



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATHÁLIA REGINA GALVÃO SILVA

**PLANEJAMENTO FATORIAL, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA,
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATO DE FOLHAS DE *Moringa Oleifera***

Recife
2025

NATHÁLIA REGINA GALVÃO SILVA

**PLANEJAMENTO FATORIAL, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA,
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATO DE FOLHAS DE *Moringa Oleifera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Sistemas Biológicos, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para o título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área: Sistemas Biológicos

Linha de Pesquisa: Compostos Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Dr. Alisson Macário de Oliveira

RECIFE
2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Nathália Regina Galvão.

Planejamento fatorial, caracterização fitoquímica, avaliação toxicológica e atividade antimicrobiana de extrato de folhas de Moringa Oleifera / Nathália Regina Galvão Silva. - Recife, 2025. 91f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Orientação: Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientação: Alisson Macário de Oliveira.

Inclui referências.

1. Bactéria; 2. Fungo; 3. Vírus; 4. Toxicidade. I. Paiva, Patrícia Maria Guedes. II. Oliveira, Alisson Macário de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

NATHÁLIA REGINA GALVÃO SILVA

**PLANEJAMENTO FATORIAL, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA,
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATO DE FOLHAS DE *Moringa Oleifera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Sistemas Biológicos, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para o título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28 de março de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^o Dr. Thiago Henrique Napoleão

Universidade Federal de Pernambuco

Maria Betânia Melo de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco

Leydianne Leite de Siqueira Patriota

Universidade Federal de Pernambuco

Gustavo Ramos Salles Ferreira

Universidade Federal de Pernambuco

In memoriam

Dedico este trabalho a minha prima/irmã
Maria Eduarda Galvão, pelo apoio e amor
incondicional que foi nessa vida e em
todas as outras.

AGRADECIMENTOS

A mim mesma, por ter lutado tanto pela minha saúde mental e, apesar de tudo, nunca ter desistido dos meus objetivos. Durante o doutorado, recebi o diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista, TDAH e altas habilidades. Passei muito tempo sem entender por que eu era diferente dos demais, lidando com a dor de enfrentar crises autistas sem as ferramentas necessárias. Ainda assim, consegui ser quem eu sempre almejei ser. Obrigada, Nathália, que lutou por tudo isso e sabe o quanto foi difícil.

À minha orientadora, Patrícia Paiva, pelo acompanhamento ao longo desta pesquisa. Seu apoio durante este período contribuiu para a realização deste trabalho. Sou grata pela orientação recebida.

À minha psicóloga, Fernanda, por esses 4 anos juntas e de muito crescimento, a sua ajuda foi primordial.

Aos meus pais, pelo suporte que tive em toda minha vida. Vocês sempre me empurraram para o sucesso, sempre me ouviram falar de Biologia, de lectina e de tantos assuntos diversos. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Aos meus sobrinhos, que são os amores da minha vida e miniaturas de mim. A todos os membros da minha família que sempre me apoiaram, especialmente: Leandro, Bárbara, Lourdinha, Mayra, Tia Iron e meus avôs.

À minha esposa, Tayná Santos. Obrigada por você sempre estar ao meu lado, pela nossa história e por torcer loucamente comigo pelo maior do nordeste. Estar com você é a minha felicidade. Te amo.

Aos meus primos, Bruno e Maria Eduarda. A vida nos deu o mesmo sobrenome, e eu nunca imaginei que seríamos como irmãos. Em 2024, perdemos Maria Eduarda para a depressão, mas eu sei que você sempre cuidará de mim e de Bruno. Prometemos que sua memória nunca será esquecida enquanto vivermos.

À família que a vida me deu: Francielly, Dudinha e Jorge. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, serem minha rede de apoio, me abraçarem quando preciso e puxarem minha orelha quando preciso ainda mais. Eu amo vocês.

À Andressa Souza, que me aguenta desde 2006. Obrigada, minha irmã, por todo o apoio, pelas conversas e pelos abraços. Uma amizade que começou no Fundamental I e que perdura por toda a vida.

A todos os meus amigos que me aguentaram nos perrengues e na parte boa da vida: Well, Tenyson, Marcela, Niedja, Analu, Thayná, Bruno Hedes, Bruno Debique, Roberta, Douglas, Mirla, Rafa e Ivo.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (Bioprot).

Ao Dr. Alisson Macário pela coorientação, por estar disposto a me ajudar nesse doutorado.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco e Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

RESUMO

Moringa oleifera é uma planta nativa do leste da África e sul da Índia, com cultivo expandido globalmente em regiões tropicais e subtropicais. Reconhecida por seu valor nutricional e propriedades medicinais, produz moléculas com potencial antibacteriano, que podem ser alternativas menos tóxicas em comparação a antibióticos comerciais. Este estudo teve como objetivos otimizar e caracterizar um extrato aquoso de folhas de *M. oleifera*, determinar sua toxicidade *in vivo* e seu efeito contra bactérias, fungos e vírus. O extrato otimizado de *M. oleifera* (OEMo) foi produzido por maceração a 5%, utilizando um delineamento fatorial. No ensaio de toxicidade subcrônica *in vivo*, camundongos machos e fêmeas receberam diariamente doses orais de 250, 500 e 1000 mg/kg do OEMo por 13 semanas. A atividade antibacteriana e antifúngica foi avaliada *in vitro* pela determinação do efeito no crescimento, sobrevivência e formação de biofilmes. Sinergismo com antibióticos também foi investigado. A determinação da atividade antibacteriana *in vivo* com as larvas de *Tenebrio molitor* ocorreu com a concentração inibitória mínima do OEMo (125 µg/mL e 500 µg/mL) e as larvas foram infectadas por *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*. A determinação da atividade antiviral do OEMo (0,3 a 0,9 mg/mL) usou células Vero CCL-81 infectadas por vírus Chikungunya. O ensaio de toxicidade subcrônica revelou que as doses de 250 e 500 mg/kg não causaram alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, hematológicos ou histológicos, indicando baixa toxicidade. No entanto, a dose de 1000 mg/kg reduziu o peso corporal e consumo alimentar, além de elevar as transaminases hepáticas, sugerindo possível toxicidade hepática. O OEMo, em todas as concentrações, reduziu significativamente os níveis de colesterol e triglicerídeos, evidenciando seu potencial anti-hiperlipidêmico. OEMo foi antibacteriano contra *E. coli* e *S. marcescens*, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) de 125 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. Além disso, inibiu a formação de biofilmes dessas bactérias em mais de 50%, nas concentrações de 100 e 400 µg/mL, e reduziu a viabilidade celular em 38% (*E. coli*) e 18% (*S. marcescens*). Quando combinado com o antibiótico ceftazidima, o extrato apresentou efeito sinérgico, ampliando a eficácia do tratamento contra ambas as bactérias. OEMo não apresentou atividade antifúngica para as espécies de *Candida* e *Cryptococcus* testadas. Em modelo *in vivo* com larvas de *T. molitor*, o extrato não causou toxicidade e reduziu significativamente a mortalidade associada à infecção por *E. coli*. Em relação à atividade antiviral, OEMo apresentou ação contra o vírus Chikungunya, ampliando seu espectro antimicrobiano, mesmo infectadas, as células permaneceram viáveis indicando a atividade antiviral do extrato. Essas descobertas abrem importantes perspectivas para a utilização clínica do OEMo e incentivam novos estudos para explorar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades biológicas detectadas e para a definição de possíveis aplicações terapêuticas.

Palavras – chave: Bactéria, Fungo, Vírus, toxicidade *in vivo*.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a plant native to East Africa and South India, with widespread cultivation in tropical and subtropical regions worldwide. Recognized for its nutritional value and medicinal properties, it produces molecules with antibacterial potential that may serve as less toxic alternatives to commercial antibiotics. This study aimed to optimize and characterize an aqueous extract of *M. oleifera* leaves, assess its in vivo toxicity, and evaluate its effects against bacteria, fungi, and viruses. The optimized *M. oleifera* extract (OEMo) was obtained through 5% maceration using a factorial design. In the subchronic in vivo toxicity assay, male and female mice received daily oral doses of 250, 500, and 1000 mg/kg of OEMo for 13 weeks. Antibacterial and antifungal activities were assessed in vitro by analyzing effects on microbial growth, survival, and biofilm formation. Synergism with antibiotics was also investigated. In vivo antibacterial activity was evaluated using *Tenebrio molitor* larvae exposed to the minimum inhibitory concentrations of OEMo (125 µg/mL and 500 µg/mL), followed by infection with *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. Antiviral activity (0.3 to 0.9 mg/mL) was tested in Vero CCL-81 cells infected with Chikungunya virus. Subchronic toxicity tests revealed that 250 and 500 mg/kg doses caused no significant changes in physiological, hematological, or histological parameters, indicating low toxicity. However, the 1000 mg/kg dose led to reduced body weight and food intake, along with elevated liver transaminases, suggesting potential hepatotoxicity. OEMo significantly reduced cholesterol and triglyceride levels at all tested doses, highlighting its anti-hyperlipidemic potential. OEMo exhibited antibacterial activity against *E. coli* and *S. marcescens*, with minimum inhibitory concentrations (MICs) of 125 µg/mL and 500 µg/mL, respectively. It also inhibited biofilm formation by more than 50% at concentrations of 100 and 400 µg/mL and reduced cell viability by 38% (*E. coli*) and 18% (*S. marcescens*). When combined with the antibiotic ceftazidime, the extract demonstrated a synergistic effect, enhancing treatment efficacy against both bacteria. OEMo showed no antifungal activity against the tested *Candida* and *Cryptococcus* species. In the *T. molitor* larvae model, the extract was non-toxic and significantly reduced mortality associated with *E. coli* infection. Regarding antiviral activity, OEMo exhibited an effect against Chikungunya virus, broadening its antimicrobial spectrum; despite viral infection, treated cells remained viable, indicating antiviral activity. These findings open important perspectives for the clinical use of OEMo and encourage

further studies to explore the mechanisms underlying its biological activities and define possible therapeutic applications.

