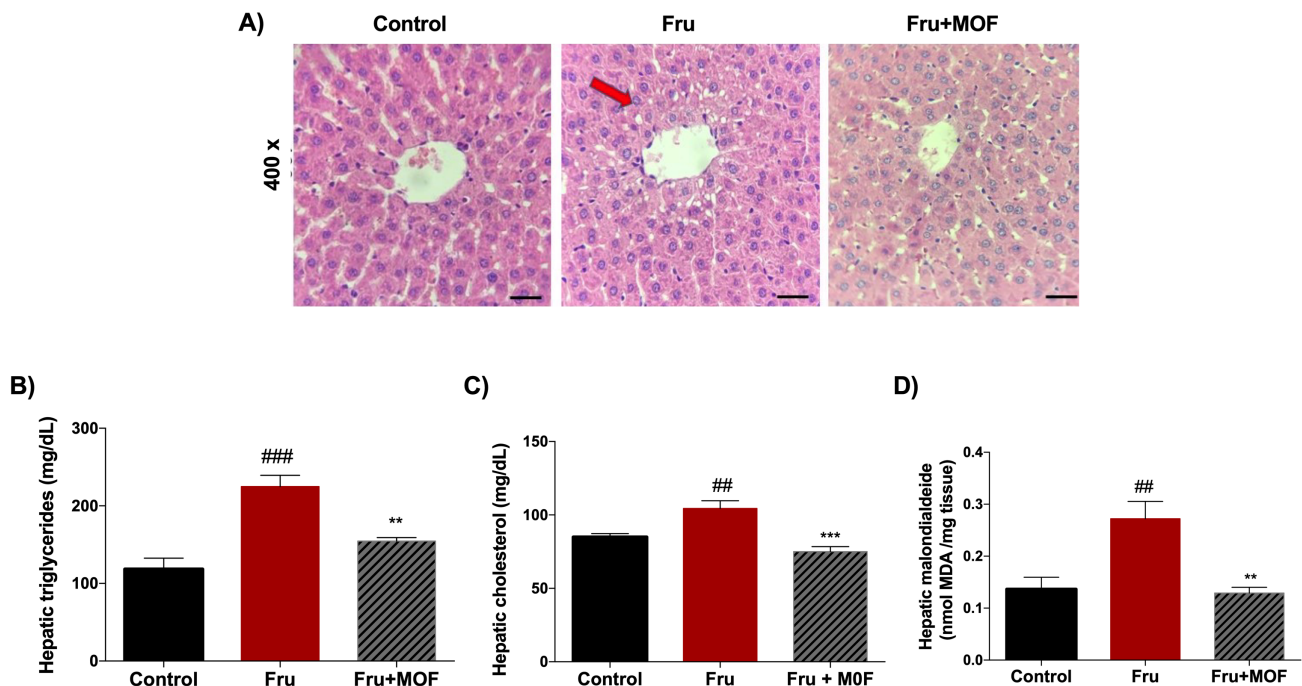


Figure 6 - Characterization of liver tissue from animals submitted to MOF treatment: (A) Illustrative histological images of the liver; (B) levels of triglycerides, (C) cholesterol, and (D) Evaluation of MDA dosage by the TBARS test (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). The values express the mean \pm S.E. M. (9 animals per group). ##p < 0.01 e ###p < 0.001 vs. Control group **p < 0.01 e ***p < 0.001 vs. Fru group. Control= normal chow + drinking water; Fru= normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF= chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution. The red arrow indicates an area of hepatic steatosis. Scale bar = 100 μ m.

Figura 6 - Caracterização do tecido hepático de animais submetidos ao tratamento MOF: (A) Imagens histológicas ilustrativas do fígado; (B) níveis de triglicéridos, (C) colesterol, e (D) Avaliação da dosagem de MDA pelo teste TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Os valores expressam a média \pm S.E. M. (9 animais por grupo). ##p < 0.01 e #####p < 0.001 vs. Grupo de controle **p < 0.01 e ***p < 0.001 vs. Grupo Fru. Control= papa normal + água potável; Fru= papa normal +20% de solução de frutose; Fru+MOF= papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose. A seta vermelha indica uma área de esteatose hepática. Escala = 100 μ m.

