UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MATHEUS CAVALCANTI DE BARROS

INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam.

Recife

2021

MATHEUS CAVALCANTI DE BARROS

INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profª Drª. Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife

2021

Catalogação na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Barros, Matheus Cavalcanti de
Investigação toxicológica e composição fitoquímica da infusão das folhas de *Moringa oleifera* Lam. / Matheus Cavalcanti de Barros – 2021.

77 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.
Inclui referências e anexo.

1. Plantas medicinais 2. Toxicidade- testes 3. Antioxidantes I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Título

615.321 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2021-127

MATHEUS CAVALCANTI DE BARROS

INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 09/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Alisson Macário de Oliveira (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força e inspiração que movem a minha vida.

À minha mãe, Tina Charles, por todos os ensinamentos, abraços e carinhos que não me fizeram cair mesmo nos momentos de maior dificuldade.

Ao meu pai, Valdomiro Alves, pelos incentivos para continuar.

À minha família, pois aqui está a consumação de um sonho que vai muito além de mim mesmo. Agradeço em especial à minha avó, Terezinha Cavalcanti, por sempre ter acreditado em mim e incentivado os meus estudos.

À Prof.ª Dr.ª Patrícia Maria Guedes Paiva, pelos preciosos ensinamentos e apoio que foram muito além dos muros da Universidade. Com a Professora, iniciei minha vida acadêmica no ano de 2015, quando comecei a primeira iniciação científica no Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Prof. Thiago Henrique Napoleão, por todos ensinamentos e apoio técnico, em especial na redação científica.

Ao Dr. Alisson Macário pelo apoio imprescindível nos experimentos e conselhos relativos aos trabalhos.

À Drª Larissa Cardoso Corrêa de Araújo Videres, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos desde o início da minha trajetória.

À Ana Gabrielle, aluna de iniciação científica que me acompanhou durante toda etapa experimental.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de proteínas, pela disponibilidade em colaborar e momentos compartilhados.

Aos amigos que não são da Universidade, agradeço por todo apoio nessa caminhada e pelas escutas, as quais foram essenciais para perseverar neste sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

A infusão das folhas de *Moringa oleifera* Lam. é usada pela população no tratamento de inflamação, hiperglicemia e para controle de peso. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a comercialização de alimentos que apresentem *M. oleifera* na sua composição devido à falta de dados sobre toxicidade. A presente dissertação investigou a composição fitoquímica, as atividades antioxidante e hemolítica *in vitro* e a toxicidade *in vivo* de infusão das folhas de *M. oleifera*. As folhas (10 g) foram adicionadas a água destilada e após 100 °C a 15 min, a mistura foi filtrada e liofilizada. A caracterização fitoquímica foi feita por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antioxidante foi avaliada pelos testes do DPPH e ABTS (31,25 - 1.000 µg/mL) e os resultados representados pela concentração de antioxidante que inibiu 50% dos radicais (IC_{50}). A atividade hemolítica foi realizada com eritrócitos de camundongos (31,25 - 1.000 µg/mL) e os resultados expressos como a concentração que promoveu 50% de hemólise (EC_{50}). O ensaio de toxicidade aguda usou camundongos albinos *Swiss* fêmeas administrados oralmente com dose única da infusão a 2000 e 5.000 mg/kg com posterior análise nas primeiras duas horas e durante 14 dias. Os animais foram avaliados quanto ao peso corporal, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos e histologia do fígado, baço e rins. A genotoxicidade e a mutagenicidade *in vivo* da infusão (2000 mg/kg) foi analisada através do ensaio cometa e teste do micronúcleo, respectivamente. A CCD detectou flavonoides, derivados cinâmicos e saponinas e a CLAE detectou derivados cinâmicos e flavonoides. Foram obtidos valores de 108,12 ± 1,59 µg EAT/mg para fenois totais, 2,69 ± 0,36 µg ER/mg para flavonoides e 0,74 ± 0,06 µg EC/mg para cumarinas. A infusão tem atividade antioxidante (CI_{50} 51,51 ± 4,54 µg/mL e 53,95 ± 3,26 µg/mL, nos testes do DPPH e ABTS, respectivamente) e não tem atividade hemolítica (CE_{50} superior a 1000 µg/mL). Na dose de 5.000 mg/kg os animais apresentaram taquicardia, aumento de ambulação e agitação nas primeiras duas horas de observação. As duas doses não alteraram o peso ou o consumo de água e ração, bem como os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos nos animais tratados. Genotoxicidade e mutagenicidade não foram detectadas na dose de 2000 mg/kg. O estudo revela que a infusão das folhas de *M. oleifera* é fonte de polifenois e agentes antioxidantes, os quais estão relacionados com suas aplicações biológicas.

Além disso, a preparação não é hemolítica, não tem toxicidade aguda e não causa efeito adverso ao material genético. Contudo, avaliação do comportamento dos animais indica o uso de doses até 2.000 mg/kg.

Palavras-chave: Antioxidante. Hemólise. Metabólitos. Planta. Toxicidade.

ABSTRACT

The *Moringa oleifera* Lam. leaves infusion is used by the population in the treatment of inflammation, hyperglycemia and for weight control. The Brazil's National Health Surveillance Agency (ANVISA) has prohibited the sale of foods that contain *M. oleifera* in their composition due to the lack of data regarding toxicity. The present dissertation investigated the phytochemical composition, antioxidant and hemolytic activities *in vitro* and *in vivo* toxicity of *M. oleifera* leaves infusion. The leaves (10 g) were added to distilled water and after 100 ° C at 15 min, the mixture was filtered and lyophilized. Phytochemical characterization was performed by thin layer chromatography (CCD) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated by the DPPH and ABTS tests (31.25 - 1,000 µg/mL) and the results represented by the concentration of antioxidant that inhibited 50% of the radicals (IC_{50}). Hemolytic activity was performed with mouse erythrocytes (31.25 - 1,000 µg/mL) and the results expressed as the concentration that promoted 50% of hemolysis (EC_{50}). The acute toxicity test used female *Swiss* albino mice administered orally with a single dose of the infusion at 2000 and 5,000 mg/kg with subsequent analysis in the first two hours and for 14 days. The animals were evaluated for body weight, water and feed consumption, biochemical and hematological parameters and histology of the liver, spleen and kidneys. *In vivo* genotoxicity and mutagenicity of the infusion (2,000 mg/kg) were analyzed using the comet assay and micronucleus test, respectively. CCD detected flavonoids, cinnamic derivatives and saponins and HPLC detected cinnamic derivatives and flavonoid. Values of 108.12 ± 1.59 µg TAE/mg were obtained for total phenols, 2.69 ± 0.36 µg RE/mg for flavonoids and 0.74 ± 0.06 µg CE/mg for coumarins. The infusion has antioxidant activity (IC_{50} = 51.51 ± 4.54 µg/mL and 53.95 ± 3.26 µg/mL, in the DPPH and ABTS tests, respectively) and has no hemolytic activity (EC_{50} greater than 1000 µg / mL) mL). At a dose of 5,000 mg / kg, the animals presented tachycardia, increased ambulation and agitation in the first two hours of observation. The two doses did not change the weight or consumption of water and feed, as well as the biochemical, hematological and histological parameters in the treated animals. Genotoxicity and mutagenicity were not detected at a dose of 2000 mg / kg. The study reveals that the infusion of *M. oleifera* leaves is a source of polyphenols and antioxidants, which are related to their biological applications. In addition, the preparation is not hemolytic, has no acute toxicity and does not cause adverse effect

on the genetic material. However, evaluation of the animals' behavior indicates the use of doses up to 2,000 mg/kg.

Keywords: Antioxidant. Hemolysis. Metabolites. Plant. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Aspectos gerais da *Moringa oleifera* (A), folhas compostas (B), flores e inflorescência (C), fruto capsular (D) e sementes aladas (E). 18

Figura 2 – Potenciais medicinais das folhas de *Moringa oleifera* 21

Figura 3 – Potencial nutricional das folhas de *M. oleifera* em comparação a outros vegetais. 25

Figura 4 – Produtos à base das folhas de *M. oleifera*. 29

Figura 5 – Principais etapas do procedimento geral do ensaio cometa: as células são embutidas em agarose na superfície de uma lâmina microscópica (A), lisadas para produzir nucleoides (B) e submetidas à eletroforese para obtenção de cometas (C). 33

Figura 6 Cinética de maturação de eritrócitos e evolução temporal do dano cromossômico induzido em eritroblastos e expresso como micronúcleo. 33

ARTIGO 2

Figura 1 – Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a infusão de folhas de *Moringa oleifera*. Legenda: (A) Impressão digital da infusão (a-h: compostos detectados) e substância de referência (rutina-f). (B) Espectro de UV dos oito compostos detectados na infusão (a - b: derivados cinâmicos; c - h: compostos característicos de flavonoides). 61

Figura 2 – Fotomicrografias representativas do fígado, rim e baço de camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com infusão de folhas de *M. oleifera* nas doses de 2.000 e 5.000 mg/kg. 62

Figura 3 – Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade da infusão de folhas de *M. oleifera* (2.000 mg/kg). 63

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Usos de *Moringa oleifera*.....19

ARTIGO 2

Tabela 1 – Conteúdo de fenois totais, flavonoides e cumarinas e atividade antioxidante do extrato das folhas de *M. oleifera*.....58

Tabela 2 – Consumo de água (mL/animal/dia) e ração (g/animal/dia) e ganho de peso corporal (g) em camundongos tratados com dose única (2.000 e 5.000 mg/kg) da infusão das folhas de *M. oleifera*. 58

Tabela 3 – Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com dose única da infusão das folhas de *M. oleifera* (2.000 e 5.000 mg/kg). 59

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com dose única da infusão das folhas de *M. oleifera* (2.000 e 5.000 mg/kg). 60

Tabela 5 – Avaliação do peso relativo (mg/g do peso corporal do animal) de camundongos tratados com dose única (2.000 e 5.000 mg / kg) da infusão das folhas de *M. oleifera*.....60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCl_4	Tetracloreto de carbono
CE	Concentração de efeito
CI	Concentração Inibitória
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DE/100g	Equivalentes de diosgenina por 100g
DNA	Ácido dexorribonucleico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EROs	Espécies reativas de oxigênio
$FeSO_4$	Sulfato de Ferro
FMDV	Vírus da febre aftosa
GAE/100g	Equivalentes de ácido gálico por 100g
GSH	Glutationa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV-1	Vírus herpes
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
ONG	Organização Não Governamental

PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
pH	Potencial hidrogeniônico
TAE/100g	Equivalentes de ácido tânico por 100g
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UI	Unidade internacional para medição de Vitamina A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **14**

2 OBJETIVOS 16

2.1 OBJETIVO GERAL 16

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

3 REFERENCIAL TEÓRICO 17

3.1 *Moringa oleifera* 17

3.1.1 Potenciais medicinais das folhas de *M. oleifera* **20**

3.1.2 Potencial nutricional das folhas de *M. oleifera* **24**

3.1.3 Composição fitoquímica **27**

3.2 PRODUTOS À BASE DAS FOLHAS DE *M. oleifera* 28

3.3 TOXICIDADE DE PLANTAS 29

3.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PARA O REGISTRO PRODUTOS VEGETAIS 30

3.5 GENOTOXICIDADE 32

4 ARTIGO 1 – Moringa oleifera toxicology: An Overview 34

5 ARTIGO 2 – **Composição fitoquímica, atividade antioxidante e toxicidade aguda da infusão das folhas de *Moringa oleifera* Lam.** 35

6 CONCLUSÕES 64

REFERÊNCIAS 65

ANEXO A - Resolução n° 1.478/2019 77

1 INTRODUÇÃO

Moringa oleifera Lam. (Moringaceae), também conhecida como moringa, cedro ou quiabo-de-quina, é nativa do sul da Ásia, na região do Himalaia, do nordeste do Paquistão ao norte da Bengala ocidental - Índia, sendo também amplamente cultivada na África e América do Sul, especialmente no Nordeste brasileiro (AYERZA, 2012). Basicamente todas as partes da planta possuem relevância econômica ou medicinal, motivo pelo qual ficou conhecida como a árvore maravilhosa ou milagrosa em muitos países (CHUMARK et al., 2008).

As folhas de *M. oleifera* têm sido usadas como suplemento dietético devido ao seu conteúdo nutricional, apresentando quantidades consideráveis de minerais essenciais, vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos (MOYO et al., 2011). Folhas frescas dessa planta possuem 4 vezes a quantidade de vitamina A da cenoura, 7 vezes a vitamina C da laranja, 4 vezes o cálcio do leite e 3 vezes o potássio da banana (THURBER; FAHEY, 2009). A riqueza nutricional dessa planta fez com que ela fosse indicada como uma alternativa sustentável de suplemento alimentar para aqueles que sofrem de desnutrição, especialmente nos países em desenvolvimento (GUPTA et al., 2018).

Além de potencial nutricional, as folhas de *M. oleifera* têm demonstrado diversas propriedades medicinais importantes, incluindo atividade antioxidante (VONGSAK et al., 2013), anticancerígena (BERKOVICH et al., 2013), antimicrobiana (MANDAL et al., 2014), hipotensora (BOSE, 2007) e cicatrizante (MUHAMMAD et al., 2013).

A infusão das folhas é umas das formas de uso mais empregadas pela população, sendo utilizada na medicina popular como alternativa anti-inflamatória e hipoglicêmica, bem como para controle de peso e muitos outros usos (COZ-BOLAÑOS et al., 2018). Produtos à base das folhas dessa planta são comercializados no Brasil e envolvem a formulação das folhas em cápsulas para a suplementação alimentar, sabonetes e outros cosméticos, chás e alimentos.

Existe uma percepção na população que o uso de plantas no tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz (CAMPOS et al., 2016). Apesar disso, a utilização de plantas para fins medicinais pode provocar o surgimento de efeitos indesejados, por vezes com risco à vida (ELVIN-LEWIS, 2001). A exposição a agentes tóxicos de plantas pode ocasionar danos ao material genético e a órgãos, tais como

pele, fígado, rins e cérebro (KLAASSEN; WATKINS, 2012; VILLASENOR; LIMSYLIANCO; DAYRIT, 1989).

A realização de testes visando determinar a toxicidade é essencial, visto que este fator pode limitar o uso biotecnológico e farmacológico de novos produtos (ARAÚJO et al., 2013). Por isso, as agências regulatórias requerem estudos toxicológicos para o registro de novos produtos, mesmo que sejam de origem natural. Nesse sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a comercialização, distribuição, fabricação, importação e propaganda de alimentos que apresentem *M. oleifera* na sua composição, por meio da Resolução nº 1.478/2019, considerando não haver avaliação e comprovação de segurança do uso da espécie. Desta forma, os potenciais usos das folhas de *M. oleifera* e a escassez de estudos que garantam a segurança da sua utilização, justificam a avaliação da infusão das folhas dessa planta quanto à toxicidade, composição fitoquímica e atividade antioxidante.

2 **OBJETIVOS**

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a toxicidade da infusão das folhas de *Moringa oleifera* a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo* em camundongos albinos *Swiss*, caracterizar a composição fitoquímica dessa preparação e avaliação de atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a infusão das folhas de *M. oleifera*;
- Avaliar a atividade hemolítica *in vitro* da infusão;
- Investigar a toxicidade aguda da infusão das folhas de *M. oleifera;*
- Determinar a genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* da infusão utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleo, respectivamente;
- Identificar polifenois presentes na infusão através de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Quantificar o conteúdo de fenois totais, flavonoides e cumarinas na amostra;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da preparação através dos testes do DPPH e ABTS.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

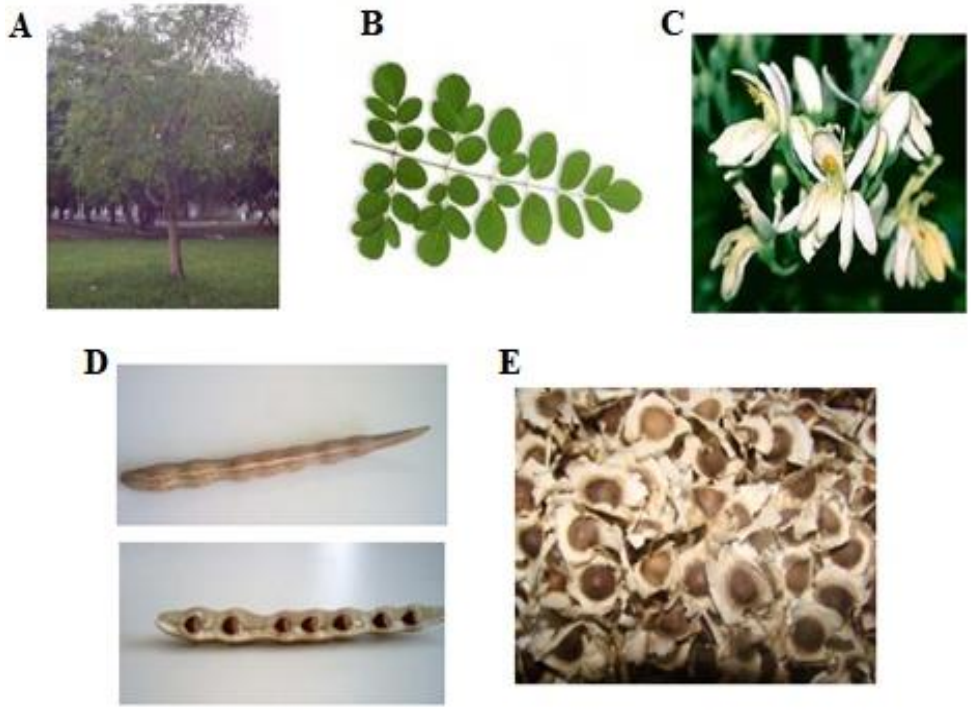
3.1 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera é a mais conhecida e estudada das treze espécies que compõem a família monogenérica Moringaceae (LEONE et al., 2015). Também conhecida como moringa, cedro ou quiabo-de-quina, a planta é nativa do sul da Ásia, na região do Himalaia, do nordeste do Paquistão ao norte da Bengala ocidental - Índia (SHARMA et al., 2011; FAHEY, 2005). Originalmente, é uma planta de região semiárida, mas adapta-se a uma ampla variedade de condições ambientais pouco favoráveis, como baixa disponibilidade de água e solos pouco férteis (HASSAN; IBRAHIM, 2013). Desta forma, além da Ásia, também é amplamente cultivada em diversas regiões do mundo, como na África (ex. Nigéria e Egito) e na América do sul (ex. Paraguai e nordeste do Brasil) (AYERZA, 2011; RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980).