Keywords: Bacteria, Fungus, Virus, in vivo toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de Moringa oleífera.....	18
Figura 2: Aspectos morfológicos de Moringa oleífera: A – caule, B – folhas, C – flores, D e E – sementes e F – Raízes.	19
Figura 3: Estrutura química de alguns fenóis identificados em Moringa oleífera.	24
Figura 4: Atividade antibacteriana de extratos da folha de Moringa oleifera	27
Figura 5: Linha do tempo dos aspectos regulatório para registro e pesquisa de plantas medicinais.	34
Figura 6: Principais mecanismos de resistência a antibiótico.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos de flavonoides identificados na Moringa oleífera.	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

MRSA - Staphylococcus aureus resistente a meticilina

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CBM - Concentração Bactericida Mínima

FDA - Food and Drug Administration

DOE - Design of Experiments

SINTOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico- Farmacológica

SNFMMF - Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS - Sistema Único de Saúde

PNMF- Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

OMS - Organização Mundial da Saúde

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

DSTs - Doenças Sexualmente Transmissíveis

CCD-AE - Cromatografia Em Camada Delgada De Alta Eficiência

CLAE - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência

Sumário

INTRODUÇÃO	15
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
1.1. <i>Moringa oleifera</i>	17
1.1.1. Composição fitoquímica.....	20
1.1.2. Atividade Antimicrobiana	24
1.1.3. Toxicidade	28
1.2. Planejamento Fatorial para otimização do extrato.....	30
1.3. Aspectos regulatório para registro e pesquisa de plantas medicinais	32
1.4. Plantas medicinais e seu potencial antibacteriano.....	35
2. OBJETIVOS	39
2.1. Geral.....	39
2.2. Específico	39
3. ARTIGOS	40
3.1. Artigo 1: 13-WEEK REPEATED-DOSE TOXICITY STUDY OF OPTIMIZED AQUEOUS EXTRACT OF <i>Moringa oleifera</i> LEAVES IN MICE.....	40
3.2. Artigo 2: Atividades antimicorbiana do extrato otimizado das folhas de <i>Moringa oleifera</i>	51
4. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

INTRODUÇÃO

Moringa oleifera Lamarck é uma planta pertencente à família Moringaceae nativa da África Oriental e Sul da Índia, porém o cultivo ocorre em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (DZUVOR et al., 2021). As folhas da moringa são popularmente utilizadas na alimentação, tendo em vista que toda a sua anatomia vegetal é comestível e possui benefícios, sendo esta espécie uma relevante fonte de proteínas, vitaminas e minerais (OYEYINKA et al., 2018).

Essa espécie tem conquistado seu espaço nas pesquisas de diversas áreas, visto que seu uso na medicina folclórica é reconhecido há muito tempo, principalmente para tratar patologias associadas à inflamação e à dor (MEHWISH et al., 2022). A moringa é popularmente utilizada contra conjuntivite, tratamento de anemia, no controle da pressão arterial e glicemia (KASHYAP et al., 2022). As folhas de *M. oleifera* apresentam atividade antibacteriana (BUDARAGA; PRAMANA; WELLYALINA, 2020). O extrato aquoso da folha, foi utilizado para estudo neural contra ação da nicotina *in vivo* e os autores revelaram que ele foi capaz de prevenir cromatólise, distorção das células corticais cerebelares e déficit neurocomportamental (OMOTOSO et al., 2018). O extrato hidroetanólico das folhas possuem atividade antioxidante (VATS; GUPTA, 2017). As folhas também possuem atividade antileishmania (HAMMI et al., 2020), efeitos contra broncoconstrição, inflamação das vias aéreas e asma (SURESH; SISODIA, 2020).

Os produtos naturais derivados da moringa, além de serem tratamentos eficazes, também podem ter um melhor custo econômico e serem menos tóxicos do que os produtos sintéticos (AWARE et al., 2022). Apesar de todos os efeitos benéficos desta espécie, é importante enfatizar a necessidade de entender e determinar a toxicidade de produtos naturais, considerando que este fato pode restringir o potencial biotecnológico e farmacêutico do produto (AWARE et al., 2022).

Tendo em vista os diversos estudos sobre a composição química das folhas de *M. oleifera*, é importante aprofundar as pesquisas sobre a padronização de soluções extrativas que visam assegurar princípios de reprodutibilidade da extração, o que pode afetar a eficiência e segurança do uso. Assim, avaliar a influência da concentração vegetal, propriedades físico-químicas e método de extração de soluções extrativas vegetais deve ser o primeiro passo durante o desenvolvimento tecnológico de fitofármacos (ALI et al., 2018). Autores relatam a presença de polifenóis como

constituente responsável por atividades biológicas da moringa, sendo assim considerados marcadores químicos da espécie (COZ-BOLAÑOS et al., 2018).

Desta forma, com base no tipo de extração, solvente e fatores ambientais, a composição química de *M. oleifera* pode ser afetada, gerando respostas toxicológicas e farmacológicas distintas (JOSHI; MEHTA, 2010). Com base nisso, devido à falta de relatórios de estudos de toxicidade de preparações de *Moringa oleifera* cultivadas no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a produção, comercialização, distribuição e importação de produtos contendo partes de *M. oleifera* (BRASIL, 2019).

Nesse contexto, o estudo da atividade antimicrobiana e antiviral de *M. oleifera* torna-se especialmente relevante diante da importância clínica de determinadas cepas bacterianas. Entre os microrganismos bacterianos de maior preocupação estão *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, ambos amplamente distribuídos e comumente associados a infecções oportunistas, sobretudo em ambientes hospitalares (TAVARES-CARREON et al., 2023; NESSE et al., 2023). *E. coli* destaca-se como uma das principais causadoras de infecções do trato urinário e infecções entéricas (NESSE et al., 2023), enquanto *S. marcescens* está frequentemente relacionada a quadros de pneumonia, infecções de feridas e septicemias, com alta incidência em pacientes imunocomprometidos (TAVARES-CARREON et al., 2023). Esses patógenos possuem mecanismos de virulência variados, como a formação de biofilmes, que dificultam o tratamento e favorecem a persistência da infecção (TAVARES-CARREON et al., 2023; NESSE et al., 2023).

Além dos desafios bacterianos, infecções virais também representam uma preocupação crescente, especialmente no contexto de arboviroses tropicais. O vírus Chikungunya (CHIKV), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, é responsável por surtos epidêmicos caracterizados por febre aguda, mialgia intensa, artralgia incapacitante e, em alguns casos, manifestações neurológicas crônicas (BARROS FILHO et al., 2024). A ausência de antivirais específicos ou vacinas aprovadas para Chikungunya reforça a necessidade urgente de investigação de novos compostos bioativos de origem natural (BARROS FILHO et al., 2024), como os derivados de *M. oleifera*.

Diante disso, a presente tese teve como objetivo otimizar e caracterizar um extrato aquoso padronizado de folhas de *Moringa oleifera* (OEMo), avaliar sua toxicidade subcrônica in vivo e investigar seu potencial antimicrobiano e antiviral.

Assim, este trabalho fornece evidências experimentais relevantes sobre a segurança e eficácia do extrato aquoso de *M. oleifera*, demonstrando seu potencial como agente terapêutico alternativo no controle de infecções bacterianas e virais. Além de ampliar o conhecimento científico sobre a planta, os dados obtidos podem subsidiar futuras avaliações regulatórias e aplicações farmacêuticas, especialmente em países tropicais onde a moringa é amplamente disponível e agentes infecciosos como o vírus Chikungunya apresentam alta incidência.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. *Moringa oleifera*

Moringa oleifera é uma das 16 espécies do gênero *Moringa*, sendo a mais importante economicamente por possuir propriedades nutricionais, industriais e medicinais (MATIAS et al., 2023). Originalmente é uma espécie nativa da África Oriental e Sul da Índia e é popularmente chamada de moringa ou cedro (MATIAS et al., 2023). Essa espécie consegue se adaptar facilmente a diversos ambientes, como uma pouca disponibilidade hídrica e solos com baixo nível de nutrientes (HASSAN; IBRAHIM, 2013). Sendo assim, a moringa pode ser cultivada amplamente pelo mundo.