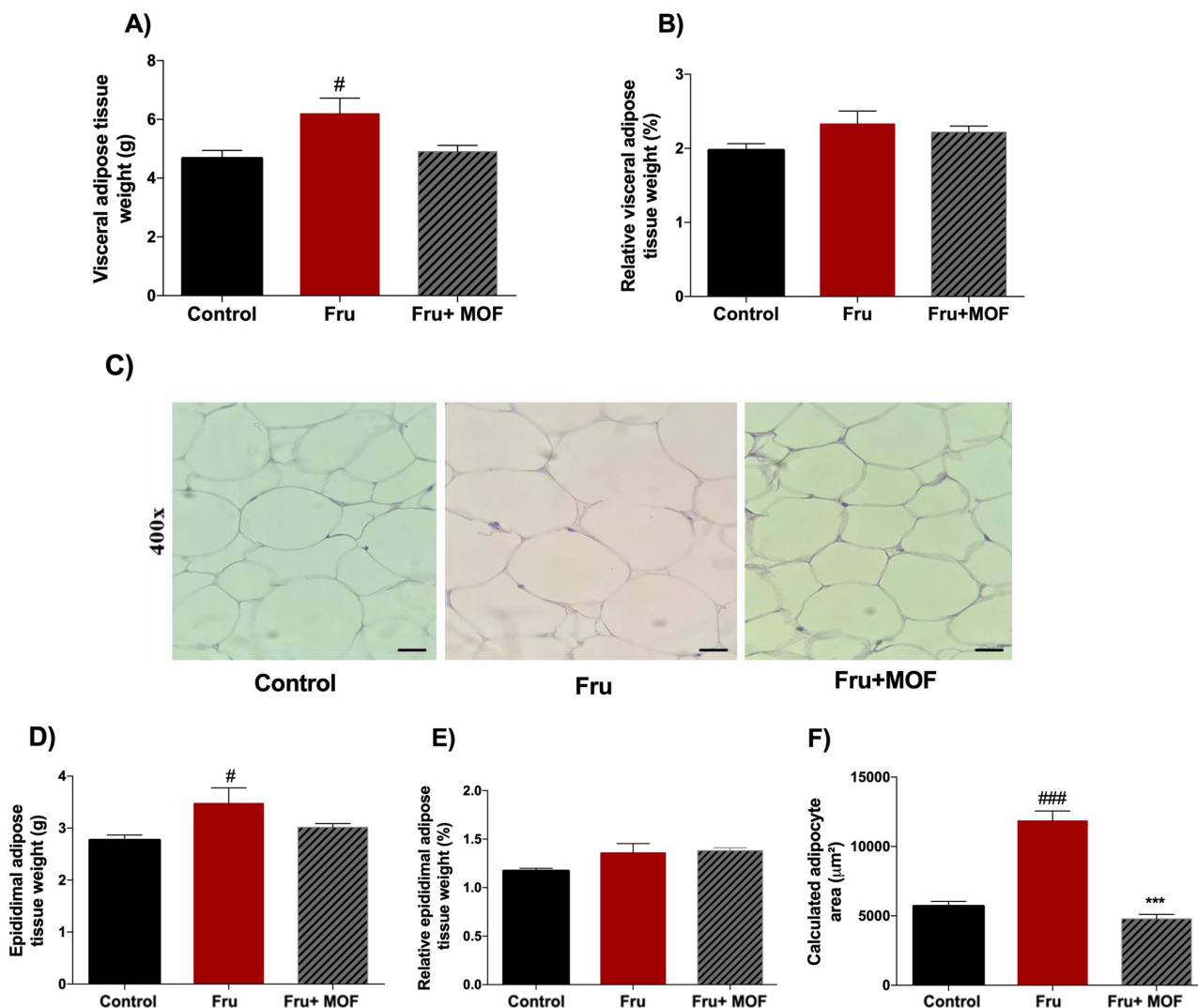


Figure 7 - Effects of MOF supplementation in adipose tissue parameters. (A) Absolute weight of visceral adipose tissue; (B) Relative weight of visceral adipose tissue; (D) Absolute weight of epididymal adipose tissue; (E) Relative weight of epididymal adipose tissue; (C) Illustrative images of adipocytes stained by hematoxylin and eosin; and (F) measurement of adipocyte cells area. The values express the mean \pm SEM. (9 animals per group). $\#p < 0.05$ and $###p < 0.001$ vs. control group and $***p < 0.01$ vs Fru group. Control = normal chow + drinking water; Fru = normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF= chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution. Scale bar = 100 μ m

Figura 7 - Efeitos da suplementação de MOF nos parâmetros do tecido adiposo. (A) Peso absoluto do tecido adiposo visceral; (B) Peso relativo do tecido adiposo visceral; (D) Peso absoluto do tecido adiposo do epidídimo; (E) Peso relativo do tecido adiposo do epidídimo; (C) Imagens ilustrativas de adipócitos corados por hematoxilina e eosina; e (F) medição da área de células adipocitárias. Os valores expressam a média \pm EPM (9 animais por grupo). $\#p < 0,05$ e $###p < 0,001$ vs. grupo de controle e $***p < 0,01$ vs. grupo Fru. Controle = papa normal + água potável; fru = papa normal +20% de solução de frutose; fruta+MOF= papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose. Escala = 100 μ m.