A moringa (Figura 1) é geralmente considerada uma árvore de pequeno ou médio porte, podendo atingir 5 a 15 metros de altura e 20 a 40 cm de diâmetro de caule (ARAÚJO, 2010; SÁNCHEZ-MACHADO; LOPEZ-CERVANTES; VÁZQUEZ, 2006). As folhas (Figura 1B) medem de 30 a 60 cm de comprimento, são pecioladas, bi ou tripinadas, compostas e imparipinadas, com 3 a 9 folíolos obovados medindo de 1,5 a 2,5 cm (HASSAN; IBRAHIM, 2013). As flores pentâmeras estão dispostas em inflorescências do tipo cimosa, possuem coloração branco-amarelada e aroma doce (Figura 1C). Os frutos (Figura 1D) possuem de 30 a 120 cm e apresentam formato capsular, dividindo-se em três valvas que abrigam cerca de 20 sementes aladas oleaginosas de cor marrom (Figura 1E) (RADOVICH, 2011).

M. oleifera é considerada uma planta de curta duração, alcançando 20 anos em média. Seu desenvolvimento pode ocorrer por meio de semeadura ou estaquia, dependendo das condições de produção (SÁNCHEZ-MACHADO; LOPEZ-CERVANTES; VÁZQUEZ, 2006). Uma árvore pode produzir por ano cerca de 1.600 frutos, totalizando em média 24.000 sementes e a produção de folhas pode ser aumentada ou mantida com poda frequente (ARAÚJO, 2010). O principal produtor de moringa é a Índia, com uma produção anual de 1,1 a 1,3 milhão de toneladas de frutos, sendo 90% desse total produzidos nos estados do sul e informações sobre a produção em outros países são escassas (AYERZA, 2011; RAJANGAM, 2001).

Figura 1 – Aspectos gerais da *Moringa oleifera* (A), folhas compostas (B), flores e inflorescência (C), fruto capsular (D) e sementes aladas (E).



Fonte: Rolim (2007); Santos (2007)

Devido à alta taxa de assimilação de CO_2, *M. oleifera* pode desempenhar um papel importante na redução do aquecimento global, atuando como reservatório desse gás (THAKUR; BAJAGAIN, 2020). Além disso, todas as partes da planta podem ser tradicionalmente usadas para diferentes fins (Tabela 1), com destaque para os medicinais e nutricionais, motivo pelo qual tornou-se conhecida em diversos lugares do mundo como “árvore milagrosa” (DABA, 2016; ASHFAQ; BASRA; ASHFAQ, 2012).

Árvores de *M. oleifera* também são utilizadas como cercas ou para ornamentação, e a madeira é relativamente macia, sendo bastante usada como combustível para cozinhar e para a fabricação de papel (SEIFU; TEKETAY, 2020; ARAÚJO, 2010). Das cascas podem ser usadas as fibras como cordas ou as preparações aquosas ou alcoólicas para o tratamento de diabetes, hipertensão e picadas de cobra ou escorpião (POPOOLA; OBEMBE, 2013). A raiz é empregada para alimentação no leste africano, bem como anti-helmíntico e para tratar dor de dente (POPOOLA; OBEMBE, 2013). Adicionalmente, o extrato metanólico da raiz dessa planta apresentou efeito anti-inflamatório quando avaliado no modelo de bolsão de ar (GEORGEWILL; GEORGEWILL; NWANKWOALA, 2010).

Tabela 1 – Usos de *Moringa oleifera*

Parte da planta	Usos	Parte da planta	Usos
Sementes	• Biocombustíveis; • Alimentação humana e de outros animais; • Usos industriais (ex: fabricação de cosméticos e lubrificação); • Medicina popular.	**Madeira**	• Lenha; • Carvão vegetal; • Papel; • Gomas; • Medicina popular.
Flores	• Alimentação humana; • Ornamentação; • Medicina popular; • Produção de mel.	**Casca**	• Corantes; • Produção de cordas; • Medicina popular.
Fruto	• Carvão ativado; • Alimentação humana; • Medicina popular.	**Raiz**	• Alimentação humana; • Medicina popular.
Folhas	• Biomassa; • Suplemento alimentar animal; • Alimentação humana; • Medicina popular;		• Potencializador de crescimento vegetal; • Biopesticida.

Fonte: Adaptado de Pereira (2015)

As flores de *M. oleifera* podem ser consumidas *in natura* e o néctar também é utilizado para produção de mel (HASSAN; IBRAHIM, 2013). Popularmente são utilizadas como antiartríticas, agentes hipocolesterolêmicos e para tratar resfriados (DABA, 2016). Além disso, de acordo com Rocha-Filho et al. (2015), o extrato aquoso das flores apresenta atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário natural da esquistossomose. Os frutos são geralmente consumidos cozidos e na medicina popular são utilizados no tratamento de problemas no fígado, diarreia e dores nas articulações (DABA, 2016). Arora e Onsare (2014) demonstraram o alto potencial antimicrobiano do extrato acetônico do fruto dessa planta

(concentração mínima bactericida, CMB, de 300 mg/L) contra um isolado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

As sementes têm sido empregadas em muitos lugares, incluindo no nordeste do Brasil, onde água potável é escassa, para o tratamento de água para consumo humano devido à presença de moléculas coagulantes (FERREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 1999). O óleo das sementes pode ser utilizado na culinária geral, na lubrificação de relógios e outras maquinarias delicadas, na fabricação de perfumes e como combustível (SANTOS et al., 2015). O extrato aquoso das sementes apresentou atividades larvicida e ovicida contra *Aedes aegypti*, mosquito transmissor dos vírus causadores da febre amarela, chikungunya e dengue (SANTOS et al., 2012; COELHO et al., 2009). Ademais, outros estudos têm demonstrado as atividades anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana das sementes (OLIVEIRA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2013)

Apesar de basicamente todas as partes de *M. oleifera* serem empregadas para alguma finalidade, a folha geralmente é a mais utilizada tradicionalmente devido à facilidade de obtenção, alta concentração de metabólitos ativos e o não comprometimento da planta durante a coleta (SIVASANKARI; ANANDHARAJ; GUNASEKARAN, 2014). As folhas são ricas em fito-hormônios e na agricultura podem ser usadas como estimulador natural do crescimento das plantas, aumentando o rendimento de diferentes culturas (ASHFAQ; BASRA; ASHFAQ, 2012). Outros relatos científicos indicam o uso das folhas para a produção de biogás e como agente de limpeza doméstica (PALIWAL; SHARMA; PRACHETA, 2011). Embora haja um amplo espectro de aplicações para as folhas de *M. oleifera*, o que torna essa parte a mais reconhecida e utilizada pela população são as propriedades medicinais e nutricionais que apresenta.

3.1.1 Potenciais medicinais das folhas de *M. oleifera*

Estudos etnobotânicos envolvendo *M. oleifera* indicam que preparações obtidas a partir das folhas dessa planta são tradicionalmente empregadas para o tratamento de malária, febre tifoide, artrite, inchaços, cortes, hipertensão, bem como para estimular a lactação e melhorar o sistema imunológico (SIVASANKARI; ANANDHARAJ; GUNASEKARAN, 2014; POPOOLA; OBEMBE, 2013). Além disso, infusões e outras preparações aquosas têm sido utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório,

hipoglicêmico e para controle de peso (COZ-BOLAÑOS et al., 2018). Nesse sentido, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de comprovar os potenciais medicinais (Figura 2) das folhas dessa planta e elucidar seus mecanismos de ação.

Figura 2 – Potenciais medicinais das folhas de *Moringa oleifera*

Fonte: O autor

Devido à alta quantidade de polifenois, o potencial antioxidante das folhas de *M. oleifera* tem sido amplamente relatado na literatura, tanto a partir de abordagens *in vitro* como *in vivo*. Siddhuraju e Becker (2003) observaram que os extratos aquoso, hidrometanólico e hidroalcóolico de folhas de moringa coletadas em diferentes regiões da Índia inibiram de 89,7% a 92,0% a peroxidação do ácido linoleico de maneira dose-dependente (EC_{50}= 0,08 – 0,3 mg/mL). Além disso, o extrato hidroalcóolico das folhas também exibiu alta atividade antioxidante através do método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - DPPH (EC_{50} = 62,94 µg/mL) e do poder de redução do íon ferro - FRAP (51,50 mmol $FeSO_4$ equivalentes/100 g extrato) (VONGSAK et al., 2013). O extrato etil-acetato das folhas (50 e 100 mg/kg) administrado oralmente durante 14 dias em ratos intoxicados com tetracloreto de carbono (CCl_4) foi capaz de reduzir os danos oxidativos causados por esse composto, tais como o aumento dos níveis de peroxidação lipídica e o decaimento da atividade da superóxido dismutase e catalase (VERMA et al., 2009). Adicionalmente, Luqman et al. (2012) observaram uma alta

correlação positiva entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados para as propriedades antioxidantes do extrato aquoso e etanólico das folhas de *M. oleifera*. De acordo com os autores, o extrato aquoso foi mais eficaz em melhorar os marcadores de estresse oxidativo, aumentando os níveis de glutationa (GSH) e reduzindo os níveis de peroxidação lipídica em camundongos tratados oralmente.

De acordo com Lin, Zhang e Chen (2018), a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) está diretamente relacionada a prevenção de doenças não transmissíveis, como obesidade e diabetes. Segundo Manohar et al. (2012), o tratamento de coelhos saudáveis com o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* (200 mg/kg) diminuiu significativamente os níveis sanguíneos de glicose após duas horas (14,01% de redução), além disso, o mesmo tratamento em coelhos diabéticos provocou redução máxima de glicose de 15,2% duas horas após o tratamento. O alto potencial antidiabético do extrato aquoso das folhas de moringa também foi confirmado experimentalmente em ratos albinos a partir de análises histomorfométricas e ultra-estruturais das células-beta pancreáticas (YASSA; TOHAMY, 2014). Estudos com modelos animais (BAIS; SINGH; SHARMA, 2014; CHUMARK et al., 2008) e em humanos (NAMBIAR et al., 2010) tem relatado os efeitos hipolipidêmicos das folhas de *M. oleifera*, tais como redução dos níveis de triglicerídeos e aumento de HDL (high-density lipoprotein).

In vitro, macrófagos derivados de monócitos humanos previamente tratados com a fração etil-acetato das folhas e posteriormente expostos a um extrato etanólico de cigarro apresentaram redução na produção do fator de necrose tumoral (TNF-α), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 8 (IL-8) a nível proteico e de RNAm (KOOLTHEAT et al., 2014). Resultados similares foram observados para um concentrado do extrato aquoso das folhas, o qual diminuiu significativamente a expressão gênica e a produção de marcadores inflamatórios em macrófagos RAW utilizando modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (WATERMAN et al., 2014). *In vivo*, o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* (10, 30 e 100 mg/kg) apresentou atividade anti-inflamatória de maneira dose-dependente no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (SULAIMAN et al., 2008). Em relação ao efeito imunomodulador, os extratos metanólico e etanólico das folhas estimularam a resposta imune celular e humoral (GUPTA et al., 2010; SUDHA et al., 2010).

Resultados similares também foram observados para os extratos aquoso e hidroalcóolico (EL SHANAWANY et al., 2019; BANJI; BANJI; KAVITHA, 2012).

O potencial anticâncer das folhas de *M. oleifera* tem sido demonstrado a partir de diferentes abordagens experimentais. Potestà et al. (2019) observaram que o efeito citotóxico do extrato aquoso das folhas foi dependente da dose (a partir de 0,01 mg/mL) e do tipo celular, uma vez que as células Jukart (linfoblastos leucêmicos de células T) e células THP1 (monócitos leucêmicos) foram mais suscetíveis aos tratamentos que as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs). Em uma abordagem *in vivo* utilizando um modelo de tumor de melanoma murino, Purwal et al. (2010) observaram que a administração oral de 500 mg/kg durante 15 dias dos extratos metanólico e hidrometanólico das folhas de *M. oleifera* promoveu o retardo no crescimento de tumores e um aumento significativo da expectativa de vida dos animais de 48% e 32%, respectivamente.

No tocante à atividade antibacteriana, Abalaka et al. (2012) observaram que os extratos aquoso e clorofórmico das folhas apresentaram valores de concentração mínima inibitória (CMI) entre 10 e 20 mg/mL e CMB entre 20 e 40 mg/mL para as cepas gram-negativas *Escherichia coli, Salmonella typhi e Pseudomonas aeruginosa*. Estudos desenvolvidos com o método de diluição em disco têm indicado atividade das folhas dessa planta contra cepas gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* faecalis (MANDAL et al., 2014; PEIXOTO et al., 2011). A atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas foi observado contra os dermatófitos *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis* (OLUDURO, 2012; CHUANG et al., 2007). Além disso, extratos das folhas inibiram o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus herpes (HSV-1) e o vírus da febre aftosa (FMDV) (KUROKAWA et al., 2016; YOUNUS et al., 2016; SANGAR et al., 2015). De acordo com Biswas et al. (2020), os mecanismos de ação antiviral dos extratos das folhas envolvem a inibição da replicação viral resultante da ligação a proteínas e enzimas, bem como a ativação da imunidade celular.

Em relação aos efeitos protetores, o extrato aquoso das folhas neutralizou significativamente os impactos hemato e imunotóxicos promovidos pela melamina, um contaminante alimentar, e melhorou a fragilidade osmótica dos eritrócitos de ratos Wistar expostos a vapor de gasolina (ABD-ELHAKIM et al., 2018; AZEEZ et al., 2017).

De acordo com Hannan et al. (2014), o extrato etanólico das folhas possui um efeito neuroprotetor, promovendo a sobrevivência neuronal e crescimento de neuritos. Ademais, o extrato aquoso (100 mg/kg) administrado por via oral em dose única restaurou o dano cardíaco promovido pelo fosforeto de alumínio em ratos (GOUDA; EL-NABARAWY; IBRAHIM, 2018). A administração do extrato etanólico por 30 dias também reduziu marcadores de danos hepáticos em ratos expostos a hidrocarbonetos e ao antibiótico levofloxacina (FARID; HEGAZY 2019; AIRAODION et al., 2019).

Em estudo conduzido por Dahiru et al. (2006), o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* apresentou efeito antiulcerogênico em ratos utilizando o modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina. Resultados similares foram observados para o extrato etanólico das folhas, o qual foi capaz de reduzir úlceras gástricas induzidas por etanol e aspirina (VERMA et al., 2012). Adicionalmente, preparações obtidas a partir das folhas também apresentaram potencial cicatrizante a partir do aumento significativo da proliferação, viabilidade e migração de fibroblastos dérmicos humanos (CHIN et al., 2018; MUHAMMAD et al., 2013). Uma formulação de creme contendo 3% do extrato das folhas de *M. oleifera* aumentou o efeito de revitalização da pele em humanos sobre parâmetros como textura, rugosidade e suavidade (ALI; AKHTAR; CHOWDHARY, 2014).

Folhas de *M. oleifera* contêm glicosídeos nitrílicos, niazirina e niazirinina, compostos que são relacionados à atividade hipotensiva (BOSE, 2007). George, Ajayi, Oyemike (2018) demonstraram a eficiência do extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* no controle da hipertensão arterial sistêmica e ocular em trinta humanos adultos normotensivos (idade média de 28,93 ± 1,62) de maneira dose-dependente. Outro estudo demonstrou que o efeito anti-hipertensivo do extrato aquoso das folhas em ratos pode ser mediado pelo alívio da disfunção vascular e do estresse oxidativo, bem como pela promoção do vasorrelaxamento dependente do endotélio (AEKTHAMMARATA; PANNANGPETCH; TANGSUCHARIT, 2019).