M. oleifera é uma árvore de porte grande (Figura 1) que pode chegar a 12 metros, também pode ser caracterizada por ter uma coroa aberta em forma de guarda-chuva, com raízes profundas, com galhos jovens que podem ser encontrados cobertos de penugem esbranquiçada (OLIVEIRA et al., 2022; GUALBERTO et al., 2014). Além disto, pode-se destacar alguns aspectos morfológicos dessa espécie, como folhas alternadas, flores pentárgicas com cor entre branco a creme e um fruto em formato de cápsula de 3 ápices, que é conhecido como “vagem” (Figura 2) (CAVALCANTE et al., 2017; LIU et al., 2018).

Figura 1: Árvore de *Moringa oleífera*.



Fonte: Oliveira et al. (2022)

Os frutos de moringa são verdes na juventude e tornam-se marrons quando maduros, sendo a semente rica em óleo. A planta produz suas sementes no primeiro ano que esteja em condições favoráveis para seu desenvolvimento. Ao chegar à estação mais úmida, é possível evidenciar a floração e ao adentrar na estação seca a planta perde suas folhas. Em certas ocasiões, esses dois fenômenos podem acontecer simultaneamente, desta forma, floresce juntamente as caídas das folhas, ou flora e produz frutos (OLIVEIRA et al., 2022).

Figura 2: Aspectos morfológicos de *Moringa oleifera*: A – caule, B – folhas, C – flores, D – vagem, E - sementes e F – Raízes.



Fonte: Oliveira et al. (2022)

De acordo com Boateng et al. (2018) o cultivo de moringa é incentivado com o objetivo de aumentar a segurança alimentar e diminuir a desnutrição em países em desenvolvimento. A folha, a vagem e a flor são os locais com alto teor nutricional; as folhas possuem vitamina A e C, cálcio, ferro e fósforo, além de duas vezes mais proteínas que o leite e três vezes mais potássio que as bananas (ASENSI; VILLADIEGO; BERRUEZO, 2017). Os frutos são compostos por elevados teores de proteínas. As sementes detêm aproximadamente 40% de óleo comestível e podem fornecer ácido oleico, esteróis e tocoferóis (SINGH et al., 2020).

Além do uso alimentar, *M. oleifera* pode ser utilizada em bioenergia, ornamentação, agricultura e na medicina (AHMAD et al., 2016; AGBOUN et al., 2016;

BAPTISTA et al., 2017). Em decorrência do alto teor de produção do óleo das sementes, a moringa é um ótimo fator de conversão de biodiesel, o qual tem características de estabilidade oxidativa, viscosidade e uma ótima concentração de cetano, tornando o biodiesel de moringa uma ótima possibilidade de substituição de outros utilizados na indústria (NIJ; BALAJII; ANUSHYA, 2019). Em outro âmbito, essa espécie é muito conhecida no uso de purificação da água, pois suas sementes são um substituto para coagulantes químicos nas estações de tratamento de água, além da capacidade de remover microrganismos (PAIXÃO et al., 2018)

Por fim, a moringa pode ser conhecida como “árvore milagrosa”, tendo em vista seu uso medicinal. Os extratos da folha têm algumas atividades biológicas descritas na literatura como: anti-inflamatório (COZ-BOLAÑOS et al., 2018), larvicida contra *Aedes aegypti* (SILVA et al., 2021), antitumoral (AL-ASMARI et al., 2015), antifúngica (ATRI et al., 2020), cicatrizante (108), diurética, entre outras. Basicamente todas as partes dessa espécie podem ter alguma finalidade benéfica para a população, contudo, a folha é comumente utilizada em decorrência da acessibilidade de coleta.

Para compreender a ampla variedade de atividades biológicas da moringa, é importante conhecer a sua composição fitoquímica e a segurança do uso de compostos naturais e seus derivados.

1.1.1. Composição fitoquímica

O conhecimento popular sobre o uso das plantas em conjunto com as informações etnofarmacológicas, torna-se o ponto principal que direciona as pesquisas das propriedades com fins terapêuticos (SÜNTAR, 2020). As plantas são amplamente estudadas por pesquisadores de diversas áreas e esse interesse é motivado por serem uma fonte de moléculas com potenciais bioativos para a sociedade (ANAND et al., 2020).

Os compostos bioativos, também chamados de metabólitos secundários, são produzidos pelas plantas com intuito de proteção contra microrganismos e predadores, ou para simbiose, competição e outras ações benéficas para a espécie (OLIVEIRA et al., 2022). Esses metabólitos secundários caracterizam a planta e auxiliam a entender quanto ao uso medicinal e industrial.

Os caules, folhas, flores, vagens e sementes de *M. oleifera* possuem metabólitos secundários que são bioativos, por exemplo flavonoides, ácidos fenólicos, glicosídeo e glicosinolatos (MBIKAY, 2012). Além disto, foram identificados vitaminas (A, B1, B2, B3, C e E), carotenoides, alcaloides, taninos, saponinas, oxalatos, fitatos, isotiocianatos e minerais (SHIH et al., 2011; ZHANG et al., 2011; COPPIN et al., 2013; PRABAKARAN et al., 2018; LIN et al., 2018; DJANDE et al., 2018; XU; CHEN; GUO, 2019). Contudo, a distribuição e a quantidade desses compostos são variáveis, nos tecidos da planta, em decorrência da localização geográfica, o solo e o clima, entre outros fatores (SINGH et al., 2020). Ademais, é importante ressaltar que a extração desses compostos secundários também depende da forma de extração e do solvente utilizado (VONGSAK et al., 2013).

De acordo com Liu e colaboradores (2022), até início de 2022 havia sido encontrados e descritos quase quarenta compostos da classe de flavonoides nos tecidos de moringa (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos de flavonoides identificados na *Moringa oleífera*.

Nº	Nome do Composto	Tecido
1	Astragalin	Folhas
2	Quercetin-3-O-(6"-malonylglucoside)	Folhas
3	Quercetin-3-O-rhamnosylglucoside	Sementes, Folhas
4	Kaempferol-3-O-(6"-malonylglucoside)	Folhas
5	Quercetin-3-O-β-D-(6"-O-3-hydroxy-3-methylglutaryl)-glucoside	Folhas
6	Kaempferide-3-O-2",3"-diacetylglucoside	Folhas
7	Kaempferol-3-O-[β-glucosyl-(1→2)]-[α-rhamnosyl-(1→6)-O-β-glucoside-7-O-arhamnoside	Folhas
8	Kaempferide-3-O-(2"-O-galloylrhamnoside)	Folhas
9	Kaempferide-3-O-(2"-O-galloylrutinoside)-7-O-α-rhamnoside	Folhas
10	Kaempferol-3-O-[α-rhamnosyl-(1→2)]-[α-rhamnosyl-(1→4)-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside	Folhas

Nº	Nome do Composto	Tecido
11	Quercetin 3-O-rutinoside	Vagem
12	Quercetin 3-O-glucoside	Sementes, Folhas
13	Kaempferol 3-O-rutinoside	Vagem
14	Isorhamnetin 3-O-(6"-malonylglucoside)	Vagem
15	Quercetin	Sementes
16	Kaempferol	Sementes
17	Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	Folhas
18	Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside	Folhas
19	Isoquercitrin	Folhas
20	7-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-O-Menaringenin-4'-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside	Tronco
21	Quercetin-3-O-β-D-(6"-O-malonyl)-glucoside	Folhas
22	Kaempferol-3-O-β-D-(6"-O-malonyl)-glucoside	Folhas
23	Myricetin	Folhas
24	Isorhamnetin	Folhas
25	Apigenin	Folhas
26	Daidzein	Folhas
27	Genistein	Folhas
28	Luteolin	Folhas
29	Quercetin-O-3,7-diglucoside	Folhas
30	Apigenin-O-8-glucoside	Folhas
31	Quercetin-O-3-glucoside	Folhas
32	Apigenin-7-C-glucoside	Folhas
33	Kaempferol-O-3,7-diglucoside	Folhas

Nº	Nome do Composto	Tecido
34	Quercetin-3-acetylglucoside	Folhas
35	Kaempferol-O-3-glucoside	Folhas
36	Kaempferol-O-7-glucoside	Folhas