Discussion

M. oleifera is an edible plant and contains not only nutrients, but also bioactive compounds such as alkaloids, sterols, glucosinolates, isothiocyanates, phenolic glycosides and flavonoids (24,25). In fact, our results showed that MOF extract is rich in phenolic compounds, as previously published (26). LC-ESI-MS/MS profile analysis enabled the identification of various active compounds within the extract. The detection of quercetin, as the majority compound, followed by protocatechuic, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, rutin and eriodictyol in MOF agrees with previous studies (27).

Antioxidants are not only reducing agents used as preventatives to inhibit the oxidation of other molecules, but they may also be used to treat health complications from metabolic conditions caused by oxidative stress (3). MOF phytochemical analysis demonstrated the presence of phenolics compounds and flavonoids, which are known to be efficient antioxidants (28). In this context, the presence and synergy of these compounds in MOF explains the efficient antioxidant properties *in vitro* and *in vivo*.

Several researchers have demonstrated that excessive fructose consumption can lead to metabolic disturbances, especially related to insulin metabolism and metabolic syndrome (29,30). In fact, our data demonstrates that adding 20% fructose in the water given to the animals for four weeks promotes metabolic changes, mainly related to insulin resistance and liver lipid accumulation, without promoting alterations in the weight gain, abdominal circumference, and abdominal visceral fat deposition. Additionally, the data obtained in the histological analysis of the adipose tissue showed that the adipocyte's area increased in the fructose-treated animals. This data corroborates with the literature, which shows that the fructose consumption is associated with the adipocyte hypertrophy (31). In contrast, adipocyte hypertrophy was prevented with the incorporation of MOF into the diet, when compared to fructose treated animals.

Discussão

A *M. oleifera* é uma planta comestível e contém não apenas nutrientes, mas também compostos bioativos como alcalóides, esteróis, glucosinolatos, isotiocianatos, glicosídeos fenólicos e flavonóides (24,25). De fato, nossos resultados mostraram que o extrato de MOF é rico em compostos fenólicos, conforme previamente publicado (26). Para identificar os diferentes compostos ativos do extrato de MOF, utilizou-se a análise do perfil LC-ESI-MS/MS. A detecção de quercetina, como composto majoritário, seguida de protocatecuico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, rutina e eriodictiol no MOF concorda com estudos anteriores (27).

Os antioxidantes não são apenas agentes redutores que inibem a oxidação de outras moléculas, usados na prevenção, mas também podem tratar complicações de saúde, como condições metabólicas causadas pelo estresse oxidativo (3). A análise fitoquímica do MOF demonstrou a presença de compostos fenólicos e flavonóides, que são antioxidantes eficientes (28). Nesse contexto, a presença e sinergia desses compostos no MOF explica as eficientes propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*.

Vários pesquisadores apontaram que o consumo excessivo de frutose pode levar a distúrbios metabólicos, especialmente relacionados ao metabolismo da insulina e à síndrome metabólica (29,30). De fato, nossos dados demonstram que a adição de 20% de frutose na água fornecida aos animais por quatro semanas promove alterações metabólicas, principalmente relacionadas à resistência à insulina e acúmulo de lipídios no fígado, sem promover alterações no ganho de peso, circunferência abdominal e deposição de gordura visceral abdominal. Além disso, os dados obtidos na análise histológica do tecido adiposo mostraram que a área do adipócito aumentou nos animais tratados com frutose. Esses dados corroboram com a literatura, que mostra que o consumo de frutose está associado à hipertrofia de adipócitos (31). Em contrapartida, o grupo que teve MOF incorporado à dieta preveniu a hipertrofia de adipócitos quando comparado aos animais tratados com frutose. Esses achados são consistentes com dados anteriores que relataram que o tratamento com *M. oleifera* regulou negativamente a expressão de mRNA de leptina e resistina e a expressão de mRNA de adiponectina regulada positivamente em tecido visceral de ratos obesos, atenuando a síndrome metabólica (32).