3.1.2 Potencial nutricional das folhas de *M. oleifera*

Devido ao alto conteúdo nutricional, *M. oleifera* também tem sido usada para combater a desnutrição nos países tropicais em desenvolvimento, especialmente entre mães que amamentam e crianças (GUPTA et al., 2018). As folhas apresentam quantidades consideráveis de vitaminas, minerais essenciais, aminoácidos e ácidos

graxos (MOYO et al., 2011). De acordo com a Organização Não Governamental (ONG) *Trees of Life*, folhas dessa planta possuem aproximadamente 4 vezes a quantidade de vitamina A da cenoura, 7 vezes a vitamina C da laranja, 4 vezes o cálcio do leite e 3 vezes o potássio da banana (Figura 3) (THURBER; FAHEY, 2009).

Figura 3 – Potencial nutricional das folhas de *M. oleifera* em comparação a outros vegetais.

Fonte: Adaptado de Trees for life (2011)

M. oleifera tem sido reconhecida devido à alta quantidade de nutrientes que apresenta, tais como proteínas, ácidos graxos, fibras, carboidrato, vitaminas e aminoácidos essenciais (STADTLANDER; BECKER, 2017). De acordo com Teixeira et al. (2014), a farinha das folhas (g/100g) contém 28,7% de proteína bruta, 7,1% de gordura, 10,9% de cinzas e 44,4% de carboidratos, bem como perfil proteico (mg/g) de 3,1% de albumina, 0,3% de globulinas, 2,2% de prolamina, 3,5% de glutelina e 70,1% de proteínas insolúveis. Nas folhas estão presentes todos os aminoácidos essenciais, dentre os quais os mais abundantes são o ácido glutâmico (2,66 g/100g), ácido aspártico (2,185 g/100g) e leucina (2,07 g/100g). No que diz respeito à composição de açúcares, observou-se a predominância de glicose (6,65 g/100g) e frutose (3,96 g/100g) (AL-JUHAIMI et al., 2017a). Mais da metade (57%) dos ácidos graxos das folhas são insaturados, sendo o ácido α-linoleico o mais abundante (AL-JUHAIMI et al., 2016; MOYO et al., 2011).

Folhas de *M. oleifera* também representam uma boa fonte de minerais, os quais estão envolvidos em processos essenciais como a coagulação sanguínea e a produção de energia (DHAKAR et al., 2011). Tal efeito pode ser resultado da expressão de transportadores e proteínas de armazenamento de minerais, conforme relatado por Pasha et al. (2019). Folhas frescas e secas, respectivamente, possuem altos teores de cálcio (440 e 2185 mg/100g), potássio (259 e 1236 mg/100g), magnésio (42 e 448 mg/100g), ferro (0,85 e 25,6 mg/100g) e outros minerais (MULYANINGSIH; YUSUF, 2018; GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016). Comparativamente, de acordo com a Tabela brasileira de composição de alimentos, a banana da terra possui 328 mg/100g de potássio e o leite integral contém 123 mg/100g de cálcio (UNICAMP, 2011). Além disso, a administração das folhas de *M. oleifera* como suplemento dietético de ferro em ratos demonstrou ser mais eficiente e benéfica no combate aos efeitos da deficiência de ferro comparado a suplementos sintéticos (SAINI et al., 2014).

Em relação à composição vitamínica, folhas frescas contêm de 11.300 a 23.000 UI de vitamina A (FERREIRA et al., 2008; RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). O conteúdo de β-caroteno, composto provitamina A, varia em folhas frescas (6,6 mg/100g de extrato seco), secas (18,5 mg/100g) e liofilizadas (66 mg/100g) (MOYO et al., 2011; ZHANG et al., 2011; KIDMOSE et al., 2006). Comparativamente, a cenoura apresenta 3,4 mg/100g de β-caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA.; AMAYA-FARFAN, 2008). Em adição, folhas liofilizadas apresentaram 271 mg/100g de vitamina C, enquanto a laranja (*Citrus aurantium* L.) possui 34,7 mg/100g (UNICAMP, 2011; ZHANG et al., 2011). Folhas frescas de *M. oleifera* também são fontes de vitamina E (9,0 mg/100g) e de vitaminas do complexo B, tais como tiamina (0,06 mg/100g) e riboflavina (0,05 mg/100g) (CHING; MOHAMEDE, 2001; RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980).

Vários estudos têm relacionado folhas de *M. oleifera* à fortificação de alimentos, cujo principal objetivo envolve a adição de nutrientes essenciais a alimentos básicos para melhorar seu valor nutricional (OYEYINKA; OYEYINKA, 2016). A utilização de folhas de *M. oleifera* para a fabricação de pão em diferentes proporções promoveu aumento significativo nos teores proteicos e de fibra bruta (CHINMA; ABU; AKOMA, 2014; SENGEV; ABU; GERNAH, 2013). A adição de 10% da farinha das folhas para

a produção de biscoitos aumentou significativamente o conteúdo de proteínas (8,8 para 11,6 g %), ferro (1,9 para 5,09 mg %), cálcio (33,8 para 272,3 mg %) e β-caroteno (0 para 1.600 µg %) (DACHANA et al., 2010). O uso das folhas de *M. oleifera* na fortificação de produtos lácteos, como iogurte e queijo também tem sido reportado (KUIKMAN; O'CONNOR, 2015; SALEM et al., 2013). Apesar da melhoria nutricional, a utilização das folhas de *M. oleifera* como fortificante ainda necessita ser aprimorada devido à perda de qualidades sensoriais que interferem na aceitação do produto, tais como a cor, o sabor e o aroma (OYEYINKA; OYEYINKA, 2016).

Folhas de *M. oleifera* também apresentam grande potencial como recurso alimentar para animais não humanos. A inclusão da farinha das folhas (25, 50, 75 e 100%) ao invés da torta de sementes de algodão na dieta de carneiros não afetou o ganho de peso e apresentou taxa de conversão alimentar similar ao controle (ADEGUN et al., 2013). Coelhos alimentados com folhas de *M. oleifera* (20, 40 e 60%) por 8 semanas aumentaram significativamente o consumo de ração e ganho de peso corporal em relação aos da dieta controle (ADENIJI; LAWA, 2012). Adicionalmente, Mukumbo et al. (2014) não observaram efeitos negativos na eficiência de conversão alimentar e qualidade da carne de suínos alimentados com até 5% de folhas de moringa na dieta.

3.1.3 Composição fitoquímica

Vários compostos bioativos têm sido encontrados nas folhas de *M. oleifera*, tais como vitaminas, carotenoides, polifenois, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, glicosinolatos, isotiocianatos, taninos, saponinas, oxalatos e fitatos (LEONE et al., 2015). Os dados relacionados à quantificação desses compostos são bastante diversificados, uma vez que podem variar de acordo com fatores como condições ambientais, genética da planta e métodos de secagem, extração e análise (JOSHI; MEHTA, 2010). Pasha et al. (2019) observaram que enzimas envolvidas na biossíntese de vitaminas e metabólitos como quercetina e kaempferol estão altamente expressas nas folhas de *M. oleifera*.

As folhas de *M. oleifera* também são boas fontes de polifenois, com valores que variam de 2.090 e 12.200 mg Equivalente de ácido gálico/100g, sendo que os principais compostos são flavonoides e ácidos fenólicos (LEONE et al., 2015). kaempferol, quercetina, isoramnetina e apigenina são os flavonoides mais comuns

nas folhas de *M. oleifera*, existindo em abundância como glicosídeos ligados a um amplo espectro de açúcares (LIN; ZHANG; CHEN, 2018). No que diz respeito aos ácidos fenólicos, o ácido gálico é o mais abundante no extrato aquoso das folhas dessa planta (1.034 µg/g) (SINGH et al., 2009). De acordo com Kumar e Pandey (2013), flavonoides apresentam efeitos protetores contra muitas infecções (doenças bacterianas e virais) e doenças degenerativas, como problemas cardiovasculares e câncer (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013). Já os ácidos fenólicos são estudados principalmente por seus potenciais antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico e anticâncer (LEONE et al., 2015).

A presença de alcaloides tem sido igualmente relatada para as folhas de *M. oleifera*, tais como o N,α-L-ramnopiranosil vincosamida, composto responsável pelo efeito cardioprotetor observado por Panda et al. (2013) em ratos expostos ao fármaco isoproterenol. Adicionalmente, o 4-α-rhamnopiranosiloxi-benzil está presente no extrato metanólico e foi identificado como o glicosinolato dominante nas folhas de *M. oleifera*, estando relacionado às atividades antimicrobianas e anti-inflamatória (FÖRSTER et al., 2015).

Ademais, compostos antinutricionais, os quais podem reduzir a biodisponibilidade de alguns nutrientes, têm sido identificados nas folhas dessa planta. De acordo com Richter, Siddhuraju e Becker (2003), folhas liofilizadas apresentaram saponinas (6,4 g equivalentes de diosgenina por 100 gramas (DE/100g), taninos (0,5 g TAE/100g) e fitatos (2.3 g/100g). No que diz respeito às folhas secas, valores da ordem de 5 g DE/100g, 1,4 g equivalente de ácido tânico por 100 gramas (TAE/100g) e 3,1 g/100g foram obtidos para os três compostos supramencionados (MAKKAR; BECKER, 1996). Inibidores de tripsina (1,45 unidade de tripsina inibidas por grama (TUI/g) e oxalatos (10,5 mg/g) também foram identificados nas folhas (TEIXEIRA et al., 2014). Apesar disso, tem sido demonstrado que métodos simples, como a fervura, podem reduzir a quantidade de antinutrientes nas folhas de *M. oleifera* (SALLAU et al., 2012).

3.2 PRODUTOS À BASE DAS FOLHAS DE *M. oleifera*

Mediante sua composição fitoquímica e nutricional, bem como os potenciais biotecnológicos e farmacológicos que apresenta, a moringa tem recebido grande importância na produção de mercadorias, exibindo também relevância econômica. Na Figura 4 estão representados alguns produtos à base das folhas dessa planta que já

são comercializados no Brasil e no mundo. O considerável potencial medicinal das folhas de *M. oleifera* levou ao desenvolvimento formulações comerciais como a *Shrigu* pela empresa indiana *The Himalaya Drug Company*, indicada para suprimir a inflamação e a dor nas articulações. Produtos comercializados no Brasil envolvem a formulação das folhas em cápsulas para a suplementação alimentar, sabonetes e outros cosméticos, chás e alimentos com folhas na composição.

Figura 4 – Produtos à base das folhas de *M. oleifera.*

Fonte: The Himalaya Drug Company (2021).

3.3 TOXICIDADE DE PLANTAS

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Fatores como o alto custo dos medicamentos industrializados e o difícil acesso da população à assistência médica têm contribuído para o aumento da utilização dessas plantas como recurso medicinal (SOUSA, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população de países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, sendo que 85% desta utiliza plantas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Existe uma percepção na população que o uso de plantas no tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz (CAMPOS et al., 2016).

Apesar disso, a utilização de plantas para fins medicinais pode provocar o surgimento de efeitos indesejados, por vezes com risco à vida (ELVIN-LEWIS, 2001). Assim, com o objetivo de controlar e documentar a ocorrência de intoxicações por plantas, foi criado em 1998 o Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas, inserido no Sistema Nacional de Informações Toxico-farmacológicas (SINITOX).

Dados do SINITOX indicam que o número de intoxicações causadas por plantas no Brasil em 2016 foi de 1207 casos, incluindo 3 óbitos, o que corresponde a 1,24% dos casos de intoxicação humana ocorridos. As plantas ocupam o 17° lugar, em número de casos de intoxicação com a maioria dos casos registrados concentrados nas regiões Sul e Sudeste (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016). Vale salientar que o número total de ocorrências está subnotificado, uma vez que muitos casos não são registrados ou são notificados como exposição a agente tóxico desconhecido (MONSENY et al., 2015).

As intoxicações podem ocorrer a partir de contato único (agudo) ou continuado (crônico) e acidental ou intencional. A exposição a agentes toxicantes de plantas pode ocasionar efeitos tóxicos em diversos órgãos, tais como pele, fígado, rins e cérebro (KLAASSEN; WATKINS, 2012). A exemplo, o contato com tricomas de espécies do gênero *Urtica* causa dor e eritema (HENZ, 1998). A utilização do chá de boldo pode causar hepatotoxicidade e efeitos abortivos e teratogênicos (RUIZ et al., 2008). Espécies do gênero *Xanthium* (Asteraceae) promovem a necrose tubular renal em animais utilizados na pecuária (WANG et al., 2011). Ademais, o consumo da mandioca brava (*Manihot esculenta*) está associado a problemas neurológicos crônicos em alguns países africanos (BOTHA; PENRITH, 2008).

3.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PARA O REGISTRO PRODUTOS VEGETAIS

No Brasil, resoluções da Agênica Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) visam a normatização do registro de medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, conhecidos como fitoterápicos. Dentre elas, a Resolução – RDC n° 48/2004, a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, condiciona o registro à apresentação de estudos que comprovem a segurança de uso e as indicações terapêuticas do produto através de uma das três opções abaixo:

> 8.1. Atingir no mínimo 6 pontos, com estudos publicados entre as obras da lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos, conferidos de acordo com a escala descrita a seguir:
> a) Três (3) pontos a cada inclusão em obra relacionada no Grupo I.
> b) Dois (2) pontos a cada inclusão em obra relacionada no Grupo II.
> c) Um (1) ponto a cada inclusão em obra relacionada no Grupo III.
> d) Meio (0,5) ponto a cada inclusão em publicação técnico-científica, brasileira e/ou internacional, não incluídas nos Grupos I, II e III, que contenha informações relativas à segurança de uso e às indicações terapêuticas propostas. No mínimo 50% da pontuação obtida deverá originar-se de estudos em seres humanos.
>
> 8.2. Apresentar comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica, toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde - CNS. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetro mínimo o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.
>
> 8.3. Apresentar levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações técnico científicas ou publicações).

De acordo com a Instrução Normativa ANVISA n° 5/2010, o Grupo II da lista de referências mencionada pela legislação envolve monografias, teses ou dissertações contendo informações etnofarmacológicas, dados químicos e dados de estudos pré-clínicos e clínicos.

Plantas que apresentam alto potencial nutricional e farmacológico, como a *M. oleifera*, podem ser equivocadamente enquadradas na categoria de alimentos, a qual é isenta de obrigatoriedade de registro em alguns casos, conforme a Res. ANVISA – RDC n°27/2010. Desta forma, até meados de 2019, produtos das folhas de *M. oleifera* eram amplamente comercializados no Brasil como alimentos, no entanto a ANVISA proibiu a comercialização, distribuição, fabricação, importação e propaganda de alimentos que apresentem *M. oleifera* na sua composição, por meio da Res. nº 1.478/2019 (ANEXO A), considerando não haver avaliação e comprovação de segurança do uso da espécie.

O guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, aprovado por meio da Res. ANVISA n° 90/2004, estabelece a realização de diferentes testes para assegurar o uso desses produtos. A toxicidade aguda avalia os efeitos após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas. A toxicidade após exposição em doses repetidas visa examinar os efeitos da

exposição contínua ao produto. Ao final dos experimentos, são avaliadas alterações comportamentais, variação do peso corpóreo, consumo de água e ração, parâmetros hematológicos e bioquímicos e exames anatomopatológicos. Além disso o guia também sugere a execução de testes de genotoxicidade para avaliar danos ao material genético.

3.5 GENOTOXICIDADE

Agentes químicos, físicos ou biológicos podem interagir com o material genético e causar mutações, as quais podem estar associadas a instabilidade genômica, câncer, malformações, distúrbios metabólicos e doenças neurológicas (PODURI et al., 2013; MIYAMAE et al., 1998). Diante dos riscos provocados pela exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos, a exigência de testes de genotoxicidade é essencial para aprovação de novos produtos por agências reguladoras (ARALDI et al., 2015). Os tipos de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) variam de quebras simples ou duplas da fita, ligações cruzadas das bases entre si e proteínas ou pela adição de substâncias químicas entre as bases (KLAASSEN; WATKINS, 2012). Diversos ensaios podem ser utilizados para avaliação genotóxica, os mais empregados são os testes de Ames e Kado, o ensaio cometa e o teste do micronúcleo.

O teste de Ames avalia a genotoxicidade através da capacidade da substância testada de induzir mutações ao DNA de linhagens bacterianas mutantes, revertendo-as para o estado selvagem (MARON; AMES, 1983). Kado et al. (1983) aumentaram a sensibilidade do teste utilizando linhagens mutadas de *Salmonella typhimurium* incapazes de biossintetizar histidina, desta forma, apenas as colônias que tiveram a mutação revertida poderiam crescer em um meio sem o aminoácido.