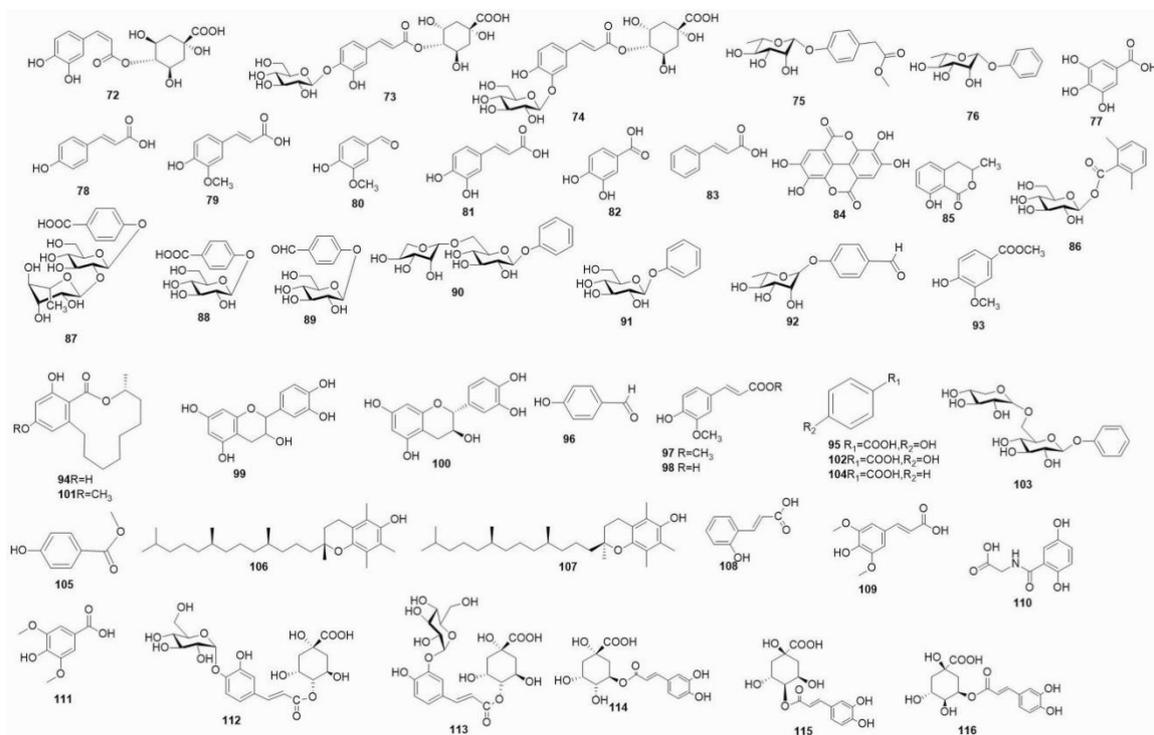
Fonte: Liu et al. (2022) (Adaptado)

Os carbamatos são metabólitos secundários que possuem atividade biológicas como antioxidante e antibacteriana, sendo identificados cerca de 35 compostos dessa classe nos tecidos de moringa, em grande maioria nas folhas (LIU et al., 2022; ANWER et al., 2007).

Os fenóis, incluindo ésteres e glicosídeos, são caracterizados por possuírem um anel aromático substituído por hidroxila fenólica. Esse tipo de composto atua com sequestradores de radicais livres ou agente quelante, e estão de forma predominante na composição das folhas de *M. oleifera* (LIU et al., 2022). São mais de 40 compostos isolados e identificados e suas estruturas químicas podem ser observadas na Figura 3.

Sendo assim, moringa demonstra ser uma fonte abundante de compostos bioativos que possuem um grande benefício a saúde humana e desta forma, é um alvo de estudos farmacológicos.

Figura 3: Estrutura química de alguns fenóis identificados em *Moringa oleífera*.



Legenda: (72) Cryptochlorogenic acid; (73) 4-O-(4'-O- α -D-glucopyranosyl)-caffeoyl quinic acid; (74) 4-O-(3'-O- α -D-glucopyranosyl)-caffeoyl quinic acid; (75) Methyl 2-[4-(α -L-rhamnopyranosyl)phenyl]acetate; (76) 1-O-phenyl- α -L-rhamnopyranoside (77) Gallic acid; (78) p-Coumaric acid; (79) Ferulic acid; (80) Vanillin; (81) Caffeic acid; (82) Protocatechuic acid, (83) Cinnamic acid; (84) Ellagic acid (85) 4-Hydroxymellein; (86) Moringyne; (87) Benzoic acid 4-O- α -rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucoside; (88) Benzoic acid-4-O- β -glucoside; (89) Benzaldehyde-4-O- β -glucoside; (90) Benzyl β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside; (91) Benzyl- β -D-glucopyranoside; (92) 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) Benzaldehyde; (93) Methyl vanillate; (94) De-O-methyl lasiodiplodin; (95) Methylparaben; (96)p-Hydroxybenzaldehyde; (97) Methyl ferulate; (98) Trans-ferulic acid; (99) Epicatechin; (100) Catechin; (101) Lasiodiplodin; (102) p-Hydroxybenzoic acid; (103) Benzyl β -D-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside; (104) Benzoic acid; (105) Methyl-p-hydroxybenzoate; (106) α -Tocopherol; (107) γ -Tocopherol; (108) 2-Hydroxycoumaric acid; (109) Sinapic acid; (110) Gentistic acid; (111) Syringic acid; (112) 4-O-(4'-O- α -D-glucopyranosyl)-caffeoyl quinic acid; (113) 4-O-(3'-O- α -D-glucopyranosyl)-caffeoyl quinic acid; (114) Chlorogenic acid; (115) 4-O-caffeoyl quinic acid; (116) 5-O-caffeoyl quinic acid.

Fonte: Liu et al. (2022)

1.1.2. Atividade Antimicrobiana

Moringa oleifera é usada na medicina tradicional há séculos, a população utiliza diversas partes da árvore para tratar doenças como infecção de pele, anemia, asma, tosse, diarreia, inchaço, dores de cabeça, histeria, cólera, distúrbios respiratórios, escorbuto, diabetes e dor de garganta (PADAYACHEE; BAIJNATH, 2020). A partir do conhecimento popular, a ciência buscou entender as atividades biológicas de *M. oleifera* e descrever seus mecanismos de ação.

Desde 1981 os efeitos antibacterianos e antifúngicos foram relatados para *M. oleifera*, na época foi isolado das sementes o composto 4-(α -L-rhamnosyloxy)benzylisothiocyanate, o qual foi responsável pela atividade antimicrobiana frente *Mycobacterium phlei* e *Bacillus subtilis*, com concentração bactericida mínima de 40 e 56 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (EILERT; WOLTERS; NAHRSTEDT, 1981). A partir desse momento, outras pesquisas foram desenvolvidas para compreender a extensão das atividades antimicrobianas com os extratos de moringa.

Chuang e colaboradores (2007) observaram atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas frente *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*, resultados também encontrados por Oluduro e colaboradores (2012). O extrato aquoso de folhas apresentou atividade frente *Penicillium spp* e *Mucor spp*, em concentrações de 15 mg/mL. Ademais, o extrato etanólico inibiu das folhas os fungos *Candida albicans* e *Penicillium spp*. Tanto para o extrato aquoso, como para o etanólico das folhas, foi revelada a presença de alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenoides, esteroides, taninos, cardioglicosídeos e aminoácidos que podem atuar como moléculas antimicrobianas (RAJ et al., 2011). As proteínas das sementes de *M. oleifera* inibiram as cepas de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum musae* com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,05 mg/mL (GIFONI et al., 2012), *Trichophyton mentagrophytes* com CIM de 45 μM (LOPES et al., 2020), além de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, com CIM de 9,45 a 37,9 μM , respectivamente (SILVA NETO et al., 2020). A lectina de sementes solúvel em água de *M. oleifera*, WSMoL, foi eficaz na inibição das cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (SANTOS et al., 2020).

O extrato das raízes de *Moringa oleifera* mostrou atividade frente *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (RAJ et al., 2011). O fruto de moringa também possui atividade antimicrobiana, de acordo com Arora e Onsare (2014), o extrato acetônico do fruto teve atividade contra MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina).

WSMoL também apresentou atividade antibacteriana frente *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* sp e *Micrococcus luteus*. De acordo com Coriolano et al. (2020), a lectina foi capaz de promover aglutinação e causar extravasamento de proteínas bacterianas, além disto, para as bactérias gram-negativas foi possível observar uma diminuição da atividade de proteases extracelulares.