From the above findings, the insulin resistance was observed in animals that received fructose. The insulin resistance is a fundamental aspect of the etiology of type 2 diabetes and plays important role not only in the development of hyperglycemia of non-insulin dependent diabetes but also in the pathogenesis of long-term complications such as hypertension, nephropathy, and hyperlipidemia. The high consumption of large(r) amounts of fructose facilitates the hepatic triacylglycerol production, in a process called *de novo lipogenesis*. This process leads to a “selective insulin resistance”, in which the inhibited-glucose metabolism by insulin signaling pathways is impaired while those that stimulates lipid metabolism are preserved, resulting in the devastating co-existence of hyperglycemia and hypertriglyceridemia (33,34).

Corroborating, our results show that fructose consumption promotes high triglycerides and insulin levels, increases the Langerhans islets area, altering glycemic behavior in response to exogenous insulin administration and fasting hyperglycemia, moving towards the impairment of insulin signaling cascade. In contrast, rats that received MOF incorporated to their diet presented normalized triglycerides, glucose metabolism and normal Langerhans islets area in the histopathological analysis. These results are consistent with recent studies that demonstrated the role of *M. oleifera* leaves in modulating hepatic key genes of the insulin signaling, reducing the hyperglycemia by minimizing gluconeogenesis, up-regulating the expression of hepatic IR and IRS-1, supporting the regeneration of damaged hepatocytes and pancreatic cells in rats (35,36). This effect could be in part related to the presence of chlorogenic acid that enhances insulin activity by triggering the AMP-activated protein kinase (AMPK) and by flavonoids that can promote the glucose uptake stimulation in peripheral tissues (37).

As previously cited, the liver histological analysis demonstrates that fructose promotes accumulation of triglycerides and cholesterol. This effect was previously reported by other studies (38,39) However, interestingly, triglyceride accumulation in the liver of fructose treated rats occurred in the absence of increased body weight or adiposity. According to Fabbrini *et al.* (2009) (40), intra-hepatic lipid content is a better predictor of metabolic abnormalities than body

Dos achados acima, a resistência à insulina foi observada em animais que receberam frutose. A resistência à insulina é um aspecto fundamental da etiologia do diabetes tipo 2 e desempenha papel importante não apenas no desenvolvimento da hiperglicemia do diabetes não insulino-dependente, mas também na patogênese de complicações a longo prazo, como hipertensão, nefropatia e hiperlipidemia. O alto consumo de maiores quantidades de frutose facilita a produção de triacilglicerol hepático, em um processo chamado de lipogênese de novo. Esse processo leva a uma “resistência seletiva à insulina”, na qual o metabolismo da glicose inibida pelas vias de sinalização da insulina é prejudicado enquanto aquelas que estimulam o metabolismo lipídico são preservadas, resultando na coexistência devastadora de hiperglicemia e hipertrigliceridemia (33,34).

Corroborando, nossos resultados mostram que o consumo de frutose promove níveis elevados de triglicérides e insulina, aumenta a área das ilhotas de Langerhans, altera o comportamento glicêmico em resposta à administração de insulina exógena e hiperglicemia de jejum, caminhando para o comprometimento da cascata de sinalização da insulina. Em contrapartida, os ratos que receberam MOF incorporado à dieta apresentaram triglicérides normalizados, metabolismo da glicose e área normal das ilhotas de Langerhans na análise histopatológica. É consistente com estudos recentes que demonstraram o papel das folhas de *M. oleifera* na modulação de genes-chave hepáticos da sinalização da insulina, reduzindo a hiperglicemia minimizando a gliconeogênese, regulando positivamente a expressão de IR e IRS-1 hepáticos, auxiliando na regeneração de células danificadas. hepatócitos e células pancreáticas em ratos (35,36). Esse efeito pode estar em parte relacionado à presença de ácido clorogênico que aumenta a atividade da insulina ao desencadear a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e por flavonóides que podem promover a estimulação da captação de glicose nos tecidos periféricos (37)

Conforme citado anteriormente, a análise histológica do fígado demonstra que a frutose promove acúmulo de triglicérides e colesterol. Esse efeito foi relatado anteriormente por outros estudos (38,39). No entanto, curiosamente, o acúmulo de triglicérides no fígado de ratos tratados com frutose ocorreu na ausência de maior peso corporal ou adiposidade. De acordo com Fabbrini *et al.* (2009) (40), o conteúdo lipídico intra-hepático é um melhor preditor de anormalidades metabólicas do que a adiposidade corporal. A deposição lipídica ectópica

adiposity. Ectopic lipid deposition induced by fructose is attributed to the activation of the transcription factor ChREBP and SREBP1c, which occurs during the fructose metabolism, and these transcription factors regulate the expression of several enzymes responsible for the fatty acid synthesis (41). It is believed that elevation in hepatic diacylglycerol (DAG) levels lead to protein kinase C (PKC) activation and its consequent translocation to the cell membrane, which results in inhibition of hepatic insulin signaling and development of hepatic insulin resistance.