O ensaio cometa em condições alcalinas (pH >13), consiste em um método sensível, barato e estatisticamente robusto para detectar quebras de fita simples e dupla, resultantes, por exemplo, de interações diretas com DNA e sítios álcali-lábeis (COSTA; TEIXEIRA, 2014). Estas quebras podem ser reparadas, resultando em nenhum efeito persistente, ser letais para a célula, ou ser fixadas em uma mutação, resultando em uma mudança viável permanente (LOVELL, 2018). Para a realização do ensaio (Figura 5), uma suspensão celular homogeneizada com agarose anteriormente lisada para a remoção das membranas nuclear e celular é submetida a

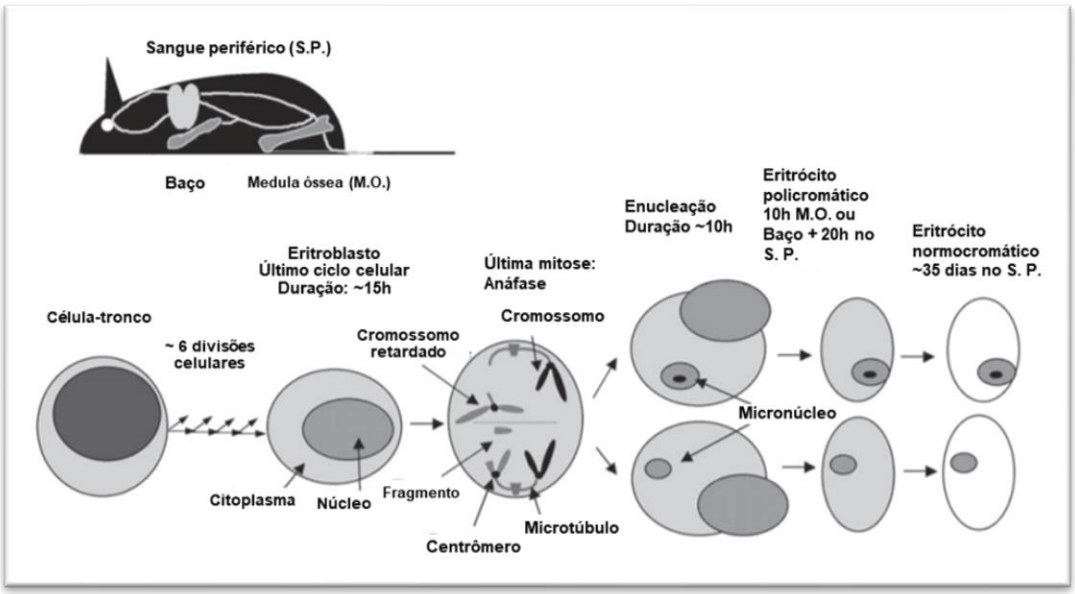
uma corrida de eletroforese (pH > 13,0), com posterior análise em microscopia de fluorescência para classificação dos nucleoides de acordo com o grau de dano (ARALDI et al., 2015).

Figura 5 – Principais etapas do procedimento geral do ensaio cometa: as células são embutidas em agarose na superfície de uma lâmina microscópica (A), lisadas para produzir nucleoides (B) e submetidas à eletroforese para obtenção de cometas (C).

Fonte: Afanasieva e Sivolob (2018).

Por fim, o teste do micronúcleo identifica a presença de fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal em estágios finais da anáfase, podendo ser formados por dois mecanismos: quebras cromossômicas (clastogênese) ou ruptura do aparato mitótico (aneugênese) (ARALDI et al., 2015). Com a formação do micronúcleo (Figura 6), danos cromossômicos induzidos durante o último ciclo celular dos eritroblastos podem ser observados na medula óssea após 24 horas ou no sangue periférico após 48 horas da indução do dano (GRAWÉ, 2005).

Figura 6 – Cinética de maturação de eritrócitos e evolução temporal do dano cromossômico induzido em eritroblastos e expresso como micronúcleo.



Fonte: Adaptado de Grawé (2005).

4 ARTIGO 1 – Moringa oleifera toxicology: An Overview

(Publicado no livro *Moringa oleifera*: Properties, Applications and Health Effects)

Matheus Cavalcanti de Barros, Robson Raion de Vasconcelos Alves, Suéllen Pedrosa da Silva, José Dayvid Ferreira da Silva, Poliana Karla Amorim, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Thiago Henrique Napoleão and Patrícia Maria Guedes Paiva*

*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

ABSTRACT

Moringa oleifera Lam. is a tree species with high food, medicinal, and industrial values, being widely cultivated and used in treatment of water for human consumption. The use of *M. oleifera* is increasing and its commercialization has driven the search for scientifically proven information about safety and therapeutic effectiveness. Natural compounds can trigger risks to human health, being essential the evaluation of the safe use of plants for humans and animals. This work aimed to carry out a review on the progress of researches related to the toxicological assessment of *M. oleifera* preparations, providing an overview of the investigation of the safety of this plant use in the last 11 years. This review was designed to address different toxicology models and consists of a collection of 77 articles describing studies on *M. oleifera* toxicity. The efficiency of *M. oleifera* preparations in reaching specific cellular targets has been highlighted by in vitro studies, indicating a high potential of this plant against cancer cell lines. Investigations of the acute, subacute, and chronic toxicity of moringa preparations have demonstrated the absence of toxicological effects depending on the tested concentration, route of administration, time of exposure, plant tissue or organ, extraction method and animal model. Other data have also demonstrated the low genotoxic and mutagenic potential of *M. oleifera* and its relevant protective activities against DNA damage. The researches developed until today have focused mainly on leaves and seeds, but studies involving other parts of this plant are needed, since all of them are used for some purpose.

Disponível em: https://novapublishers.com/shop/moringa-oleifera-properties-applications-and-health-effects/

5 ARTIGO 2 - Composição fitoquímica, atividade antioxidante e toxicidade aguda da infusão das folhas de *Moringa oleifera* Lam.

Matheus Cavalcanti de Barros[a], Ana Gabrielle Barros Silva[a], Talita Giselly dos Santos Souza[c], Janaína Carla Barbosa Machado[b], Magda Rhayanny Assunção Ferreira[b], Cristiano Aparecido Chagas[c], Luiz Alberto Lira Soares[b], Alisson Macário de Oliveira[a], Thiago Henrique Napoleão[a], Patrícia Maria Guedes Paiva [a]

[a] *Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil.*

[b] *Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil*

[c] *Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil*

*Autor correspondente: Patrícia Maria Guedes Paiva. patricia.paiva@ufpe.br; Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Avenida Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420.

Resumo

***Objetivo do estudo**:* O presente trabalho investigou a composição fitoquímica, a atividades antioxidante, o potencial hemolítico, a toxicidade aguda, a genotoxicidade e a mutagenicidade da infusão das folhas de *M. oleifera*.

***Materiais e métodos**:* A composição fitoquímica foi determinada por cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e pela quantificação de fenois totais, flavonoides e cumarinas. A atividade antioxidante foi avaliada pelos testes do DPPH e ABTS e a atividade hemolítica usou eritrócitos de camundongos. O ensaio de toxicidade aguda usou camundongos albinos *Swiss* e administração oral em dose única a 2.000 e 5.000 mg/kg. Os animais foram avaliados quanto ao peso corporal, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos e histologia do fígado, baço e rins. A genotoxicidade e a mutagenicidade *in vivo* da infusão (2.000 mg/kg) foi avaliada pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo.

Resultados: A CCD e CLAE indicaram a presença de flavonoides, derivados cinâmicos e saponinas. Foram obtidos valores de 108,12 ± 1,59 µg EAT/mg para fenois totais, 2,69 ± 0,36 µg ER/mg para flavonoides e 0,74 ± 0,06 µg EC/mg para cumarinas. A infusão apresentou atividade antioxidante e os valores de CI_{50} determinados foram 51,51 ± 4,54 e 53,95 ± 3,26, nos testes do DPPH e ABTS, respectivamente. Atividade hemolítica não foi detectada desde que a CE_{50} foi superior a 1.000 µg/mL. O ensaio de toxicidade aguda revelou que a dose de 5.000 mg/kg promoveu taquicardia, aumento de ambulação e agitação. As duas doses não induziram ganho de peso e aumento do consumo de água e ração e não foi detectado alteração de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, bem como genotoxicidade e mutagenicidade.

Conclusões: A infusão das folhas de *M. oleifera* é uma das formas de uso mais empregadas pela população. O estudo revela que a infusão das folhas de *M. oleifera* é fonte de polifenois e agentes antioxidantes, não é hemolítica, não tem toxicidade aguda e não causa efeito adverso ao material genético. Contudo, avaliação do comportamento dos animais indica que doses maiores que 2.000 mg/kg devem ser evitadas.

1. Introdução

Moringa oleifera (Moringaceae) também conhecida como moringa, cedro ou quiabo-de-quina, é nativa do sul da Ásia, na região do Himalaia, do nordeste do Paquistão ao norte da Bengala ocidental - Índia, sendo também amplamente cultivada na África e América do Sul (Ayerza, 2011; Keatinge et al., 2017). Devido aos diversificados potenciais usos que apresenta, seja nutricional ou farmacológico, essa planta foi promovida a uma ampla divulgação em vários países, motivo pelo qual tem sido referida como a árvore maravilhosa ou milagrosa (Ashfaq et al., 2012).

Folhas de *M. oleifera* tem recebido grande destaque devido ao seu conteúdo nutricional, sendo indicada como uma alternativa sustentável de suplemento alimentar para aqueles que sofrem de desnutrição, especialmente nos países em desenvolvimento (Gupta et al., 2017). Se tratando da composição, as folhas frescas dessa planta possuem 4 vezes a quantidade de vitamina A da cenoura, 7 vezes a vitamina C da laranja, 4 vezes o cálcio do leite e 3 vezes o potássio da banana (Falowo et al., 2018; Thurber e Fahey, 2009). Além disso, também têm sido demonstradas diversas propriedades medicinais importantes para as folhas, incluindo atividade anticancerígena (Berkovich et al., 2013), anti-inflamatória (Giacoppo et al., 2017), antimicrobiana (Mandal et al., 2014) e efeito neuroprotetor (Sulaiman et al., 2008).

Uma das formas de uso mais empregadas na preparação das folhas pela população é a infusão. De acordo com Coz-Bolaños et al. (2018) infusões e outras preparações aquosas das folhas de *M. oleifera* são utilizadas como alternativas anti-inflamatórias e hipoglicêmicas, bem como para o controle de peso

No entanto, a utilização de produtos de origem natural de forma indiscriminada pode provocar efeitos colaterais indesejados com consequências severas, incluindo risco à vida (Elvin-Lewis, 2001). Dados relacionados à composição fitoquímica de *M. oleifera* são bastante diversificados, pois variam de acordo com fatores como as condições ambientais e métodos de extração, os quais podem influenciar na toxicidade de diferentes preparações (Joshi e Mehta, 2010). Assim, devido à falta de avaliação e comprovação de segurança no uso da *M. oleifera*, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a comercialização, distribuição, fabricação, importação e propaganda de alimentos que apresentem essa planta na sua composição no Brasil por meio da Resolução nº 1.478/2019. Uma vez que a infusão é a forma mais comum de utilização das folhas de *M. oleifera* pela população, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição fitoquímica, determinar a atividade antioxidante e avaliar a toxicidade da infusão das folhas de *M. oleifera* a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal e preparação da infusão

As folhas de *M. oleifera* (voucher nº 73.345, Herbário Dárdano de Andrade Lima, Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brasil) foram lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente, moídas e armazenadas até a utilização. Para preparação da infusão, as folhas (10 g) foram misturadas a água destilada (100

mL) previamente aquecida (100 ºC) e deixadas em repouso por 15 min. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro, liofilizada e armazenada no congelador (-6º C) até a realização dos testes.

2.2. Caracterização fitoquímica

2.2.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A infusão diluída em metanol (1 mg/mL) e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F 254 (Macherey-Nagel ®, Alemanha). Após a aplicação das amostras e eluição com solventes orgânicos 15 min), as placas foram secas à temperatura ambiente e observadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm). Em seguida, as placas foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito: $AlCl_3$ (flavonoides e derivados cinâmicos), $FeCl_3$ (taninos hidrolisáveis), vanilina clorídrica (taninos condensados) e o reagente de Liebermann-Burchard (saponinas). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões ácido cafeico, quercetina e rutina, ácido gálico, catequina e escina.

2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A infusão diluída em metanol (250 µL, 1 mg/mL) foi analisada por CLAE em sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm e as separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm; Supelco ®) equipada com pré-coluna (C_{18} de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex ®). As separações foram efetuadas a temperatura de 25 ± 1 ºC e a fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B) com fluxo ajustado a 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-5 min, 20-25%

de B; 5-10 min, 25-40% de B; 10-20 min, 40-80% de B; 20-25 min, 80-85% de B; 25-25,5 min, 85-40% de B; 25,5-26 min, 40-20% de B; 26-27 min, 20%B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.2.3 Quantificação de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais foi avaliado usando o ensaio Folin-Ciocalteu adaptado para microplacas de 96 poços (Margraf et al., 2015). Primeiramente, a infusão diluída em água destilada (20 µL; 0,2 mg/mL) foi misturada com 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu (10 % v/v). Após 5 min, uma alíquota de 100 µL de carbonato de sódio (7,5% p/v) foi adicionada à mistura e a placa foi agitada por 20 s. Após repouso durante 60 min no escuro à 25 °C, a absorbância foi medida a 740 nm usando um leitor de microplacas. Uma curva de calibração foi preparada usando ácido tânico (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10 µg/mL) e o conteúdo de fenois totais foi expresso como microgramas equivalentes de ácido tânico por miligrama de infusão (µg EAT/mg). O teste foi realizado em triplicata.

2.2.4 Quantificação de flavonoides totais

O teste foi realizado de acordo com (Sobrinho et al., 2008), com modificações. A infusão diluída em água destilada (0,2 mL; 1 mg/mL) foi misturada com ácido acético glacial (120 µL), piridina (2 mL; 20% v/v em etanol) e cloreto de alumínio (0,5 mL; 5% p/v) e o volume foi completado com água destilada até 10 mL. Após incubação (30 min; 26 °C) no escuro, a absorbância foi medida a 420 nm. Uma curva padrão foi preparada usando rutina (0,05–2 µg/mL). O teor de flavonoides foi expresso em microgramas equivalentes de rutina por miligrama de extrato (µg ER/mg). O teste foi realizado em triplicata.

2.2.5 Quantificação de Cumarinas

O ensaio foi realizado de acordo com (Osório e Martins, 2004), com modificações. A infusão diluída em água destilada (0,5 mL; 1 mg/mL) foi transferida para tubos de ensaio contendo água destilada (2 mL) e acetato de chumbo (500 µL, 5% p/v). Após agitação e adição de água destilada (7 mL), uma alíquota desta solução foi adicionada à 8 mL de ácido clorídrico (0,1 M). Após 30 min, a absorbância da solução final foi medida a 320 nm. Uma curva padrão de cumarina (0,4–16 mg/mL) foi feita e os resultados foram expressos como microgramas equivalentes de cumarinas por miligrama de extrato (µg EC/mg). O teste foi realizado em triplicata.

2.3 Atividade antioxidante

2.3.1 Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O ensaio foi realizado de acordo com (Santos et al., 2018). A infusão diluída em metanol foi testada em concentrações variando de 15,62 a 1.000 µg/mL. Em cada ensaio, 280 µL da solução DPPH foram adicionados a cada amostra (em volume variável da solução estoque, para obter as concentrações testadas). Após 30 min, a redução do DPPH foi determinada por alteração colorimétrica a 517 nm usando metanol como branco e a concentração de antioxidante necessária para liberar 50% do DPPH presente (CI_{50}) foi determinada. O teste é baseado na transferência de elétrons por uma substância antioxidante, sendo o DPPH (coloração roxa) reduzido a difenil-picril hidrazina (coloração amarela). O teste foi realizado em triplicata.

2.3.2 Teste do ABTS

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços. A solução estoque de ABTS+ foi diluída em metanol para obter uma absorbância de 0,70 a 734 nm e em seguida,

200 µL desta solução foi adicionado a 2 µL da infusão diluída em metanol (concentrações de 15,62 a 1000 µg/mL). A absorbância a 734 nm foi medida 6 min e o resultado expresso como a concentração necessária para liberar 50% do ABTS+ presente (CI_{50}). O ensaio ABTS é baseado na transferência de elétrons, pois na presença de um agente antioxidante o ABTS+ é reduzido a ABTS, promovendo a perda da coloração azulada. O teste foi realizado em triplicata.

2.4 Experimentação animal

Camundongos albinos Swiss fêmeas pesando entre 25 e 30g foram obtidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Antes do uso nos experimentos, os animais foram alojados sob condições padronizadas (22 ± 2 °C, em ciclo 12-12 h claro/escuro e 50-60% de umidade) e alimentados com uma dieta padrão de camundongos ad libitum. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da UFPE sob o protocolo nº 22/2019.

2.4.1 Atividade hemolítica

Para realização do teste, sangue fresco de camundongos foi obtido após anestesia por meio de punção cardíaca em tubos heparinizados. Os Eritrócitos foram lavados quatro vezes com soro fisiológico (1.000 g, 5 min) e depois ressuspendidos para obter uma suspensão de eritrócitos a 2%. Posteriormente, a suspensão de eritrócitos (1,1 mL) foi incubada (37° C, 2 h) com a amostra (400 µL) diluída seriadamente (31,25 - 1.000 µg/mL). Água e soro fisiológico foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após isso, as amostras foram centrifugadas (1.000 g, 5 min) e o sobrenadante transferido (100 µL) para placa de 96 poços para determinação de absorbância a 540 nm em leitor de microplacas. Dois

experimentos independentes foram realizados em duplicata. Foi calculada a concentração efetiva que resultou em 50% de hemólise (EC_{50}), quando comparadas com as observadas nos controles.