O extrato das folhas de *M. oleifera*, que utilizou acetona como solvente, demonstrou atividade antibacteriana significativa frente *Klebsiella pneumoniae*, com CIM mínima de 0,78 mg/mL (NDHLALA et al., 2014). Abalaka e colaboradores (2012) mostraram atividade de extrato aquoso e clorofórmico das folhas de *M. oleifera* frente *E. coli*, *S. typhi* e *P. aeruginosa*, com CIM variando de 10 a 20 mg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 20 a 40 mg/mL. Corroborando com os autores, outras pesquisas demonstraram atividade frente *P. aeruginosa* e para *K. pneumoniae*, contudo utilizando extrato metanólico da folha de moringa (NUHGRAHA et al., 2020; ILANKO et al., 2019). Também foi encontrada atividade antibacteriana para as cepas gram-positivas, *S. aureus* e *E. faecalis* (MANDAL et al., 2014, PEIXOTO et al., 2011). De acordo com Adji e colaboradores (2022), os extratos oriundos de folhas de moringa apresentaram mais atividade antibacteriana frente bactérias gram-negativas que para gram-positivas. Através de uma pesquisa na literatura foi visto as cepas que tiveram inibição do crescimento quando utilizado extrato de folhas de moringa na atividade (Figura 4).

A atividade antimicrobiana da moringa (*Moringa oleifera*) está associada à presença de compostos bioativos, especialmente os flavonoides. Esses metabólitos secundários, encontrados em alta concentração na planta, atuam de diferentes formas contra microrganismos (XIAO et al., 2020). Um dos principais mecanismos é a inibição da síntese de ácidos nucleicos, afetando diretamente o DNA e o RNA bacterianos (XIAO et al., 2020). Além disso, os flavonoides prejudicam a integridade da membrana celular bacteriana e de estruturas internas, como microsomos e lisossomos, ao inibir enzimas essenciais, como ATPases e fosfolipases. Essas alterações levam à formação de complexos com proteínas extracelulares e promovem a liberação de conteúdos intracelulares das bactérias (XIAO et al., 2020). Outro efeito importante é a interferência no metabolismo energético dos microrganismos, reduzindo sua capacidade de utilizar oxigênio para a produção de energia (DONGMO et al., 2015).

Figura 4: Atividade antibacteriana de extratos da folha de *Moringa oleifera*

Gram-positivas		Gram-negativas	
<i>S. aureus</i>	Mandal et al. (2014)	<i>E. coli</i>	Enerijiofi et al. (2021)
<i>B. cereus</i>	Xiao et al. (2020)	<i>V. parahaemolyticus</i>	Peixoto et al. (2011)
<i>C. perfringens</i>	Naeem et al. (2022)	<i>A. caviae</i>	Peixoto et al. (2011)
<i>E. faecalis</i>	Peixoto et al. (2011)	<i>S. typhi</i>	Abalaka et al. (2012)
<i>S. pneumoniae</i>	Abdallah; Machina; Ibrahim (2022)	<i>S. enteritidis</i>	Boumaza-Hamladji et al. (2023)
<i>S. epidermis</i>	Dayal et al. (2013)	<i>V. cholerae</i>	Xiao et al. (2020)
<i>S. mutans</i>	Elgamily et al. (2016)	<i>V. vulnificus</i>	Brilhante et al. (2015)
		<i>S. flexneri</i>	Isitua; Ibeh; Olayinka (2016)
		<i>S. sonnei</i>	Isitua; Ibeh; Olayinka (2016)
		<i>S. dysenteriae</i>	Isitua; Ibeh; Olayinka (2016)
		<i>Shigella boydii</i>	Isitua; Ibeh; Olayinka (2016)
		<i>K. pneumoniae</i>	Nughrana et al. (2020)
		<i>P. aeruginosa</i>	Ilanko et al. (2019)
		<i>P. vulgaris</i>	Ilanko et al. (2019)
		<i>A. baylyi</i>	Ilanko et al. (2019)
		<i>A. baumannii</i>	Shriwastav et al. (2023)
		<i>P. rettgeri</i>	Shriwastav et al. (2023)
		<i>S. maltophilia</i>	Shriwastav et al. (2023)



Fonte: A autora (2025)

Outros metabólitos secundários que possuem importante função na atividade antimicrobiana são os compostos fenólicos. Esses compostos conseguem formar pontes de hidrogênio com proteínas, que resulta em danos na estrutura da proteína e lesiona a parede celular e membrana citoplasmática (XIAO et al., 2020).

Os taninos são compostos que possuem atividade antibacteriana a partir da inibição da enzima transcriptase reversa e topoisomerase do DNA (XIAO et al., 2020; ADJI et al., 2022). Outros compostos capazes de inibir a enzima topoisomerase do DNA são os alcaloides, também presentes na composição fitoquímica da moringa (XIAO et al., 2020; ADJI et al., 2022). As saponinas são metabólitos secundários que tem uma ação detergente que pode diminuir a tensão superficial da parede celular bacteriana, e assim causar lise celular (ADJI et al., 2022). Os esteroides também têm atividade antibacteriana, a qual está relacionada com os lipídeos da membrana, através de uma interação com membranas fosfolipídicas, com propriedades

permeáveis a compostos lipofílicos. Dessa forma, os esteroides possibilitam a diminuição da integridade e morfologia da membrana (ADJI et al., 2022).

1.1.3. Toxicidade

De acordo com Liu et al. (2022), poucos estudos referentes segurança do uso de moringa foram realizados. Em 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a produção, comercialização, distribuição e importação de produtos contendo *M. oleifera* (BRASIL, 2019), esse posicionamento foi em decorrência à falta de relatórios de estudos de toxicidade de preparações de *M. oleifera* cultivadas no Brasil. Ademais, outros órgãos reguladores, como o Food and Drug Administration (FDA), não apresentaram dados sobre o uso de *Moringa oleifera* na alimentação ou como suplemento alimentar (BARROS et al., 2022).

Awodele e colaboradores (2012) realizaram um estudo experimental conduzido para avaliar a toxicidade do extrato aquoso de folhas de *M. oleifera*, camundongos albinos machos da linhagem Wistar foram submetidos a testes de toxicidade aguda e subcrônica. No teste de toxicidade aguda, o extrato foi administrado por via oral em doses de até 6400 mg/kg e por via intraperitoneal em doses de até 2000 mg/kg. Para a avaliação subcrônica, os animais receberam doses orais diárias de 250, 500 e 1500 mg/kg durante 60 dias consecutivos, enquanto o grupo controle recebeu apenas água destilada. Durante o experimento, foram analisados parâmetros de qualidade espermática, indicadores hematológicos, biomarcadores bioquímicos de função hepática e renal (enzimas hepáticas, ureia e creatinina), além de exame histopatológico dos tecidos.

Os resultados indicaram uma dose letal média (LD50) estimada em 1500 mg/kg, sugerindo baixa toxicidade do extrato. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$) nos parâmetros analisados entre os animais tratados e o grupo controle. Esses achados apontam que o extrato não induziu alterações hematológicas, bioquímicas ou reprodutivas nas condições testadas. Além disso, não houve diferença significativa no ganho de peso entre os grupos, embora tenha sido verificada uma redução dose-dependente no consumo alimentar nos animais que receberam doses entre 250 e 1500 mg/kg (Awodele et al., 2012). Essa alteração, no entanto, não comprometeu o desenvolvimento ponderal dos animais. A

análise histopatológica também não revelou danos estruturais relevantes nos tecidos avaliados. Diante desses resultados, os autores concluíram que o extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* apresenta um perfil de segurança adequado para administração oral nas doses e período estudados (Awodele et al., 2012).

O extrato da semente de *M.oleifera* foi avaliado em relação a sua genotoxicidade em estudo utilizando o DNA de plasmídeo, bem como os ensaios de *Salmonella typhirium* com TA97, TA98, TA100 E TA102 com presença e ausência de metabolização hepática. O extrato não foi genotóxico em concentração de 0,2 µg/µL, contudo doses maiores que 0,6 µg/µL foram genotóxicas após metabolizações hepáticas (ROLIM et al., 2011).

Na avaliação de toxicidade aguda de 14 dias, Asare et al. (2012) utilizaram uma supra-suplementação do extrato aquoso de moringa para avaliar a segurança no uso como suplemento nutricional. *M. oleifera* foi genotóxica em níveis supra-suplementação de 3000 mg/kg, entretanto, foi segura em ingestão igual ou menor a 1000 mg/kg.

Saleem et al. (2020) avaliaram a toxicidade subcrônica (90 dias) do extrato metanólico da folha de moringa em camundongos. O estudo apresentou que para as dosagens testadas (150, 300 e 600 mg/kg), ocorreu diminuição do peso corporal, colesterol e lipoproteínas de baixa densidade, por outro lado, a contagem de plaquetas aumentou. Os órgãos tiveram avaliação histológica normal. Segundo Saleem et al. (2020), o extrato da planta pode ser seguro até 2000 mg/kg em dose única e o uso a longo prazo (90 dias) não apresentou significativas toxicidades sistêmicas.