In contrast, MOF diet supplementation was able to prevent the effect of fructose on hepatic lipid stores, probably due to its bioactive compounds such as quercetin which have been shown to alter gene expression of major regulators of hepatic cholesterol and triglycerides synthesis and uptake. The accumulation of liver lipids overloads the mitochondrial electron transport chain, which in turn leads to the increase of ROS and lipid peroxidation products. The increase of these mediators impairs mitochondrial function and reduces lipid β -oxidation, promoting even greater hepatic lipid deposition from this vicious cycle, creating a state of oxidative stress as a result of free radical production (42). Our results have shown an elevation in the hepatic MDA, an important biomarker of lipid peroxidation, and an impairment in the antioxidant defense system. As expected, the MOF supplementation induced lower levels of hepatic MDA, being itself a key antioxidant at the hub of numerous competing reactions.

As quercetin is the major compound of MOF, it is important to mention that according to literature data, only 5.3% of unchanged quercetin is bioavailable. Quercetin is ingested in the form of glycosides, and the glycosyl groups are released during mastication, digestion, and absorption. Afterwards, quercetin glycosides are converted to aglycone in the intestine before being absorbed into enterocytes by the action of glycosidases enzymes. Furthermore, more recent studies demonstrate that the biotransformation products of polyphenols can reach the tissues, and these metabolites are indeed found in higher concentrations than their “parent compounds” (43).

induzida pela frutose é atribuída à ativação do fator de transcrição ChREBP e SREBP1c, que ocorre durante o metabolismo da frutose, e esses fatores de transcrição regulam a expressão de várias enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos (41). Acredita-se que a elevação dos níveis hepáticos de diacilglicerol (DAG) leve à ativação da proteína quinase C (PKC) e sua consequente translocação para a membrana celular, o que resulta na inibição da sinalização hepática da insulina e no desenvolvimento de resistência hepática à insulina.

Em contraste, a suplementação da dieta com MOF foi capaz de prevenir o efeito da frutose nos estoques de lipídios hepáticos, provavelmente devido aos seus compostos bioativos, como a quercetina, que demonstraram alterar a expressão gênica dos principais reguladores da síntese e captação hepática de colesterol e triglicérides. O acúmulo de lipídios no fígado sobrecarrega a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, o que, por sua vez, leva ao aumento de EROs e produtos da peroxidação lipídica. O aumento desses mediadores prejudica a função mitocondrial e reduz a β -oxidação lipídica, promovendo ainda maior deposição hepática de lipídios a partir desse ciclo vicioso, criando um estado de estresse oxidativo como resultado da produção de radicais livres (42). Nossos resultados mostraram uma elevação do MDA hepático, um importante biomarcador da peroxidação lipídica, e um comprometimento do sistema de defesa antioxidante. Como esperado, a suplementação de MOF induziu níveis mais baixos de MDA hepático, sendo ele próprio um antioxidante chave no centro de inúmeras reações.

Sendo a quercetina o principal composto do MOF, é importante mencionar que, de acordo com dados da literatura, apenas 5,3% da quercetina inalterada é biodisponível. A quercetina é ingerida na forma de glicosídeos e os grupos glicosil são liberados durante a mastigação, digestão e absorção. Posteriormente, os glicosídeos de quercetina são convertidos em aglicona no intestino antes de serem absorvidos pelos enterócitos pela ação das enzimas glicosidases. Além disso, estudos mais recentes demonstram que os produtos de biotransformação dos polifenóis podem atingir os tecidos. E, de fato, esses metabólitos são encontrados em concentrações mais altas do que seus “compostos originais” (43).

Together, these findings demonstrated an efficient protective effect of MOF supplementation against adverse effects of fructose diet-induced metabolic syndrome and its first initial metabolic changes, like insulin resistance and associated cardiovascular disorders. The present results also highlight the deleterious effects of fructose consumption in early life which may lead to adults with severe metabolic syndrome and co-morbidities.

Strengths and limitations of the study

Although there are different murine models to mimic the metabolic syndrome, the decision about which model to use for a particular experiment is often multifactorial. The advantage of the model used in our study (over the genetic models) is that not the entire population is genetically affected and will develop metabolic syndrome. Another important point is the type of sugar used in the diet. We decided to use fructose because many studies have reported that the chronic consumption is strongly associated with a variety of related metabolic diseases, including obesity, systemic insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus.

The (unfortunately) wide consumption of soft drinks, which are mostly sweetened with high fructose syrup (60% + 40% sucrose), was another determinant in our selection of fructose.