2.4.2 Toxicidade oral aguda

A toxicidade aguda foi determinada de acordo com o Guideline 423 da Organization for Economic Cooperation and development (OECD, 2002). Camundongos albinos Swiss fêmeas (n = 5 para cada grupo) receberam uma dose da infusão das folhas diluída em NaCl 0,15 M (2000 e 5000 mg/kg) ou do veículo (NaCl 0,15 M) e os animais foram observados nas primeiras 2 h e depois a cada 24 h diariamente durante 14 dias. Sinais como atividade geral, irritabilidade, resposta ao toque, contorções, tremores, convulsões, taquicardia, piloereção, movimentos estereotipados, sonolência, defecação, diarreia e micção foram analisados. Os animais foram avaliados diariamente através da pesagem e do consumo de água e ração. No 14º dia, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (2:1; v/v), por via intraperitoneal, para coleta de sangue. O fígado, rim e baço foram coletados para análise macroscópica e histológica.

O sangue foi obtido por punção cardíaca e transferidos para um tubo contendo EDTA. Os seguintes parâmetros foram obtidos: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos em analisador hematológico automático MaxCell Vet 500 D e microscópio óptico Olympus. Outra parte do sangue foi transferida para um tubo contendo gel separador e centrifugado a 3,500 rpm por 10 min para obtenção de soro e avaliação dos seguintes parâmetros: albumina, alanina aminotransferase (ALT),

aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), proteínas totais, ureia, creatinina, colesterol total e triglicerídeos usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) em analisador automático COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics).

As análises histológicas do fígado, rim e baço dos camundongos foram realizadas por microscopia óptica. Secções dos órgãos foram fixadas em formalina tamponada (10%, v/v), desidratadas através em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente, cortes histológicos (5 µm) foram obtidos, corados com hematoxilina-eosina e montados usando lamínulas com resina. As amostras foram observadas usando um microscópio óptico.

2.4.3 Ensaio cometa

A dose utilizada no ensaio cometa foi escolhida de acordo com os resultados do teste de toxicidade aguda. Camundongos albinos Swiss fêmeas (n = 5 para cada grupo) foram divididos em três grupos, os quais receberam por via oral a infusão (2.000 mg/kg) ou a solução salina (0,15 M) ou Metotrexato (MTX) a 20 mg/kg por injeção intraperitoneal. Após 24 h, 60 µL de sangue total foram coletados da cauda por punção venosa e foi realizada a versão alcalina do ensaio do cometa, segundo Singh et al. (1988) com modificações. Em cada ensaio, 20 µL de sangue foram misturados com 110 µL de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C, colocados em lâminas totalmente solidificadas cobertas com uma camada de agarose padrão e revestidas com lamínula. Em seguida, as lâminas foram mantidas a 4 °C por 30 min, imersas durante 1 h a 4 °C em solução de lise gelada e em seguida transferidas para cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão. A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C, por 20 min, corrente de 32V e 300 mA. Após a

corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização por 15 min, secas e fixadas com etanol durante 5 min. Para análise, as lâminas foram coradas com iodeto de propídeo e para cada tratamento foram analisados 100 nucleoides em microscópio de fluorescência, os quais foram classificados de acordo com o dano observado (classes 0,1,2,3 ou 4). O índice de danos foi calculado multiplicando o número de nucleoides observados em cada classe de dano pelo valor da classe. A frequência de dano (%) foi calculada com base no número de células com cauda em relação às células sem danos a cada tratamento. Três experimentos independentes foram realizados.

2.4.4 Teste do micronúcleo

Os animais dos mesmos experimentos usados para o ensaio do cometa foram usados no teste do micronúcleo. Após 48 h dos tratamentos descritos anteriormente, 60 µL de sangue total foram coletados da cauda por punção venosa. O sangue coletado (5 µL) foi depositado em lâminas coradas previamente com laranja de acridina (1 mg/mL) e coberto com lamínula (Eiji et al., 1999). Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488. A presença de micronúcleos foi analisada em 2.000 eritrócitos policromáticos (PCE) por animal.

2.5Análises estatísticas

Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão. Em relação à toxicidade aguda, a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni foi usada para calcular a significância estatística entre os grupos com o GraphPad Prism Software 5.0 (GraphPad Software, EUA). Para a análise da genotoxicidade e mutagenicidade, os grupos tratados e o controle negativo foram

comparados pelo teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Witney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1 Cromatografia de camada delgada (CCD) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Bandas com colorações amarela-esverdeada e azuladas obtidas na triagem da amostra por meio da CCD revelou que a infusão contém flavonoides e derivados cinâmicos, respectivamente. Além disso, a observação de coloração semelhante ao padrão escina revelou a presença de saponinas na amostra. Taninos hidrolisáveis e condensados não foram detectados.

A impressão digital por CLAE indicou a presença de oito compostos principais, dos quais dois picos corresponderam à derivados cinâmicos e os demais apresentaram espectros da classe dos flavonoides (Figura 1A). Os picos observados nos tempos de retenção 8.13 min (a) e 12.39 min (b), cujos máximos de absorção foram 217/325.3 nm e 217.8/326.6 nm, respectivamente, indicam da presença de derivados cinâmicos com espectro de varredura semelhante aos padrões de ácido cafeico (217.5/324.2 nm) e ácido clorogênico (217.6/325.1 nm) (Figura 1B). Já os picos c-h apresentam espectros de absorção semelhante a classe de flavonoides, com tempos de retenção 14.69 min (214.7/270/340 nm, c), 16.96 min (212.7/270/337.2 nm, d), 18.45 min (203/256.3/356.1 nm, e), 18.69 min (203.3/256.3/356.4 nm, f), 19.56 min (198.4/265.1/350 nm, g) e 19.91 min (199.5/265.1/350 nm, h). Dentre os flavonoides, foi possível identificar a presença de rutina (f). Adicionalmente, foram calculados os teores de derivados cinâmicos totais [0,59 g% (0,12%)] calculados como ácido

cafeico, teor de rutina [1,29 g% (0,05%)] e teor de flavonoides totais [3,34 g% (1,22%)] calculados como rutina.

3.2 Conteúdo de fenois totais, flavonoides e cumarinas e atividade antioxidante

O conteúdo de fenois, flavonoides, cumarinas e à atividade antioxidante da infusão estão representados na tabela 1. O conteúdo de fenois totais foi de 108,12±1,59 µg equivalentes de ácido tânico por miligrama de infusão. Já o teor de flavonoides e cumarinas corresponderam a 2,69 ± 0,36 e 0,74 ± 0,06 µg, equivalentes de rutina e cumarina por miligrama de infusão, respectivamente. A atividade antioxidante, obtivemos valores de IC_{50} da ordem de 51,51 ± 4,54 e 53,95 ± 3,26 µg/mL para os testes do DPPH e ABTS, respectivamente.

3.3 Potencial hemolítico

Nos resultados de atividade hemolítica, a concentração que causa 50% de hemólise dos eritrócitos de camundongos não foi determinada, uma vez que nas concentrações testadas da infusao não apresentou hemólise. Assim, a EC_{50} foi representada como sendo maior que 1.000 µg/mL.

3.4 Toxicidade oral aguda

3.4.1 Avaliacao comportamental

Nas primeiras duas horas após administração oral da infusão das folhas de *M. oleifera* na dose de 5.000 mg/kg, os camundongos apresentaram alterações comportamentais tais como taquicardia, aumento de ambulação e agitação nos animais tratados a 5.000 mg/kg. Já o tratamento oral com 2.000 mg/kg não demonstrou sinais atípicos comportamentais. Além disso, o tratamento com a infusão não promoveu diferenças significativas ($p>0.05$) em relação ao consumo de água e

ração durante 14 dias de observação. No entanto, uma redução significativa ($p<0.05$) no ganho de peso foi observada para ambos os tratamentos com a infusão quando comparado ao controle negativo (Tabela 2).

3.4.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Na tabela 3 estão representados os parâmetros hematológicos de camundongos tratados oralmente com solução salina ou infusão de folhas de *M. oleifera*. Nenhuma diferença significativa ($p>0.05$) dos tratamentos em relação ao controle negativo no número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos.

Os dados relativos aos parâmetros bioquímicos analisados estão representados na tabela 4. Não foi observada diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle negativos nos níveis de albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), proteínas totais, ureia, creatinina, colesterol total e triglicerídeos em comparação ao controle negativo.

3.4.3 Peso de órgãos e análise histopatológica

Foi observada diminuição significativa ($p<0.05$) no peso dos fígados e rins dos animais tratados em comparação ao controle. Nenhuma diferença foi encontrada para o baço em ambos os tratamentos (Tabela 5). A análise histopatológica não indicou alterações nos fígados, baços e rins dos animais tratados com a infusão das folhas de *M. oleifera* (Figura 2).

3.5 Genotoxicidade e mutagenicidade

Os resultados relativos à genotoxicidade e mutagenicidade estão representados na figura 4. Os valores de índice (ID = 42,4 ± 11,26) e frequência de danos (FD = 27,2 ± 7,36) obtidos com o ensaio cometa não diferiram do controle negativo (ID = 38,6 ± 0,99; FD = 27,6 ± 5,86) e foram inferiores aos obtidos para o controle positivo (ID = 268,8 ± 14, 55; FD = 97,6 ± 2.07) (Fig. 3 A-B). Além disso, mutagenicidade também não foi observada com os resultados obtidos com o teste de micronúcleo, no qual o número de eritrócitos micronucleados foi de 3.0±1,0 e de 3.0±1.58 para o tratamento oral com infusão ou salina. Já o tratamento com o metotrexato promoveu formação de micronucúcleo com média de 24.8 ± 5.63 (Fig. 3 C).

4. Discussão

Mesmo diante da ampla utilização da infusão das folhas de *M. oleifera*, estudos relacionados a sua segurança de uso e composição fitoquímica ainda são escassos. Isso nos motivou a realizar a investigação fitoquímica e toxicológica em camundongos utilizando concentrações e modelos animais segundo as recomendações de agências regulamentadoras como a OECD e a ANVISA.

A caracterização fitoquímica evidenciou que a infusão das folhas de *M. oleifera* é majoritariamente composta por polifenois pertencentes às classes dos flavonoides e derivados cinâmicos. Tal resultado corrobora com outros estudos, os quais têm evidenciado as folhas de *M. oleifera* como boas fontes de polifenois, cujos principais compostos pertencem à classe dos flavonoides (Lin et al., 2018). Em adição, de acordo com (Leone et al., 2015), o conteúdo de polifenois em folhas secas varia de 2.090 e 12.200 mg equivalente de ácido gálico por 100g (GAE/100g).

Compostos fenólicos desempenham papeis importantes na prevenção de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, como diabetes e câncer, devido

ao seu potencial antioxidante (George; Dellaire; Rupasinghe, 2017). A avaliação da atividade antioxidante realizada neste estudo revelou que a infusão das folhas de *M. oleifera* é um antioxidante forte, pois apresenta IC_{50} entre 50 e 100 µg/mL (Fidrianny; Alvina; Sukrasn, 2014). Estudo realizado por (Vongsak et al., 2013) revelou que o extrato hidroalcóolico de folhas *M. oleifera* também exibiu alta atividade antioxidante no método DPPH com EC_{50} de 62,94 µg/mL.

Partindo do princípio da ampla utilização de infusão de *M. oleifera*, investigar a toxicidade oral é essencial para atestar a segurança para população que faz uso. Nesse sentido, para avaliar o efeito tóxico preliminar da infusão, ensaiamos o potencial hemolítico, pois permite investigar a capacidade de um produto em promover a formação de poros ou causar ruptura da membrana dos eritrócitos e causar anemia hemolítica (Zohra e Fawzia, 2014). Em nossa avaliação a infusão de folhas de *M. oleifera* não promoveu lise de células vermelhas com EC_{50} maior que 1.000 µg/mL podendo assim ser considerada segura para utilização *in vivo* (Costa-Lotufo et al., 2005).

Baseado na ausência de efeitos tóxicos no ensaio preliminar, avaliamos a toxicidade aguda em camundongos, pois o teste permite explorar os efeitos causados pelo produto quando administrado em uma única dose (OECD, 2002). A administração da infusão de folhas de *M. oleifera* até 5.000 mg/kg não foi letal, entretanto alterações no comportamentais dos animais nas primeiras duas horas de observação sugere que o uso indiscriminado deve ser evitado. A preparação não alterou os parâmetros de consumo de água ou ração e diminuiu levemente o ganho de peso dos animais em relação ao controle negativo.

O tratamento agudo com a infusão não promoveu alteração nos parâmetros hematológicos. A avaliação dos parâmetros hematológicos em animais pode ser

traduzida para humanos, fornecendo informações sobre o sistema hematopoiético e as respostas imunológicas após administração do produto testado (Igwebuike et al., 2007; Olson et al., 2000). Adicionalmente, os níveis séricos de parâmetros bioquímicos (albumina, ALT, AST, GGT, fosfatase alcalina, proteínas totais, creatinina, ureia e colesterol total) avaliados não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Os níveis de ALT e AST são os parâmetros mais utilizados para indicar o grau de dano hepático (Al-Mamary et al., 2002). A determinação quantitativa de creatinina e ureia são marcadores importantes da função renal e elevações nos níveis desses parâmetros são indicativos de lesão renal (Akindele et al., 2014). Comparativamente, (Asare et al., 2012) avaliaram que o tratamento extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* diminuiu os níveis de albumina e ureia e não induziu alteração nos parâmetros hematológicos de ratos na concentração de 3.000 mg/kg.

Geralmente, os pesos dos rins e do fígado são ferramentas úteis em estudos de toxicidade devido à sua sensibilidade para prever o efeito da toxicidade e se correlacionarem bem com as alterações histopatológicas (Amna et al., 2013). Apesar disso, a redução do peso dos rins e fígados observadas para os grupos tratados em relação ao controle negativo no presente estudo não corroboraram com as análises histopatológicas e bioquímicos, as quais não indicaram danos significativos nos órgãos observados. Diferentemente, (Okumu et al., 2016) revelaram que o extrato metanólico das folhas (2.000 mg/kg) em dose única causou distorções na arquitetura das células do fígado de ratos. Assim, observa-se que a forma de preparação influencia os aspectos toxicológicos das folhas de *M. oleifera* (Barros et al., 2021).

Mesmo não apresentando toxicidade, algumas preparações podem promover danos ao material genético, causando mutações, as quais podem estar associadas a

instabilidade genômica, câncer, malformações, distúrbios metabólicos e doenças neurológicas (Miyamae et al., 1998; Poduri et al., 2013). O ensaio cometa em condições alcalinas (pH >13), consiste em um método sensível, barato e estatisticamente robusto para detectar quebras de fita simples e dupla, resultantes, por exemplo, de interações diretas com DNA e sítios álcali-lábeis (Costa and Paulo Teixeira, 2014). O teste do micronúcleo identifica a presença de fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal em estágios finais da anáfase, podendo ser formados por quebras cromossômicas (clastogênese) ou ruptura do aparato mitótico (aneugênese) (Araldi et al., 2015). Os resultados do presente estudo indicaram que a infusão das folhas não causou dano genotóxico ou mutagênico significativo a 2.000 mg/kg. No entanto, (Asare et al., 2012) observaram que o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* na concentração de 3.000 mg/kg aumentou o número de eritrócitos policromáticos micronucleados em ratos.

O aumento da utilização de plantas pela população para o tratamento de doenças e a existência de uma percepção popular que o uso de plantas é natural e seguro reforçam a necessidade de estudos de toxicidade envolvendo preparações vegetais. Assim, os usos tradicionais de *M. oleifera* e os dados do presente trabalho estimulam outros estudos a fim de elucidar os efeitos do uso de diferentes preparações envolvendo esta planta.

5. Conclusões

A infusão de folhas de *M. oleifera* é uma rica fonte de polifenois e agentes antioxidantes, os quais podem promover benefícios à saúde. A preparação não apresentou potencial hemolítico, toxicidade aguda e não causa efeito adverso ao material genético. Os presentes dados em conjunto a outros estudos reforçam que o método de extração e a dose são fatores que interferem na observação dos efeitos

toxicológicos das folhas de *M. oleifera*. Desta forma, recomenda-se evitar o aumento indiscriminado desta preparação em doses acima de 2.000 mg/kg devido à observação de alteração comportamental em animais.

5. Referências

Adeyemi, O. O., Akindele, A., Nwumeh, K., 2014. Acute and subchronic toxicological assessment of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) aqueous leaf extract. International Journal of Applied Research in Natural Products 3, 1–11. https://doi.org/10.1055/s-0028-1084024

Al-Mamary, M., Al-Habori, M., Al-Aghbari, A.M., Baker, M.M., 2002. Investigation into the Toxicological Effects of *Catha edulis* Leaves: a Short Term Study in Animals. Wiley Online Library. 16, 127–132. https://doi.org/10.1002/ptr.835

Amna, O. F., Nooraain, H., Noriham, A., Azizah, A. H., Husna, R. N., 2013. Acute and oral subacute toxicity study of ethanolic extract of *Cosmos caudatus* leaf in Sprague Dawley rats. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 3, 301. https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.218

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2019. Resolução nº 1.478/2019. Proíbe alimentos que apresentem *Moringa oleifera* na sua composição, em quaisquer formas de apresentação - Diário Oficial da União, Brasília.