Em uma avaliação de doses repetidas por 28 dias, com a infusão das folhas de moringa, não ocorreram alterações no peso, consumo de água e ração, e nenhuma alteração bioquímica, histológica e histológica. Entretanto, alterações de comportamento foram observadas nas 2 primeiras horas após a administração da dose de 5000 mg/kg (BARROS et al., 2022). No mesmo estudo, as doses de 500 e 1000 mg/kg, do pó das folhas de moringa, promoveram danos hepáticos e renais.

É visível a necessidade de mais estudos acerca da atividade toxicológica de *M. oleifera*, bem como a segurança do uso a longo prazo. Os estudos, até o momento, apresentam uma defasagem em informações do uso de moringa de forma crônica, mesmo sendo uma espécie tão utilizada na população.

1.2. Planejamento Fatorial para otimização do extrato

Com o volume crescente de dados gerados pela pesquisa científica, surge a necessidade de métodos eficientes para sua análise e interpretação. Nesse contexto, as ferramentas estatísticas não apenas facilitam a organização e a exploração dos dados, mas também são fundamentais para identificar padrões, testar hipóteses e garantir a robustez dos resultados. A capacidade de aplicar essas ferramentas de forma adequada é essencial para que a ciência continue avançando e gerando conhecimentos que realmente contribuam para o progresso da sociedade.

As ferramentas estatísticas têm se consolidado como recursos essenciais para a otimização de processos industriais, especialmente quando associadas ao Design of Experiments (DOE). O DOE consiste em um conjunto de testes planejados com base em critérios científicos e estatísticos, permitindo a análise sistemática da influência de diversas variáveis nos resultados de um processo ou sistema. Essa abordagem não apenas contribui para a melhoria contínua e o controle estatístico dos processos, mas também potencializa a eficiência e a inovação no desenvolvimento tecnológico e industrial (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

O planejamento experimental é um método importante quando o objetivo é estudar o efeito conjunto de diferentes fatores em relação a uma variável de resposta de interesse. As técnicas de planejamento experimental desempenham um papel crucial na melhoria das características de qualidade de produtos e processos, ao mesmo tempo em que buscam otimizar o uso de recursos e reduzir o número de testes necessários. Diante da crescente demanda por otimização, os profissionais têm se voltado para essas metodologias como forma de minimizar custos e tempos, ao mesmo tempo que maximizam o rendimento, a produtividade e a qualidade dos produtos. Esse movimento reflete a necessidade de desenvolver processos cada vez mais eficientes, atendendo tanto à necessidade de redução de custos quanto à exigência de maior desempenho e precisão nos resultados (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Dentre as várias abordagens disponíveis para o planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial se destacam por sua capacidade de avaliar simultaneamente o impacto de diversas variáveis, utilizando um número reduzido de

experimentos. Essa característica os torna especialmente eficazes quando comparados a métodos uni variados, que analisam uma variável por vez. O planejamento fatorial, ao permitir a análise conjunta de múltiplos fatores, proporciona uma visão mais abrangente e eficiente dos efeitos das variáveis no processo ou produto, o que contribui diretamente para a otimização e a melhoria contínua da qualidade (SILVA et al., 2021).

Para realizar o planejamento fatorial, é fundamental compreender dois conceitos principais: fator e nível. O fator refere-se a cada variável do sistema em estudo, enquanto o nível corresponde às diferentes condições de operação dos fatores de controle que são investigadas nos experimentos. De acordo com Neves et al. (2002), o planejamento fatorial pode ser representado por b^k , sendo k o número de fatores e “b” o número de níveis escolhidos. O caso mais simples pode ser considerado quando o fator k se apresenta em apenas dois níveis, sendo assim são realizadas 2^3 observações da variável resposta. Essa representação indica que, em um planejamento com 2 níveis para 3 fatores (2^3), serão necessários 8 experimentos distintos. (NEVES et al., 2002).

Os planejamentos fatoriais do tipo 2^k são amplamente utilizados por permitirem a identificação de tendências importantes, mesmo quando a exploração completa de grandes regiões no espaço das variáveis não é viável. Nesse tipo de planejamento, os níveis das variáveis são geralmente codificados com os sinais (+) e (-), atribuídos de forma arbitrária, sem interferir nos experimentos ou na interpretação dos resultados (CUNICO et al., 2008). Esses sinais facilitam a organização das variáveis em matrizes de planejamento e permitem calcular a influência de cada fator e de suas interações no sistema analisado.

Outro aspecto essencial do planejamento fatorial é a realização de réplicas ou repetições, que servem para estimar o erro experimental e verificar a reprodutibilidade do método utilizado. É importante diferenciar o número de experimentos do número de condições experimentais, pois as réplicas são adicionadas a essas condições para compor o total de experimentos. Além disso, a realização aleatória dos ensaios e replicatas é fundamental para evitar distorções estatísticas e garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados.

1.3. Aspectos regulatório para registro e pesquisa de plantas medicinais

O uso de plantas com fins terapêuticos pela população é reconhecido há décadas, tanto pela sociedade de baixa renda quanto a de maior poder aquisitivo (SENIGALIA et al., 2020). Para Campos (2016), as pessoas possuem uma idealização de que o tratamento de doenças com plantas é seguro e eficaz. As plantas medicinais são aquelas que podem ser administradas a um ser vivo, por qualquer via, para fins terapêuticos. Essas plantas possuem toxicidade relatadas como inferior à de medicamentos sintéticos, contudo, mesmo com variados benefícios contra doenças, podem apresentar graus de toxicidade (MARTINS et al., 2012).

A intoxicação por plantas pode ocorrer por diferentes meios, como contato dérmico agudo ou crônico, ingestão de partes cruas da espécie ou uso de chá e infusões, além do uso por meios de produtos industrializados com produtos naturais em sua composição (MELO, 2021).

Para as plantas medicinais existem algumas causas que são responsáveis por provocar uma intoxicação, como o período de uso, falta de informações sobre as condições de cultivo, identificação errônea da espécie e esquema posológico. Ainda, podem ocorrer interações indesejadas com fármacos sintéticos e também com substâncias de outras plantas utilizadas em xaropes caseiros, chás e medicações fitoterápicas (GONÇALVES et al., 2022). Em decorrência do uso indiscriminado e os possíveis efeitos indesejados, é necessário estar atento ao uso na população, bem como o estudo das substâncias presentes nas plantas e sua toxicologia.

Em 1998, foi criado o Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas no Brasil, com o intuito de analisar e protocolar ocorrência por intoxicações por plantas. O Sistema Nacional de Informações Toxicológico-Farmacológica (SINTOX) registrou mais de 900 casos de intoxicação humana por uso de plantas medicinais em 2016 (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016). Em 2017, o Brasil foi listado em oitavo lugar em envenenamento por plantas. Desde 2018 que o SINTOX não registrou casos de intoxicação, envenenamento e óbitos por plantas, esse cenário persiste até o momento atual março de 2025 (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2025).

Em 1967, o Brasil iniciou uma política de aprofundamento nos aspectos regulatórios para registro e desenvolvimento de medicamentos à base de plantas

medicinais. A portaria de n.º 22/1967, estabeleceu o Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (SNFMF), neste momento foi dado o passo inicial para o uso de fitoterápicos em preparações terapêuticas (BRASIL, 1967), para isto seria necessária a realização de ensaios farmacológicos clínicos e não-clínicos. Quase 10 anos depois, em 1976, a Lei de n.º 6.360 relata sobre os produtos à base de plantas medicinais submetidas ao controle da Vigilância Sanitária (BRASIL, 1976). Em 1995, a portaria n.º 6 instituiu prazos para que os fabricantes demonstrassem dados de eficácia e segurança dos fitoterápicos (BRASIL, 1995).

As normas e regulamentações de fitoterápicos ficaram mais uma vez em um hiato de quase 10 anos, e apenas em 2004 com a RDC n.º 48 ocorreu a disposição sobre os registros de fitoterápicos. Essa resolução incube que o registro do fitoterápico ocorra com a apresentação de estudos que possam comprovar a segurança de uso (ANVISA, 2004). A partir de então, existe o primeiro guia para realizar ensaios de toxicidade com a Resolução ANVISA n.º 90/2004, que contempla testes de toxicidade aguda, de doses repetidas e de genotoxicidade, esta última para quando existir o uso contínuo ou prolongado do fitoterápico (BRASIL, 2004). Entretanto, o guia não detalha os métodos necessários para esses ensaios.

Em 2005 e 2006, foram publicadas as RDCs n.º 267 e 219, respectivamente, determinando que o cadastro das plantas utilizadas para preparos de chás fosse realizado junto à Gerência de Alimentos da ANVISA (ANVISA, 2005, 2006).