Although this study was focused on the evaluation of MOF supplementation to prevent fructose metabolic disorders, one of the limitations of this work is the lack of knowledge of the mechanism through which MOF can modulate the metabolism to avoid the effects of high fructose diet. Another limitation of the study is related to the lack of quantification of sugars in the diet. In this context, is important to mention that the data here obtained *in vitro* and *in vivo* are preliminary, and further research is required to elucidate these points.

In addition, there is a lack of knowledge about the pharmacokinetics of MOF compounds to better understanding the metabolization and the delivery of metabolites to the tissues. In this context, further analyses are necessary to elucidate this point.

Juntos, esses achados demonstraram um efeito protetor eficiente da suplementação de MOF contra os efeitos adversos da síndrome metabólica induzida pela dieta de frutose e suas primeiras alterações metabólicas iniciais, como resistência à insulina e distúrbios cardiovasculares associados. Os presentes resultados também destacam os efeitos deletérios da frutose consumo no início da vida, o que pode levar a adultos com síndrome metabólica grave e comorbidades.

Pontos fortes e limitações do estudo

Embora existam diferentes modelos murinos para mimetizar a síndrome metabólica, a decisão sobre qual modelo usar para um determinado experimento é muitas vezes multifatorial. A vantagem deste modelo sobre os modelos genéticos é que nem toda a população é geneticamente afetada e pode desenvolver síndrome metabólica. Outro ponto importante é o tipo de açúcar utilizado na dieta. Decidimos usar frutose porque muitos estudos relataram que o consumo crônico está fortemente associado a uma variedade de doenças metabólicas relacionadas, incluindo obesidade, resistência sistêmica à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2.

Infelizmente, no mundo há um alto consumo de refrigerantes, que em sua maioria são adoçados com xarope rico em frutose (60% + 40% sacarose). Esta é uma das razões pelas quais decidimos usar este modelo de frutose.

Embora este estudo esteja focado em avaliar se a suplementação com MOF previne distúrbios metabólicos da frutose, uma das limitações deste trabalho é a falta de conhecimento do mecanismo pelo qual a suplementação com MOF pode modular o metabolismo para evitar os efeitos da dieta rica em frutose. Outra limitação do estudo está relacionada à falta de quantificação de açúcares na dieta. Nesse contexto, é importante mencionar que os dados aqui obtidos *in vitro* e *in vivo* são preliminares, sendo necessárias mais pesquisas para elucidar esses pontos.

Além disso, há uma falta de conhecimento sobre a farmacocinética dos compostos presentes na MOF para melhor compreensão da metabolização e entrega de metabólitos aos tecidos. Nesse contexto, mais análises são necessárias para elucidar esse ponto.

Conclusion

Taken together, the data herein presented show that *Moringa oleifera* flour prevents the high-fructose intake-initiated metabolic disorders. Phytochemical study of MOF demonstrated a series of phenolic compounds, which can be correlated with its *in vitro* antioxidant activity. *In vivo*, MOF prevented insulin resistance, dyslipidemia, and adipocyte hypertrophy. However, more studies are necessary to elucidate the mechanisms involved.

Authors Contributions Statement

Data collection: ICBC, ICZ, IRS, MFB, ADF, MJG, EAS, LB and SG; statistical analysis: ICBC, LB, JRS, RN, LV, NLMQ and IDM; analysis and interpretation of the data: JRS, NLMQ, IDM, AMOS and LV; drafting the manuscript: JRS, IDM and NLMQ; critical revision of the manuscript: JRS.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number: 429505/2018-3) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, cod. 001). I.C.B.T and M.F.B were Master students and are recipients of CAPES (Cod. 001) grants during the study. N.L.M.Q. and J.R.S. are CNPq researchers (process numbers 305550/2018-7 and 310326/2020-6).

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests.

Conclusão

Em conjunto, os dados aqui apresentados mostram que a farinha de *Moringa oleifera* previne os distúrbios metabólicos iniciais induzidos pela ingestão de frutose. O estudo fitoquímico do MOF demonstrou uma série de compostos fenólicos, o que está correlacionado com a atividade antioxidante apresentada nos estudos *in vitro*. *In vivo*, o MOF preveniu a resistência à insulina, dislipidemia e hipertrofia de adipócitos. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