Araldi, R. P., Melo, T. C., Mendes, T. B., Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., Stocco, R. C. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 72, 74-82. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004

Asare, G. A., Gyan, B., Bugyei, K., Adjei, S., Mahama, R., Addo, P., Nyarko, A., 2012. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. Journal of ethnopharmacology. 139, 265-272. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.009

Ashfaq, M., Basra, S.M.A., Ashfaq, U., 2012. Moringa: A Miracle Plant for Agro-forestry. Journal of Agriculture and Social Sciences 8.

Ayerza, R., 2011. Seed yield components, oil content, and fatty acid composition of two cultivars of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) growing in the Arid Chaco of Argentina. Industrial Crops and Products 33, 389–394. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.003

Barros, M. C., Alves, R. R. V., Silva, S. P., Silva, J. D. F., Amorim, P. K., Coelho, L. C. B. B., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G, 2021. *Moringa oleifera* Toxicology: An

Overview, in: Figueroa, D. S., *Moringa oleifera*: Properties, Applications and Health Effects. Nova Science Publishers, New York, pp. 35-68.

Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., Lev-Ari, S., 2013. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 1–7. https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212

Costa, S., Paulo Teixeira, J., 2014. Comet Assay, in: Encyclopedia of Toxicology: Third Edition. Elsevier, pp. 1020–1023. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01072-1

Costa-Lotufo, L. V., Khan, M. T. H., Ather, A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., Moraes, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 99, 21-30. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.041

Coz-Bolaños, X., Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Loarca-Piña, G. F., Guzmán-Maldonado, S. H., 2018. Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator in vitro. Industrial Crops and Products. 118, 95-101. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.028

Eiji, Y., Haruyoshi, H., Masaki, T., Motoyoshi, K., Setsuko, A, 1992. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. Mutation Research/Genetic Toxicology. 278, 127-130. https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90222-L

Elvin-Lewis, M., 2001. Should we be concerned about herbal remedies. Journal of ethnopharmacology. 75, 141-164. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00394-9

Falowo, A.B., Mukumbo, F.E., Idamokoro, E.M., Lorenzo, J.M., Afolayan, A.J., Muchenje, V., 2018. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. Food Research International. 106, 317-334. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.079

Fidrianny, I. A., Alvina, Sukrasno., 2014. Antioxidant capacities from different polarities extracts of three kinds ginger using dpph, frap assays and correlation with phenolic, flavonoid, carotenoid content. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6, 857-862. https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/1754.

Giacoppo, S., Rajan, T.S., Nicola, G.R., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E., 2017. The isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* shows potent anti-inflammatory activity in the treatment of murine subacute Parkinson's disease. Rejuvenation Research 20, 50–63. https://doi.org/10.1089/rej.2016.1828

Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., Medicine, S.K.-J. of H., 2018. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. Journal of Herbal Medicine. 11, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.003

Igwebuike, U. M., Obidike, R. I., Shoyinka, S. V. O., Nwankwo, C. U., Okwechime, I. O., Aka, L. O. 2007. Effects of Nigerian Qua Iboe Brent crude oil on rat spleen and haematological parameters. Veterinarski arhiv. 77, 247. https://hrcak.srce.hr/24845

Joshi, P., Mehta, D., 2010. Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. Journal of Metabolomics and Systems Biology. 1, 5-9. https://worldveg.tind.io/record/39008

Keatinge, J.D.H., Ebert, A.W., Hughes, J.D.A., Yang, R.Y., Curaba, J., 2017. Seeking to attain the UN's Sustainable Development Goal 2 worldwide: The important role of *Moringa oleifera*, in: Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science, pp. 1–10. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1158.1

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S., 2015. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: An Overview. Int. J. Mol. Sci 16, 12791–12835. https://doi.org/10.3390/ijms160612791

Lin, M., Zhang, J., Chen, X., 2018. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. Journal of functional foods, 47, 469-479. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011

Mandal, B., Bhattacharjee, I., Kundu, J., Chandra, G., 2014. Efficiency of Extracts of two Medicinal Plants of India Against Some Pathogenic Bacteria. Indian Journal of Biological Sciences. 20, 49 – 55. http://inet.vidyasagar.ac.in:8080/jspui/handle/123456789/1153

Margraf, T., Karnopp, A.R., Rosso, N.D., Granato, D., 2015. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. Wiley Online Library. 80, 2397–C2403. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077

Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Y. F., Kobayashi, H., Igarashi-Soga, M., Shimoi, K., Hayashi, M., 1998. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 418, 131- 140. https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00112-0

OECD, 2002. Test N°. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 4, OECE Publishing, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264071001-en.

Okumu, M., Mbaria, J., Kanja, L., Gakuya, D., Kiama, S., Ochola, F., Okumu, P., 2016. Acute toxicity of the aqueous-methanolic *Moringa oleifera* (Lam) leaf extract on female Wistar albino rats. International Journal of Basic and Clinical Pharmacology. 5, 1856–1861. https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20163153

Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A., 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32, 56–67. https://doi.org/10.1006/rtph.2000.1399

Osório, A. C., Martins, J.L.S., 2004. Determination of coumarin in fluid extract and tinture of “guaco” by first derivative spectrophotometry. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 40, 481–486. https://doi.org/10.1590/s1516-93322004000400005

Poduri, A., Evrony, G.D., Cai, X., Walsh, C.A., 2013. Somatic Mutation, Genomic Variation, and Neurological Disease. Science. 341, 1237758. https://doi.org/10.1126/science.1237758

Santos, J., Torres, P., Santos, D., 2018. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 6. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27450.08640

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175, 184–191. https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0

Sobrinho, T. J. D. S. P., Silva, C. H. T. P. D., Nascimento, J. E. D., Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. D., Amorim, E. L. C. D., 2008. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 44, 683-689. https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400015

Sulaiman, M.R., Zakaria, Z.A., Bujarimin, A.S., Somchit, M.N., Israf, D.A., Moin, S., 2008. Pharmaceutical Biology Evaluation of Moringa oleifera Aqueous Extract for Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities in Animal Models Evaluation of *Moringa oleifera* Aqueous Extract for Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities in Animal Models. Pharmaceutical Biology. 46, 838–845. https://doi.org/10.1080/13880200802366710

Thurber, M.D., Fahey, J.W., 2009. Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the “Diffusion of innovations” theory. Ecology of Food and Nutrition. 48, 212–225. https://doi.org/10.1080/03670240902794598

Tofovic, S. P., Jackson, E. K., 1999. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. Journal of cardiovascular pharmacology. 33, 360-366. https://doi.org/10.1097/00005344-199903000-00003

Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, 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

Zohra, M., Fawzia, A., 2014. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. International Journal of Pharma Sciences and Research. 5, 495-500. http://www.ijpsr.info/docs/IJPSR14-05-08-010.pdf

Legendas de figuras

Figura 1. Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a infusão de folhas de *Moringa oleifera*. Legenda: (A) Impressão digital da infusão (a-h: compostos detectados) e substância de referência (rutina-f). (B) Espectro de UV dos oito compostos detectados na infusão (a - b: derivados cinâmicos; c - h: compostos característicos de flavonoides).

Figura 2. Fotomicrografias representativas do fígado, rim e baço de camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com infusão de folhas de *M. oleifera* nas doses de 2.000 e 5.000 mg/kg.

Legenda: **Fígado:** a veia centrolobular (cv) é vista em todas as imagens mostrando cordões de hepatócitos intactos e organizados. Rim: Glomérulos renais (Gr) e os tubos contorcidos (pontas de seta) preservados e ordenados. Baço: os nódulos linfáticos (Nd) estão bem definidos nos grupos controle e tratado.

Figura 3. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade da infusão de folhas de *M. oleifera* (2.000 mg/kg).

Legenda: Índice de danos (A) e Frequência de danos (B) aferidos através do ensaio cometa; C - Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleo.

Tabela 1. Conteúdo de fenois totais, flavonoides e cumarinas e atividade antioxidante do extrato das folhas de *M. oleifera.*

Fenois totais (µg EAT/mg)	**Flavonoides (µg ER/mg)**	**Cumarinas (µg EC/mg)**	**DPPH (CI_{50})**	**ABTS (CI_{50})**
108,12 ± 1,59	2,69 ± 0,36	0,74 ± 0,06	51,51 ± 4,54	53,95 ± 3,26

IC_{50} (µg/mL): concentração necessária para liberar 50% de DPPH ou ABTS+. Dados representados pela média ± desvio padrão.

Tabela 2. Consumo de água (mL/animal/dia) e ração (g/animal/dia) e ganho de peso corporal (g) em camundongos tratados com dose única (2.000 e 5.000 mg/kg) da infusão das folhas de *M. oleifera*.

Parâmetro	**Controle**	**2.000 mg/kg**	**5.000 mg/kg**
Água (mL/animal/dia)	6,36 ± 0,74	7,31 ± 0,95	7,13 ± 1,02
Ração (g/animal/dia)	4,90 ± 0,80	5,58 ± 0,71	4,69 ± 0,73
Granho de peso (g)	3 ± 1,58	1,8 ± 0,84	1,2 ± 0,45

Valores representados pela média ± DP (n = 5/grupo). *p > 0.05 em comparação ao controle negativo.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com dose única da infusão das folhas de *M. oleifera* (2.000 e 5.000 mg/kg).

		Infusão	
Parâmetro	**Controle**	**2.000 mg/kg**	**5.000 mg/kg**
Eritrócitos (106/mm^3)	6,14±0,22	5,87±0,76	5,98±0,55
Hematócrito (%)	38,24±2,01	39,81±1,24	39,41±1,78
Hemoglobina (%)	14,55±0,58	14,63±0,65	14,84±0,70
VCM (%)	49,23±2,53	50,01±1,33	50,16±1,42
HCM (%)	17,88±0,52	17,56±0,80	17,71±0,67
CHCM (%)	35.90±1.17	35,16±1,43	35,48±1,39
Leucócitos (103/mm3)	8,77±0,43	8,58±0,70	8,64±0,88
Segmentados (%)	70,12±2,07	70,37±1,45	71,04±1,87
Linfócitos (%)	23,19±0,20	23,54±0,48	23,55±0,54
Monócitos (%)	3,13±0,14	3,25±0,37	3,32±0,30
Eosinófilos (%)	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01
Basófilos (%)	1,46±0,25	1,47±0,34	1,51±0,39

VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média. Valores representados pela média ± D.P. (n=5/grupo). Nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) foi encontrada em relação ao controle negativo.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com dose única da infusão das folhas de *M. oleifera* (2.000 e 5.000 mg/kg).

		Infusão	
Parâmetro	**Controle**	**2.000 mg/kg**	**5.000 mg/kg**
Albumina (g/dL)	38,20±1,36	37,95±2,17	38,05±2,43
ALT (U/L)	58,55±1,20	57,96±2,34	58,35±2,05
AST (U/L)	124,40±5,32	127,89±6,21	125,66±4,54
GGT (U/L)	13,60±0,34	13,67±0,35	13,54±0,40
Fosfatase alcalina (IU/L)	12,44±0,19	12,28±0,54	12,37±0,25
Proteínas totais (g/dL)	60,22±1,21	60,15±1,58	61,15±2,03
Creatinina (mg/dL)	4,22±0,35	4,20±0,42	4,39±0,51
Ureia	0,34±0,08	0,30±0,11	0,32±0,15
Colesterol total (mg/dL)	101,72±5,30	102,55±5,17	101,79±4,19
Triclicerídeos (mg/dL)	65,23±1,45	65,59±2,77	65,41±3,21

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; ALP: Fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamil transferase. Nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) foi encontrada em relação ao controle negativo.

Tabela 5. Avaliação do peso relativo (mg/g do peso corporal do animal) de camundongos tratados com dose única (2.000 e 5.000 mg / kg) da infusão das folhas de *M. oleifera*.

		Infusão	
Índice de órgãos (mg/g)	**Controle**	**2.000 mg/kg**	**5.000 mg/kg**
Fígado	64,53 ± 3,88	47,88 ± 2,52*[a]	47,56 ± 1,75*[a]
Rim	13,36 ± 1,80	10,73 ± 0,92*[a]	10,50 ± 0,61*[a]
Baço	5,92 ± 1,72	6,17 ± 0,77[a]	6,15 ± 1,03[a]

Valores representados pela média ± DP (n = 5/grupo). *$p > 0.05$ em comparação ao controle negativo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente em comparação com o outro grupo tratado.

Figura 1

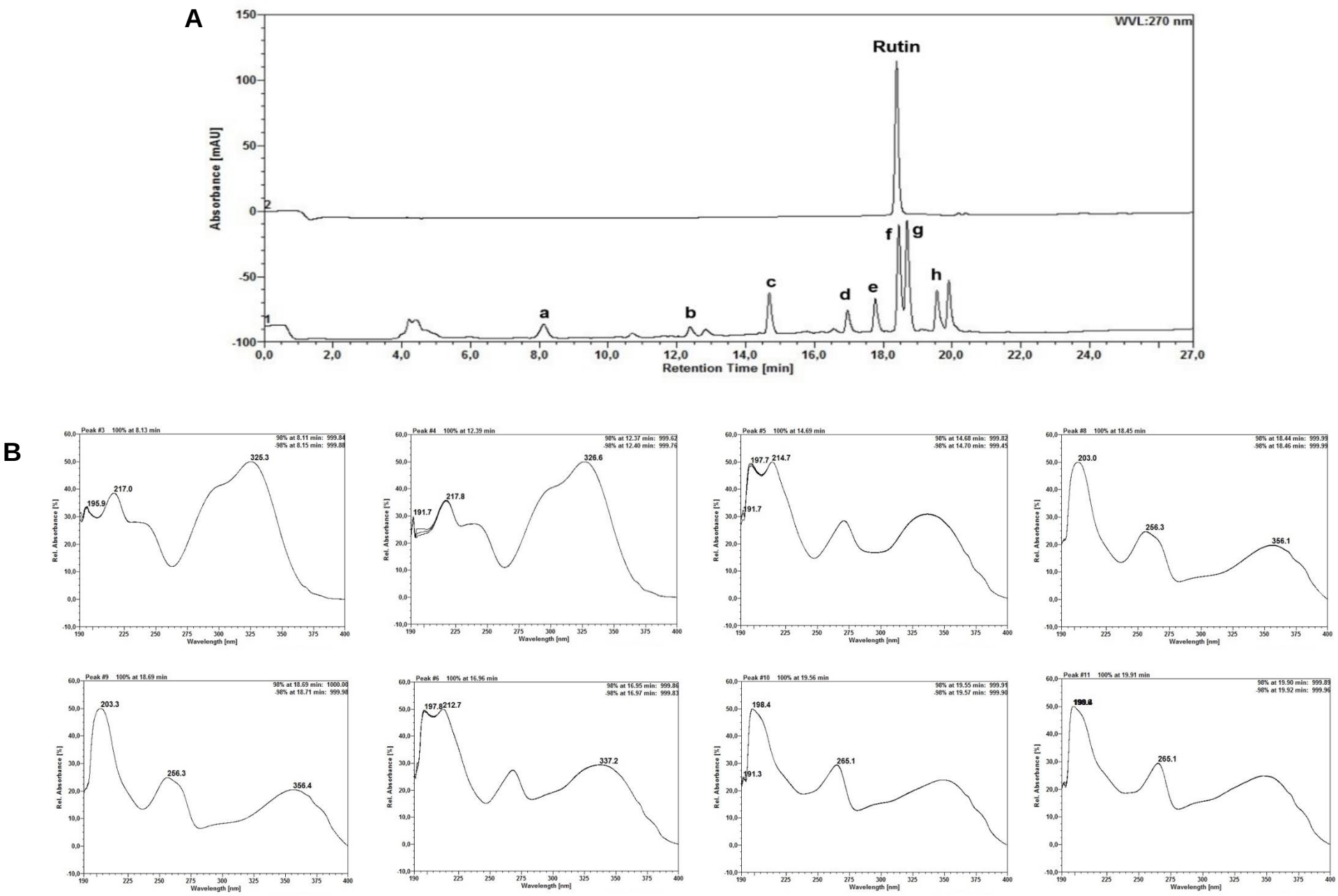

A
WVL:270 nm
Rutin
Absorbance [mAU]
Retention Time [min]
a
b
c
d
e
f
g
h
B
Peak #3 100% at 8.13 min
Peak #4 100% at 12.39 min
Peak #5 100% at 14.69 min
Peak #8 100% at 18.45 min
Peak #9 100% at 18.69 min
Peak #6 100% at 16.96 min
Peak #10 100% at 19.56 min
Peak #11 100% at 19.91 min
Rel. Absorbance [%]
Wavelength [nm]