Com o crescente interesse da indústria, população e a comunidade científica com o uso de plantas medicinais, em 2006 o governo iniciou publicações de portarias para integrar a prática dessas plantas no sistema de saúde. Desta forma, a portaria n.º 971/2006 aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006) e aprova o decreto n.º 5.813/06, que dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNMF) (BRASIL, 2006). As duas resoluções de 2006 incentivam a pesquisa e desenvolvimento do uso de plantas medicinais, além de encorajar a adesão na saúde pública.

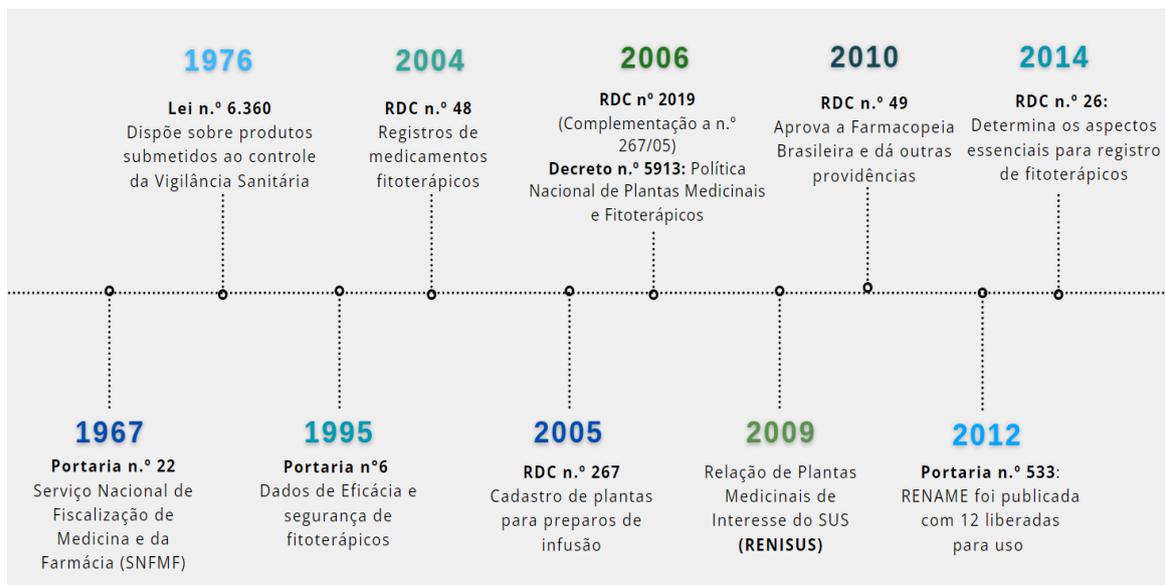
Em 2010, a RDC n.º 40 aprova a Farmacopeia Brasileira. Somado a este feito, no mesmo ano a ANVISA divulgou o “Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de

Medicamentos”; essa primeira versão fez com que as regulamentações brasileiras entrassem em concordância com documentos internacionais, como as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (ANVISA, 2010).

Em 2014 foi estabelecida a RDC n.º 26, a qual está em vigor para o registro de fitoterápicos, onde define os panoramas fundamentais para o registro, como a identificação botânica da espécie, padrão de qualidade e identidade, dados de segurança e eficácia que possam legitimar o uso terapêutica proposto (BRASIL, 2014).

A portaria n.º 533 foi publicada em 2012, estabelecendo que 12 plantas medicinais fossem publicadas na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2012). Quase 60 anos após o início das políticas e normatizações voltadas as plantas medicinais no país (Figura 5), é necessário entender sobre mais plantas utilizadas na população com fins terapêuticos e sua segurança, tendo em vista que desde 2012 continuam as mesmas 12 espécies incluídas na RENAME.

Figura 5: Linha do tempo dos aspectos regulatório para registro e pesquisa de plantas medicinais.



Fonte: A autora (2025)

1.4. Plantas medicinais e seu potencial antibacteriano

As doenças infecciosas de origem bacteriana representam uma ameaça persistente à saúde pública global, impactando de maneira significativa a morbimortalidade em diversas populações. Embora muitas bactérias exerçam funções benéficas, como a manutenção da homeostase intestinal e a proteção contra patógenos, outras são agentes etiológicos de uma ampla variedade de doenças. Entre as principais manifestações clínicas associadas às infecções bacterianas destacam-se as infecções do trato respiratório, gastrointestinal, geniturinário, além das doenças sexualmente transmissíveis e infecções sistêmicas de elevada gravidade. A crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos, registrada em âmbito mundial, agrava ainda mais este cenário e reforça a necessidade de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento (WHO, 2024).

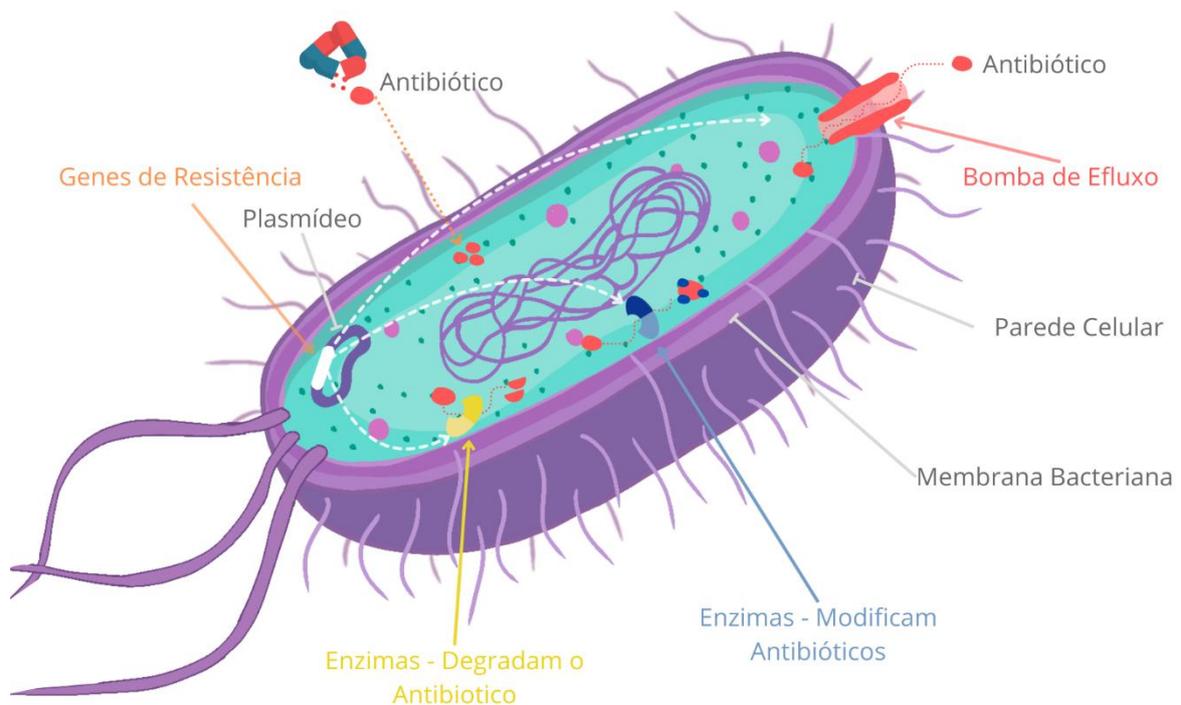
No início do século XX, a medicina vivenciou uma das maiores revoluções na história da saúde pública com a descoberta dos antibióticos, que se consolidaram como um sucesso terapêutico (BUTLER; BUSS, 2006). Em 1928, Alexander Fleming observou, de maneira pioneira, que o fungo *Penicillium notatum* era capaz de produzir uma substância, posteriormente nomeada penicilina, com potente atividade bactericida. A introdução dos antibióticos na prática clínica, especialmente a partir da década de 1940, transformou o tratamento de infecções bacterianas, reduzindo de forma significativa a mortalidade associada a essas doenças e possibilitando avanços médicos como cirurgias mais seguras, transplantes de órgãos e terapias imunossupressoras (BUTLER; BUSS, 2006).

A eficácia dos antibióticos baseia-se em sua capacidade de interferir em processos biológicos essenciais dos microrganismos, atuando, principalmente, por meio de cinco mecanismos: inibição da síntese da parede celular, desorganização da função da membrana celular, inibição da síntese proteica, atuação como antimetabólitos e inibição da síntese de ácidos nucleicos (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018). Contudo, o uso extensivo e, muitas vezes, inadequado desses agentes terapêuticos ao longo das décadas levou ao surgimento de um problema alarmante: a resistência bacteriana. Esse fenômeno, em que as bactérias desenvolvem mecanismos de defesa contra os antibióticos, compromete significativamente a eficácia do tratamento de infecções, tornando a luta contra

doenças infecciosas mais desafiadora e exigindo novos esforços em pesquisa e desenvolvimento de alternativas terapêuticas (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018).