Declaração de Contribuições dos Autores

Coleta de dados: ICBC, ICZ, IRS, MFB, ADF, MJG, EAS, LB e SG; análise estatística: ICBC, LB, JRS, RN, LV, NLMQ e IDM; análise e interpretação dos dados: JRS, NLMQ, IDM, AMOS e LV; redação do manuscrito: JRS, IDM e NLMQ; revisão crítica do manuscrito: JRS.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, número: 429505/2018-3) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, cod. 001). I.C.B.T e M.F.B eram alunos de mestrado e bolsistas da CAPES (Cod. 001) durante o estudo. N.L.M.Q. e J.R.S. são pesquisadores do CNPq (processos números 305550/2018-7 e 310326/2020-6).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver relações financeiras e/ou pessoais que possam apresentar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Ma, X., Lin, L., Yue, J., Wu, C. S., Guo, C. A., Wang, R., Yu, K. J., Devaraj, S., Murano, P., Chen, Z., & Sun, Y. (2017). Suppression of Ghrelin Exacerbates HFCS-Induced Adiposity and Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061302>
2. Mortera, R. R., Bains, Y., & Gugliucci, A. (2019). Fructose at the crossroads of the metabolic syndrome and obesity epidemics. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 24(2), 186–211. <https://doi.org/10.2741/4713>
3. Goss, M. J., Nunes, M. L. O., Machado, I. D., Merlin, L., Macedo, N. B., Silva, A. M. O., Bresolin, T. M. B., & Santin, J. R. (2018). Peel flour of *Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 848–854. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.03.137>
4. Ogunsina, B. S., Radha, C., & Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(2), 185–194. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526928>
5. Pari, L., & Kumar, N. A. (2004). Hepatoprotective Activity of *Moringa oleifera* on Antitubercular Drug-Induced Liver Damage in Rats. <https://Home.Liebertpub.Com/Jmf>, 5(3), 171–177. <https://doi.org/10.1089/10966200260398206>
6. Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, V. K., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R., & Gupta, R. S. (2012). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of Diabetes*, 4(2), 164–171. <https://doi.org/10.1111/J.1753-0407.2011.00173.X>
7. López, M., Ríos-Silva, M., Huerta, M., Cárdenas, Y., Bricio-Barrios, J. A., Díaz-Reval, M. I., Urzúa, Z., Huerta-Trujillo, M., López-Quezada, K., & Trujillo, X. (2018). Effects of *Moringa oleifera* leaf powder on metabolic syndrome induced in male Wistar rats: a preliminary study. *The Journal of International Medical Research*, 46(8), 3327. <https://doi.org/10.1177/0300060518781726>
8. Ghasi, S., Nwobodo, E., & Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(1), 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00106-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00106-3)
9. Daba, M.-H., Elmasry, A., & El-Karef, A. A. (2015). Effect of moringa oleifera with and without metformin on an experimental model of metabolic syndrome in rats. *International Journal of Advanced Research*, 3(10), 1624–1632.
10. Othman, A. I., Amer, M. A., Basos, A. S., & El-Missiry, M. A. (2019). *Moringa oleifera* leaf extract ameliorated high-fat diet-induced obesity, oxidative stress and disrupted metabolic hormones. *Clinical Phytoscience* 2019 5:1, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40816-019-0140-0>
11. Mehta, L. K., Balaraman, R., Amin, A. H., Bafna, P. A., & Gulati, O. D. (2003). Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2–3), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00075-8)
12. Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchoe, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
13. Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2), 165–170. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141/machinereadablecitation/ris>
14. Sanchez, M. B., Miranda-Perez, E., Verjan, J. C. G., de los Angeles Fortis Barrera, M., Perez-Ramos, J., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2017). Potential of the chlorogenic acid as multitarget agent: Insulin-secretagogue and PPAR α/γ dual agonist. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 94, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.086>
15. Ahangarpour, A., Sayahi, M., & Sayahi, M. (2019). The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 13(1), 854–857. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.051>
16. Scarminio, V., Fruct, A. C., Witacenis, A., Rall, V. L. M., & di Stasi, L. C. (2012). Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp AAA*) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 32(3), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.01.002>
17. Irondi, E. A., Olalekan Agboola, S., Oboh, G., Boligon, A. A., Linde Athayde, M., & Shode, F. O. (2016). Guava leaves polyphenolics-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension in vitro. *J Intercult Ethnopharmacol* •, 2. <https://doi.org/10.5455/jice.20160321115402>
18. Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R., & Haji Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/263897>
19. Storlien, L. H., Higgins, J. A., Thomas, T. C., Brown, M. A., Wang, H. Q., Huang, X. F., & Else, P. L. (2000). Diet composition and insulin action in animal models. *The British Journal of Nutrition*, 83 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114500001008>
20. Yuan, L., Wang, Y., Lu, C., & Li, X. (2013). Angiotensin-Converting Enzyme 2 Deficiency Aggravates Glucose Intolerance via Impairment of Islet Microvascular Density in Mice with High-Fat Diet. *Journal of Diabetes Research*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/405284>
21. Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J. A., Milagro, F., & Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2791–2796. <https://doi.org/10.1194/JLR.D023788>
22. Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
23. Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
24. Joung, H., Kim, B., Park, H., Lee, K., Kim, H. H., Sim, H. C., Do, H. J., Hyun, C. K., & Do, M. S. (2017). Fermented *Moringa oleifera* Decreases Hepatic Adiposity and Ameliorates Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. <https://Home.Liebertpub.Com/Jmf>, 20(5), 439–447. <https://doi.org/10.1089/JMF.2016.3860>
25. Omodanisi, E. I., Aboua, G. Y., & Oguntibeju, O. O. (2017). Therapeutic potentials and pharmacological properties of *Moringa oleifera* Lam in the treatment of diabetes mellitus and related complications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(7), 1737–1746. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i7.35>
26. Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
27. Valdez-Solana, M. A., Mejía-García, V. Y., Téllez-Valencia, A., García-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J. J., & Sierra-Campos, E. (2015). Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of moringa oleifera grown in Mexico. *Journal of Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/860381>
28. Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., & Abdely, C. (2012). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical reviews in biotechnology*, 32(4), 289–326. <https://doi.org/10.3109/073885512.011.630647>
29. Nimrouzi, M., Ruyvaran, M., Zamani, A., Nasiri, K., & Akbari, A. (2020). Oil and extract of safflower seed improve fructose induced metabolic syndrome through modulating the homeostasis of trace elements, TNF- α and fatty acids metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112721>