Figura 2

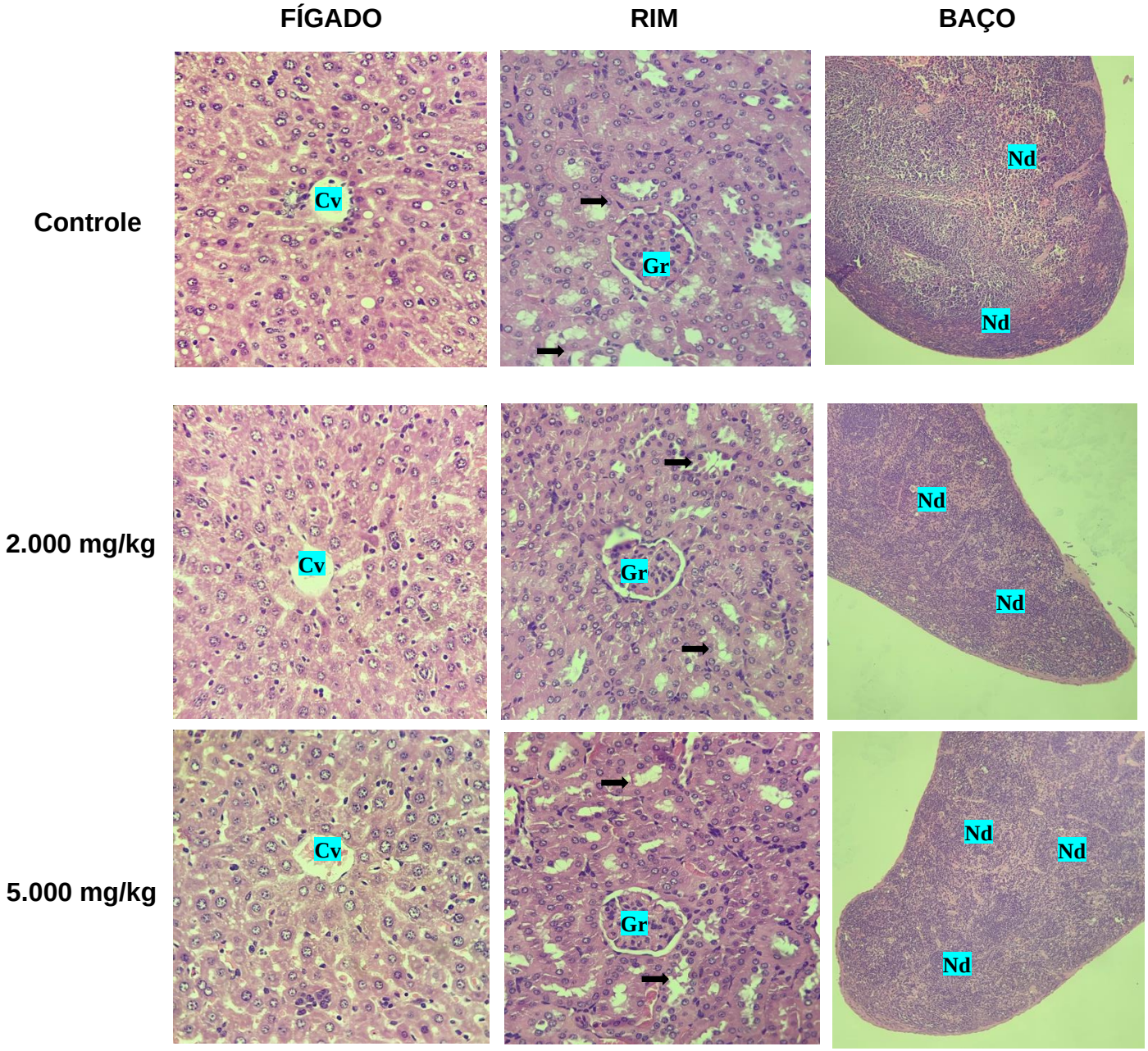
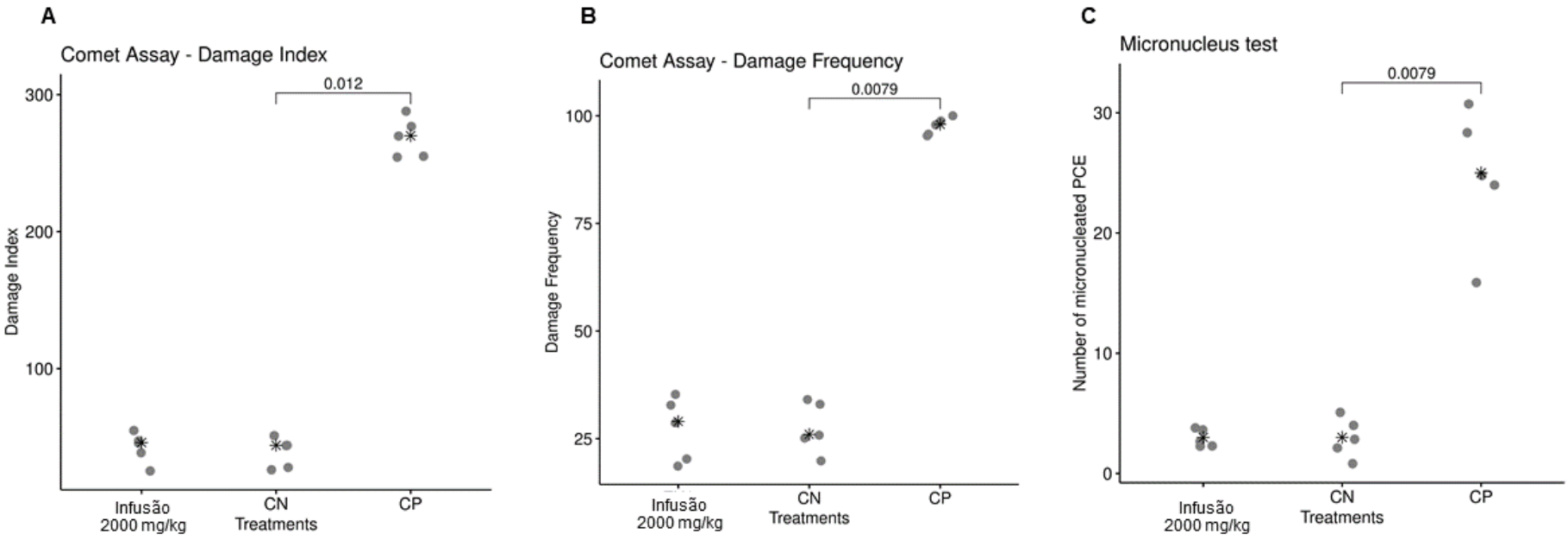


Figura 3


A
Comet Assay - Damage Index
0.012
Damage Index
300
200
100
Infusão 2000 mg/kg
CN
CP
Treatments
B
Comet Assay - Damage Frequency
0.0079
Damage Frequency
100
75
50
25
Infusão 2000 mg/kg
CN
CP
Treatments
C
Micronucleus test
0.0079
Number of micronucleated PCE
30
20
10
0
Infusão 2000 mg/kg
CN
CP
Treatments

6 CONCLUSÕES

A elucidação dos efeitos toxicológicos do uso das folhas de *M. oleifera* é essencial para garantir utilização segura dessa planta pela população de acordo com os benefícios nutricionais e medicinais já relatados na literatura. Além disso, fatores como o modelo animal adotado, método e concentração de produção do extrato, tempo de exposição e rota de administração devem ser considerados para as investigações toxicológicas de preparações obtidas a partir de *M. oleifera*.

O estudo com a infusão das folhas (10%) revelou que essa preparação consiste em uma boa fonte de polifenois e agentes antioxidantes e não apresentou atividade hemolítica *in vitro* em eritrócitos de camundongos. A investigação da toxicidade aguda em camundongos (2.000 e 5.000 mg/kg) não indicou a presença de efeitos sobre o peso corporal, consumo de água e ração e parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos em ambas as concentrações, no entanto, a avaliação do comportamento dos animais indica o uso de doses até 2.000 mg/kg. Além disso, nenhum efeito adverso ao material genético foi induzido pela administração oral da infusão (2.000 mg/kg).

REFERÊNCIAS

ABALAKA, M.; DANIYAN, S.; OYELEKE, S.; ADEYEMO, S. The antibacterial evaluation of *Moringa oleifera* leaf extracts on selected bacterial pathogens. **Journal of Microbiology research**, 2, n. 2, p. 1-4, 2012.

ABD-ELHAKIM, Y. M.; EL BOHI, K. M.; HASSAN, S. K.; EL SAYED, S.; ABD-ELMOTAL, S. M. Palliative effects of *Moringa oleifera* ethanolic extract on hemato-immunologic impacts of melamine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 114, p. 1-10, 2018.

ADEGUN, M.; AYE, P. Growth performance and economic analysis of West African Dwarf Rams fed *Moringa oleifera* and cotton seed cake as protein supplements to Panicum maximum. **Am. J. Food. Nutr**, 3, n. 2, p. 58-63, 2013.

ADENIJ, A.; LAWA, M. Effects of replacing groundnut cake with *Moringa oleifera* leaf meal in the diets of grower rabbits. **International Journal of Molecular Veterinary Research**, 2, n. 3, p. 1-6, 2012.

AEKTHAMMARAT, D.; PANNANGPETCH, P.; TANGSUCHARIT, P. *Moringa oleifera* leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. **Phytomedicine**, 54, p. 9-16, 2019.

AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical chemistry**, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RDC n. 48/04. Aprova o Regulamento Técnico, em anexo, visando atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2004a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RE n° 90/04. Determina a publicação do “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos’’. Diário Oficial da União, Brasília, 2004b.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27/ 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário - Diário Oficial da União, Brasília, 2010b.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa ANVISA n° 5/2010. Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos- Diário Oficial da União, Brasília, 2010a.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1.478/2019. Proíbe alimentos que apresentem *Moringa oleifera* na sua composição, em quaisquer formas de apresentação - Diário Oficial da União, Brasília, 2019.

AIRAODION, A. I.; OGBUAGU, U.; EKENJOKU, J. A.; OGBUAGU, E. O.; AIRAODION, E. O.; OKOROUKWU, V. N. Hepato-protective Efficiency of Ethanol Leaf Extract of *Moringa oleifera* Lam. against Hydrocarbon Exposure. 2019.

AL JUHAIMI, F.; GHAFOOR, K.; BABIKER, E. E.; MATTHÄUS, B; ÖZCAN, M. M. The biochemical composition of the leaves and seeds meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. **Journal of Food Biochemistry**, 41, n. 1, p. e12322, 2017.

ALI, A.; AKHTAR, N.; CHOWDHARY, F. Enhancement of human skin facial revitalization by moringa leaf extract cream. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, 31, n. 2, p. 71, 2014.

ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; MENDES, T. B.; JÚNIOR, P. L. S.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; CARVALHO, R. F.; SOUZA, E. B.; STOCCO, R. C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherap**y, v. 72, p. 74-82, 2015.

ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, F. V. B; BARROS, A. L. S.; MOURA, M. C.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PloS one**, 8, n. 12, p. e81973, 2013.

ARAÚJO, M. D. S. Manejo de espécies florestais para produção de madeira, forragem e restauração de áreas degradadas. **Caicó: Emparn**, 5, p. 60, 2010.

ARORA, D. S.; ONSARE, J. G. *In vitro* antimicrobial evaluation and phytoconstituents of *Moringa oleifera* pod husks. **Industrial Crops and Products**, 52, p. 125-135, 2014.

ASHFAQ, M.; BASRA, S. M. A.; ASHFAQ, U., 2012, Moringa: a miracle plant for agro-forestry.

AYERZA, R. Seed yield components, oil content, and fatty acid composition of two cultivars of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) growing in the Arid Chaco of Argentina. **Industrial Crops and Products**, 33, n. 2, p. 389-394, 2011.

AZEEZ, O.; ADAH, S.; OLAIFA, F.; BASIRU, A.; ABDULBAKI, R. The ameliorative effects of *Moringa oleifera* leaf extract on cardiovascular functions and osmotic fragility of wistar rats exposed to petrol vapour. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, 15, n. 2, p. 36-42, 2017.

BAIS, S.; SINGH, G. S.; SHARMA, R. Antiobesity and hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* leaves against high fat diet-induced obesity in rats. **Advances in Biology**, 2014, 2014.

BANJI, O. J.; BANJI, D.; KAVITHA, R. Immunomodulatory effects of alcoholic and hydroalcoholic extracts of *Moringa oleifera* Lam leaves. 2012.

BISWAS, D.; NANDY, S.; MUKHERJEE, A.; PANDEY, D.; DEY, A. *Moringa oleifera* Lam. and derived phytochemicals as promising antiviral agents: A review. **South African Journal of Botany**, 129, p. 272-282, 2020.

BOSE, C. K. Possible role of *Moringa oleifera* Lam. root in epithelial ovarian cancer. **Medscape General Medicine**, 9, n. 1, p. 26, 2007.

BOTHA, C.; PENRITH, M. L. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. **Journal of ethnopharmacology**, 119, n. 3, p. 549-558, 2008.

CAMPINAS, U. E. D. Tabela brasileira de composição de alimentos-TACO. UNICAMP/NEPA Campinas 2011.

CAMPOS, S.; SILVA, C.; CAMPANA, P.; ALMEIDA, V. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 18, n. 1, p. 373-382, 2016.

CHIN, C.-Y.; JALIL, J.; NG, P. Y.; NG, S.-F. Development and formulation of *Moringa oleifera* standardised leaf extract film dressing for wound healing application. **Journal of ethnopharmacology**, 212, p. 188-199, 2018.

CHING, L. S.; MOHAMED, S. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, 49, n. 6, p. 3101-3105, 2001.

CHINMA, C.; ABU, J.; AKOMA, S. Effect of germinated tigernut and moringa flour blends on the quality of wheat-based bread. **Journal of food processing and preservation**, 38, n. 2, p. 721-727, 2014.

CHUANG, P.-H.; LEE, C.-W.; CHOU, J.-Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B. J.; CHEN, H. M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource technology**, 98, n. 1, p. 232-236, 2007.

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

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; PAIVA, P. M. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of Aedes aegypti larvae. **Chemosphere**, 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

COSTA, S.; TEIXEIRA, J. P. Comet Assay. **Encyclopedia of Toxicology**, 3rd edition vol 4, v. 4, p. 1020-1023, 2014.

COZ-BOLAÑOS, X.; CAMPOS-VEGA, R.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS-GÓMEZ, M.; LOARCA-PIÑA, G. F.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H. Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity

attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator *in vitro*. **Industrial Crops and Products**, 118, p. 95-101, 2018.

DABA, M. Miracle tree: A review on multi-purposes of *Moringa oleifera* and its implication for climate change mitigation. **J. Earth Sci. Clim. Change**, 7, n. 4, 2016.

DACHANA, K.; RAJIV, J.; INDRANI, D.; PRAKASH, J. Effect of dried moringa (*Moringa oleifera* lam) leaves on rheological, microstructural, nutritional, textural and organoleptic characteristics of cookies. **Journal of Food Quality**, 33, n. 5, p. 660-677, 2010.

DAHIRU, D.; ONUBIYI, J.; UMARU, H. A. Phytochemical screening and antiulcerogenic effect of *Moringa oleifera* aqueous leaf extract. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 3, n. 3, p. 70-75, 2006.

DHAKAR, R. C.; MAURYA, S. D.; POONIYA, B. K.; BAIRWA, N.; GUPTA, M. Moringa: The herbal gold to combat malnutrition. **Chronicles of Young Scientists**, 2, n. 3, 2011.

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

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 141-164, 2001.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for life Journal**, 1, n. 5, p. 1-15, 2005.

FARID, A. S.; HEGAZY, A. M. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* leaf extract on levofloxacin-induced hepatic toxicity in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-7, 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. **Revista de Nutrição**, 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, R.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F.; SÁ, R; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; MORAIS, M. M. C.; PAIVA, P. MCoagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in applied microbiology**, 53, n. 2, p. 186-192, 2011.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico. Brasil, 2016.

Disponível em: https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais. Acesso em: 26 fev. 2021.

GEORGE, G.; AJAYI, O.; OYEMIKE, A. Effect of *Moringa oleifera* leaf aqueous extract on intraocular and blood pressure of normotensive adults in Edo State, Nigeria. **Journal of The Nigerian Optometric Association**, 20, n. 2, p. 75-81, 2018.

GEORGEWILL, O.; GEORGEWILL, U.; NWANKWOALA, R. Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* lam extract in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 3, n. 2, p. 133-135, 2010.

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D. S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. **Food science and human wellness,** 5, n. 2, p. 49-56, 2016.

GOUDA, A. S.; EL-NABARAWY, N. A.; IBRAHIM, S. F. *Moringa oleifera* extract (Lam) attenuates Aluminium phosphide-induced acute cardiac toxicity in rats. **Toxicology reports**, 5, p. 209-212, 2018.

GRAWÉ, J. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. In: **Molecular Toxicology Protocols**: Springer, 2005. p. 69-83.

GUPTA, A.; GAUTAM, M. K.; SINGH, R. K.; KUMAR, M. V.; RAO, C. V.; GOEL, R. K.; ANUPURBA, S. Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam. extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice. 2010.

GUPTA, S.; JAIN, R.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. **Journal of Herbal Medicine**, 11, p. 1-11, 2018.

HANNAN, M. A.; KANG, J.-Y.; MOHIBBULLAH, M.; HONG, Y.-K; LEE, H.; CHOI, J. S.; MOON, I. S. *Moringa oleifera* with promising neuronal survival and neurite outgrowth promoting potentials. **Journal of ethnopharmacology**, 152, n. 1, p. 142-150, 2014.

HASSAN, F. A. G.; IBRAHIM, M. A. *Moringa oleifera*: nature is most nutritious and multi-purpose tree. **International Journal of Scientific and Research Publications**, 3, n. 4, p. 1-5, 2013.

HENZ, B. The spectrum of urticaria. **In: Urticaria: Springer**, 1998. p. 1-17.

JOSHI, P.; MEHTA, D. Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. **Journal of metabolomics and systems biology**, 1, n. 1, p. 5-9, 2010.

JUHAIMI, F. A.; BABIKER, E.; GHAFOOR, K.; ÖZCAN, M. Fatty acid composition of three different Moringa leave oils. **La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, p. 111-113, 2016.

KADO, N. Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research Letters**, v. 121, n. 1, p. 25-32, 1983.

KIDMOSE, U.; YANG, R.-Y.; THILSTED, S.; CHRISTENSEN, L. P.; BRANDT, K. Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, n. 6-7, p. 562-571, 2006.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, John B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull.** - Trad. da 2.ed. - Porto Alegre: Artmed. 2012. 460p.

KOOLTHEAT, N.; SRANUJIT, R. P.; CHUMARK, P.; POTUP, P.; LAYTRAGOON-LEWIN, N.; USUWANTHIM, K. An ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* Lam. inhibits human macrophage cytokine production induced by cigarette smoke. **Nutrients**, 6, n. 2, p. 697-710, 2014.

KUIKMAN, M.; O'CONNOR, C. P. Sensory evaluation of Moringa-probiotic yogurt containing banana, sweet potato or avocado. **Journal of Food Research**, 4, n. 5, p. 165, 2015.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The scientific world journal**, 2013, 2013.

KUROKAWA, M.; WADHWANI, A.; KAI, H.; HIDAKA, M.; HIDAKA, M.; YOSHIDA, H.; SUGITA, C.; HAGIWARA, A. Activation of cellular immunity in herpes simplex virus type 1-infected mice by the oral administration of aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Phytotherapy** Research, 30, n. 5, p. 797-804, 2016.

LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. **International journal of molecular sciences**, 16, n. 6, p. 12791-12835, 2015.

LIN, M.; ZHANG, J.; CHEN, X. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. **Journal of functional foods**, 47, p. 469-479, 2018.

LOVELL, D. P. Draft report on statistical issues related to OECD in vitro genotoxicity test guidelines. **Disponível em: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Stat%20report%20TG%20473_487.pdf.** Acesso em: 25 jan. 2021.

LUQMAN, S.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, R.; MAURYA, A. K; CHANDA, D. Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

MAKKAR, H. A.; BECKER, K. Nutrional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. **Animal feed science and technology**, 63, n. 1-4, p. 211-228, 1996.

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

MANOHAR, V.; JAYASREE, T.; KISHORE, K.; RUPA, L.; DIXIT, R.; CHANDRASEKHAR, N. Evaluation of hypoglycemic and antihyperglycemic effect of freshly prepared aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves in normal and diabetic rabbits. **J. Chem. Pharm. Res**, 4, n. 1, p. 249-253, 2012.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. Mutation **Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 418, n. 2, p. 131-140, 1998.

MONSENY, A. M.; SÁNCHEZ, L. M.; SOLER, A. M.; MAZA, V. T. S.; CUBELLS, C. L. Poisonous plants: An ongoing problem. **Anales de Pediatría (English Edition)**, 82, n. 5, p. 347-353, 2015.

MOYO, B.; MASIKA, P. J.; HUGO, A.; MUCHENJE, V. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **African Journal of Biotechnology,** 10, n. 60, p. 12925-12933, 2011.

MUHAMMAD, A. A.; PAUZI, N. A. S.; ARULSELVAN, P.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. **BioMed research international**, 2013, 2013.

MUKUMBO, F.; MAPHOSA, V.; HUGO, A.; NKUKWANA, T.; MABUSELA, T. P.; MUCHENJE, V. Effect of *Moringa oleifera* leaf meal on finisher pig growth performance, meat quality, shelf life and fatty acid composition of pork. **South African Journal of Animal Science**, 44, n. 4, p. 388-400, 2014.

MULYANINGSIH, T. R.; YUSUF, S. Determination of minerals content in leaves of *Moringa oleifera* by neutron activation analysis. **GANENDRA Majalah IPTEK Nuklir**, 21, n. 1, p. 11-16, 2018.

NAMBIAR, V. S.; GUIN, P.; PARNAMI, S.; DANIEL, M. Impact of antioxidants from drumstick leaves on the lipid profile of hyperlipidemics. **J Herb Med Toxicol**, 4, n. 1, p. 165-172, 2010.

OLIVEIRA, A. M.; DA SILVA FÉRNANDES, M.; DE ABREU FILHO, B. A.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R. Inhibition and removal of staphylococcal biofilms using *Moringa oleifera* Lam. aqueous and saline extracts. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 6, n. 2, p. 2011-2016, 2018.

OLIVEIRA, J. T. A.; SILVEIRA, S. B.; VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79, n. 6, p. 815-820, 1999.

OLUDURO, A. O. Evaluation of antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in South-Western Nigeria. Malaysian **Journal of Microbiology**, 8, n. 2, p. 59-67, 2012.

OYEYINKA, A. T.; OYEYINKA, S. A. *Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 17, n. 2, p. 127-136, 2018.

PALIWAL, R.; SHARMA, V.; PRACHETA, J. A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): A multipurpose tree with high economic and commercial importance. **Asian J Biotechnol**, 3, n. 4, p. 317-328, 2011.

PANDA, S.; KAR, A.; SHARMA, P.; SHARMA, A. 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**, 23, n. 4, p. 959-962, 2013.

PASHA, S. N.; SHAFI, K. M.; JOSHI, A. G.; MEENAKSHI, I.; Harini, K.; MAHITA, J.; SOWDHAMINI, R. The transcriptome enables the identification of candidate genes behind medicinal value of Drumstick tree (*Moringa oleifera*). **Genomics**, 112, n. 1, p. 621-628, 2020.

PEIXOTO, J. R. O.; SILVA, G. C.; COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; FONTELES, A. A. F.; VIEIRA, R. H. S. F. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 4, n. 3, p. 201-204, 2011.

PEREIRA, F. S. G. **Viabilidade sustentável de biomassas de Moringa oleifera para produção de biodiesel e briquetes.** Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Doutorado em Química, Universidade Federal de Pernambuco–UFPE, Recife, 141f. (Tese de Doutorado), 2015.

PODURI, A.; EVRONY, G. D.; CAI, X.; WALSH, C. A. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. **Science**, v. 341, n. 6141, p. 1237758, 2013.

POPOOLA, J. O.; OBEMBE, O. O. Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, 150, n. 2, p. 682-691, 2013.

POTESTÀ, M.; MINUTOLO, A.; GISMONDI, A.; CANUTI, L.; KENZO, M.; ROGLIA, V.; MONTESANO, C. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Moringa oleifera* Lam on lymphoid and monocytoid cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 18, n. 1, p. 5-17, 2019.

PURWAL, L.; PATHAK, A.; JAIN, U. *In vivo* anticancer activity of the leaves and fruits of *Moringa oleifera* on mouse melanoma. **Pharmacology online**, 1, p. 655-665, 2010.

RADOVICH, T. Farm and forestry production and marketing profile for Moringa (*Moringa oleifera*). **Permanent Agriculture Resources (PAR): Holualoa**, HI, USA 2011.

RAJANGAM, J. Status of production and utilization of moringa in Southern India, paper presented at Development Potential for Moringa Products. October 2001.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K.; GOPALAKRISHNAN, P. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Economic botany**, p. 276-283, 1980.

RICHTER, N.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture**, 217, n. 1-4, p. 599-611, 2003.

ROCHA-FILHO, C. A.; ALBUQUERQUE, L. P.; SILVA, L. R.; SILVA, P. C.; COELHO, L. C.; NAVARRO, D. M.; PAIVA, P. M. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**, 132, p. 188-192, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenóides: Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. **Ministério de Meio Ambiente (MMA)**. 2017.

ROLIM, L. A. D. M. M.; PAIVA, P. M. G. **Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxidade.** 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

RUIZ, A. L. T.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H.; CARVALHO, J. E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

SAINI, R.; MANOJ, P.; SHETTY, N.; SRINIVASAN, K.; GIRIDHAR, P. Dietary iron supplements and *Moringa oleifera* leaves influence the liver hepcidin messenger

RNA expression and biochemical indices of iron status in rats. **Nutrition Research**, 34, n. 7, p. 630-638, 2014.

SALLAU, A. B.; MADA, S. B.; IBRAHIM, S.; IBRAHIM, U. Effect of boiling, simmering and blanching on the antinutritional content of Moringa oleifera leaves. **International Journal of Food Nutrition and Safety**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2012.

SÁNCHEZ-MACHADO, D.; LOPEZ-CERVANTES, J.; VÁZQUEZ, N. R. High-performance liquid chromatography method to measure α-and γ-tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. **Journal of chromatography**, 1105, n. 1-2, p. 111-114, 2006.

SANGAR, V.; SAMANT, L.; PAWAR, S.; VAIDYA, S.; CHOWDHARY, A. In silico approach to combat HIV using phytoconstituents of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 7, n. 12, p. 997-1021, 2015.

SANTOS, A. F.; LUZ, L. A.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M.; COELHO, L. C. *Moringa oleifera*: resource management and multiuse life tree. 2015.

SANTOS, AFS. **Moléculas bioativas de *Moringa oleifera*: detecção, isolamento e caracterização.** Centro de Ciências Biológicas, Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco–UFPE, Recife, 129f. (Tese de Doutorado), 2007.

SANTOS, N. D. L.; DE MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K. N.; COELHO, L. C. B. B., NAVARRO, D. M. D. A. F., & PAIVA, P. M. G. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, 7, n. 9, p. e44840, 2012.

SEIFU, E.; TEKETAY, D. Introduction and expansion of *Moringa oleifera* Lam. in Botswana: Current status and potential for commercialization. **South African Journal of Botany**, 2020.

SENGEV, A. I.; ABU, J. O.; GERNAH, D. I. Effect of *Moringa oleifera* leaf powder supplementation on some quality characteristics of wheat bread. **Food and nutrition sciences**, 4, n. 3, p. 270, 2013.

SHARMA, V.; PALIWAL, R.; SHARMA, P.; SHARMA, S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam. pods. **J. Pharm. Res**, 4, p. 554-557, 2011.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **Journal of agricultural and food chemistry,** 51, n. 8, p. 2144-2155, 2003.

SINGH, B. N.; SINGH, B.; SINGH, R.; PRAKASH, D.; DHAKAREY, R.; UPADHYAY, G.; SINGH, H. B. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-

quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. **Food and Chemical Toxicology**, 47, n. 6, p. 1109-1116, 2009.

SIVASANKARI, B.; ANANDHARAJ, M.; GUNASEKARAN, P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. **Journal of ethnopharmacology,** 153, n. 2, p. 408-423, 2014.

SOUSA, D. N. Levantamento de patentes sobre a planta *Moringa oleifera* no Brasil e no mundo. 2016.

SOUSA, D. N. **Levantamento de patentes sobre a planta Moringa oleifera no Brasil e no mundo**. Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 79f. (Dissertação de Mestrado), 2016.

STADTLANDER, T.; BECKER, K. Proximate composition, amino and fatty acid profiles and element compositions of four different Moringa species. **Journal of Agricultural Science**, 9, n. 7, p. 46-57, 2017.

SUDHA, P.; ASDAQ, S.; DHAMINGI, S. S.; CHANDRAKALA, G. K. Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* in animals. **Indian J Physiol Pharmacol**, 54, n. 2, p. 133-140, 2010.

SULAIMAN, M. R.; ZAKARIA, Z.; BUJARIMIN, A.; SOMCHIT, M.; ISRAF, D. A.; MOIN, S. Evaluation of *Moringa oleifera* aqueous extract for antinociceptive and anti-inflammatory activities in animal models. **Pharmaceutical biology**, 46, n. 12, p. 838-845, 2008.

TEIXEIRA, E. M. B.; CARVALHO, M. R. B.; Neves, V. A.; SILVA, M. A.; ARANTES-PEREIRA, L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Food chemistry**, 147, p. 51-54, 2014.

THAKUR, S.; BAJAGAIN, A. Moringa: alternative for the food security, climate resilience and livelihood improvement in Nepal. **International Journal of Research**, 8, n. 3, p. 190-200, 2020.

THE HIMALAYA DRUG COMPANY. Shigru. Disponível em: **https://himalayawellness.in/products/shigru?_pos=1&_sid=7db147e90&_ss=r.** Acesso em: 26 fev. 2021.

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

TREES FOR LIFE. Moringa Tree. **Disponível em: https://treesforlife.org/our-work/our-initiatives/moringa.** Acesso em: 25 jan. 2021.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERMA, A. R.; VIJAYAKUMAR, M.; MATHELA, C. S.; RAO, C. V. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. **Food and Chemical Toxicology**, 47, n. 9, p. 2196-2201, 2009.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environmental toxicology and pharmacology**, 35, n. 3, p. 473-485, 2013.

VERMA, V. K.; SINGH, N.; SAXENA, P.; SINGH, R. Anti-ulcer and antioxidant activity of *Moringa oleifera* (Lam) leaves against aspirin and ethanol induced gastric ulcer in rats. **Int Res J Pharm**, 2, n. 2, p. 46-57, 2012.

VILLASENOR, I. M.; LIM-SYLIANCO, C. Y.; DAYRIT, F. Mutagens from roasted seeds of *Moringa oleifera*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 224, n. 2, p. 209-212, 1989.

VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial crops and products**, 44, p. 566-571, 2013.

WATERMAN, C.; CHENG, D. M.; ROJAS-SILVA, P.; POULEV, A.; DREIFUS, J., LILA, M. A.; RASKIN, I. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*. **Phytochemistry**, 103, p. 114-122, 2014.

XUE, L.-M.; ZHANG, Q.-Y.; HAN, P.; JIANG, Y.-P.; YAN, R. D.; WANG, Y.; QIN, L. P. Hepatotoxic constituents and toxicological mechanism of *Xanthium strumarium* L. fruits. **Journal of ethnopharmacology**, 152, n. 2, p. 272-282, 2014.

YASSA, H. D.; TOHAMY, A. F. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. **Acta Histochemica**, 116, n. 5, p. 844-854, 2014.

YOUNUS, I.; SIDDIQ, A.; ISHAQ, H.; ANWER, L.; BADAR, S.; ASHRAF, M. Evaluation of antiviral activity of plant extracts against foot and mouth disease virus *in vitro*. **Pak. J. Pharm. Sci**, 29, n. 4, p. 1263-1268, 2016.

ZHANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; KANNAN, A.; PRAISOODY, A.; MUHUNDAN, A. Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of Hibiscus sabdariffa, Centella asiatica, *Moringa oleifera* and *Murraya koenigii* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research,** 5, n. 30, p. 6672-6680, 2011.

ANEXO A

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
4ª DIRETORIA
GERÊNCIA-GERAL DE INSPEÇÃO E FISCALIZAÇÃO SANITÁRIA

RESOLUÇÃO-RE Nº 1.478, DE 3 DE JUNHO DE 2019

O Gerente-Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o art. 171, aliado ao art. 54, I, § 1º do Regimento Interno aprovado pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 255, de 10 de dezembro de 2018, resolve:

Art. 1º Adotar a(s) medida(s) cautelar(es) constante(s) no ANEXO.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

RONALDO LUCIO PONCIANO GOMES

ANEXO

1. Empresa: Todas.
Produto - (Lote): ALIMENTOS QUE APRESENTEM MORINGA OLEIFERA NA SUA COMPOSIÇÃO, EM QUAISQUER FORMAS DE APRESENTAÇÃO(todos); MORINGA OLEIFERA COMO INSUMO PARA ALIMENTOS, EM QUAISQUER FORMAS DE APRESENTAÇÃO(todos);
Tipo de Produto: Alimento
Expediente nº: 0360332/19-6
Assunto: 70351 - MEDIDA CAUTELAR- Ações de Fiscalização em Vigilância Sanitária
Ações de fiscalização: Proibição - Comercialização, Distribuição, Fabricação, Importação, Propaganda
Motivação: Considerando não haver avaliação e comprovação de segurança do uso da espécie Moringa oleifera em alimentos; Considerando que produtos denominados e/ou constituídos de Moringa oleifera vêm sendo irregularmente comercializados e divulgados com diversas alegações terapêuticas não permitidas para alimentos, infringindo os arts. 21, 23, 31 e 56 do Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969; item 4.3 da Resolução Anvisa n° 16, de 30 de abril de 1999; item 3.5 da Resolução Anvisa n° 18, de 30 de abril de 1999; item 3.1, alíneas b, e, f e g da Resolução - RDC n° 259, de 20 de setembro de 2002.