30. Ramírez-Higuera, A., Peña-Montes, C., Herrera-Meza, S., Mendoza-López, R., Valerio-Alfaro, G., & Oliart-Ros, R. M. (2020). Preventive Action of Sterculic Oil on Metabolic Syndrome Development on a Fructose-Induced Rat Model. *Journal of Medicinal Food*, 23(3), 305–311.
31. Lin, W. T., Chan, T. F., Huang, H. L., Lee, C. Y., Tsai, S., Wu, P. W., Yang, Y. C., Wang, T. N., & Lee, C. H. (2016). Fructose-Rich Beverage Intake and Central Adiposity, Uric Acid, and Pediatric Insulin Resistance. *The Journal of Pediatrics*, 171, 90-96.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.12.061>
32. Metwally, F. M., Rashad, H. M., Ahmed, H. H., Mahmoud, A. A., Abdol Raouf, E. R., & Abdalla, A. M. (2017). Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of Moringa oleifera in the experimental model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.007>
33. Anitha Nandhini, A. T., Balakrishnan, S. D., & Anuradha, C. v. (2002). Taurine improves lipid profile in rats fed a high fructose-diet. *Nutrition Research*, 22(3), 343–354. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00391-8)
34. Leavens, K. F., & Birnbaum, M. J. (2011). Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(3), 200–215. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.562481>
35. Abd El Latif, A., el Bialy, B. E. S., Mahboub, H. D., & Abd Eldaim, M. A. (2014). Moringa oleifera leaf extract ameliorates alloxan-induced diabetes in rats by regeneration of β cells and reduction of pyruvate carboxylase expression. *Biochemistry and Cell Biology. Biochimie et Biologie Cellulaire*, 92(5), 413–419. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0081>
36. Mohamed, M. A., Ahmed, M. A., & el Sayed, R. A. (2019). Molecular effects of Moringa leaf extract on insulin resistance and reproductive function in hyperinsulinemic male rats. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 18(2), 487. <https://doi.org/10.1007/s40200-019-00454-7>
37. Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>
38. Mock, K., Lateef, S., Benedito, V. A., & Tou, J. C. (2017). High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 39, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.09.010>
39. Muhammad, N., Ibrahim, K. G., Ndhlala, A. R., & Erlwanger, K. H. (2020). Moringa oleifera Lam. prevents the development of high fructose diet-induced fatty liver. *South African Journal of Botany*, 129, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.003>
40. Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B. S., Pietka, T., Abumrad, N. A., Patterson, B. W., Okunade, A., & Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15430–15435. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904944106>
41. Janevski, M., Ratnayake, S., Siljanovski, S., McGlynn, M. A., Cameron-Smith, D., & Lewandowski, P. (2012). Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food & Function*, 3(2), 141–149. <https://doi.org/10.1039/c1fo10111k>
42. Takaki, A., Kawai, D., & Yamamoto, K. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20704–20728. <https://doi.org/10.3390/IJMS141020704>
43. Chen, X., Yin, O. Q., Zuo, Z., & Chow, M. S. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical research*, 22(6), 892–901. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-4584-1>