A resistência antibacteriana é um fenômeno natural e evolutivo, impulsionado pela pressão seletiva gerada pelo uso excessivo e inadequado de antibióticos no ambiente. As bactérias podem apresentar resistência por meio de diversos mecanismos, sendo um dos principais a presença de genes de resistência localizados em plasmídeos. Esses genes podem codificar proteínas responsáveis por mecanismos de defesa, como as bombas de efluxo, que removem os antibióticos das células bacterianas antes que possam exercer seu efeito. Além disso, as enzimas bacterianas podem desempenhar um papel crucial na resistência, uma vez que podem degradar os antibióticos ou modificar os sítios de ligação dos fármacos, inativando-os. Esses mecanismos tornam as bactérias mais difíceis de erradicar, representando um grande desafio no tratamento de infecções bacterianas (DOWLING; O'DWYER; ADLEY, 2017).

Figura 6: Principais mecanismos de resistência a antibiótico.



Fonte: A autora (2025)

As plantas medicinais possuem um grande potencial terapêutico no combate a infecções bacterianas, oferecendo vantagens em relação aos fármacos sintéticos, como menores efeitos adversos e uma menor probabilidade de induzir resistência. Os agentes antimicrobianos presentes nas plantas medicinais, compostos por uma variedade de fitoquímicos, atuam de forma ampla e podem interagir com múltiplos alvos dentro das células bacterianas, o que contribui para sua eficácia terapêutica e resistência a resistência bacteriana observada com os antibióticos sintéticos (KUMAR; PANDEY, 2013).

Acredita-se que os compostos secundários identificados constituam uma proporção inferior a 10% do total presente nas plantas. Geralmente, esses metabólitos atuam como mecanismos de proteção contra microrganismos, insetos e herbívoros. A diversidade considerável deriva da habilidade das plantas em sintetizar uma ampla gama de compostos aromáticos, incluindo seus derivados oxigenados (GHORBANI; ESMAELIZADEH, 2017).

As plantas produzem compostos orgânicos durante os processos metabólitos naturais, esses compostos são separados em dois grupos nomeados de metabólitos primários e secundários (WINK, 2010). Os metabólitos primários são essenciais para a manutenção vital da planta e desempenham função na respiração, fotossíntese e transporte (WINK, 2010). Por outro lado, os metabólitos secundários são produtos que auxiliam na adaptação ao estresse do meio contra radiação ultravioleta, doenças e parasitas (SIMÕES et al., 2010). Sendo assim, o estresse influencia a síntese de metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários podem ser promissores como antibacterianos, pois são utilizados naturalmente como forma de defesa contra bactérias. O extrato das folhas de *Syzygium cumini* revelou a presença de flavonoides, alcaloides, glicosídeos, esteroides, fenóis, saponinas, terpenóides e taninos, e ele foi capaz de inibir o crescimento de isolados químicos de *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (TAMBE; PEDHEKAR; HARSHALI, 2021). Extratos de *Aloe vera* e *Morinda citrifoli* tiveram atividade frente *P. aeruginosa*, esse potencial foi atribuído aos compostos secundários, principalmente compostos fenólicos e flavonoides (ROYANI et al., 2023).

Portanto, com o crescente e complexo cenário de resistência a antibióticos, é importante aprofundar os estudos no potencial da atividade dos metabólitos secundários extraído de plantas, bem como a segurança do uso.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Otimizar e caracterizar um extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* e determinar sua toxicidade e efeito sobre bactérias, fungos e vírus.

2.2. Específico

- Preparar e otimizar (método extrativo, concentração p/v) extrato de folhas de *Moringa oleifera*;
- Caracterizar extratos de folhas de *M. oleifera* por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Quantificar os marcadores químicos dos extratos de folhas de *M. oleifera* por espectrofotometria UV-Vis e CLAE;
- Elucidar a toxicidade oral subcrônica, por 13 semanas, do extrato otimizado de *M. oleifera* (OEMo) pela determinação dos parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histológico;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória para bactérias e fungos;
- Avaliar o potencial bactericida;
- Identificar a atividade de inibição de biofilme bacteriano;
- Determinar atividade sinérgica com antibiótico comercial;
- Avaliar a viabilidade celular bacteriana por citometria de fluxo;
- Verificar a toxicidade do extrato em larvas de *Tenebrio molitor*;
- Analisar a sobrevivência *in vivo* de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por *Escherichia coli* e *Serratia Marcescens*;
- Examinar a citotoxicidade do OEMo em células Vero CCL-81;
- Explorar o efeito do OEMo em células Vero CCL-81 infectadas com vírus de Chikungunya.

3. ARTIGOS

3.1. Artigo 1: 13-WEEK REPEATED-DOSE TOXICITY STUDY OF OPTIMIZED AQUEOUS EXTRACT OF *Moringa oleifera* LEAVES IN MICE

Artigo publicado no periódico “Journal of Ethnopharmacology”

Fator de impacto: 4.8

Qualis A2





Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



13-Week repeated-dose toxicity study of optimized aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves in mice

Nathália Regina Galvão Silva^a, Wêndeo Kennedy Costa^a, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Luiz Alberto Lira Soares^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Alisson Macário de Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Drumstick tree
Rutin
Factorial design
Toxicological evaluation
Traditional medicine

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Moringa oleifera* (Moringaceae family), commonly known as horseradish or tree of life, is traditionally used for various diseases, such as diabetes, hypercholesterolemia, neurological disorders, among others.

Aim of the study: To evaluate the toxicological profile of the oral use of an aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves for 13 weeks in mice.

Materials and methods: Initially, a factorial design (2³) was carried out to optimize aqueous extraction using as variables; the extraction method and proportion of drug. The 13-week repeated-dose toxicity trial used female and male mice, with oral administration of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves at doses of 250, 500, and 1000 mg/kg. The animals were evaluated for body weight, water and feed intake, biochemical and hematological parameters, urinalysis, ophthalmology and histopathology of the liver, spleen and kidneys.

Results: The extraction efficiency was evidenced by the extraction by maceration at 5%, obtaining the optimized extract of *Moringa oleifera* (OEMo). The oral administration of OEMo did not promote significant difference ($p > 0.05$) in the weight gain, food and water consumption of the control animals and those treated with 250 and 500 mg/kg. However, treatment with 1000 mg/kg promoted a reduction ($p < 0.05$) in food intake and body weight from the 7th week onwards in male and female mice. No alterations were detected in the hematological and histological parameters in the concentrations tested for both sexes. The highest concentration treatment (1000 mg/kg) promoted an increase in transaminases in males and females. All concentrations promoted a significant decrease ($p < 0.05$) in the serum lipid profile of mice.

Conclusion: This study developed an optimized extract of *Moringa oleifera* leaves, which should be used with caution in preparations above 500 mg/kg for the long term because it leads to significant changes in liver enzymes. On the other hand, the extract proved to be a promising plant preparation for hyperlipidemia in mice.

1. Introduction

Moringa oleifera Lamarck is a plant that belongs to the Moringaceae family native to East Africa and South India, however cultivation occurs in tropical and subtropical regions throughout the world (Dzuvor et al., 2021). *Moringa* leaves is popularly used in food, considering that its entire plant anatomy is edible and has benefits, this species has a relevant source of proteins, vitamins and minerals (Oyeyinka and Oyeyinka, 2018).

In addition to the nutritional property, this species is well known for

its medicinal and industrial characteristics (Mehwish et al., 2022). *Moringa* is popularly used against conjunctivitis, treatment of anemia, the use of leaf juice helps to control blood pressure and blood sugar levels (Kashyap et al., 2022). *M. oleifera* leaves have biological activities, such as: antibacterial (Budaraga et al., 2020), antioxidant (Vats and Gupta, 2017), antileishmanial activity (Hammi et al., 2020), effects against bronchoconstriction, airway inflammation and asthma (Suresh and Sisodia, 2018). The aqueous extract of the leaf was used for a neural study with the action of nicotine *in vivo*, the authors revealed that it was able to prevent chromatolysis, distortion of cerebellar cortical cells and neurobehavioral deficit (Omotoso et al., 2018).

* Corresponding author.

E-mail address: alisson.macario@ufpe.br (A.M. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118637>

Received 3 May 2024; Received in revised form 24 July 2024; Accepted 26 July 2024

Available online 6 August 2024

0378-8741/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

List of abbreviations

IPA	Dárdano de Andrade Lima Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco
EE	Extractive efficiency
RC	Rutin content
DR	Dry residue
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
CONCEA	National Council for the Control of Animal Experimentation
LIKA	Laboratory of Immunology Keizo Asami
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
NaCl	Sodium chloride
MCV	Mean corpuscular volume
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
AL:	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
GGT	Gamma glutamyl transferase
BUN	Blood urea nitrogen
Cv	Centrilobular vein
Gr	Renal glomeruli
Nd	lymph nodes

Barros et al. (2022), described that the ingestion of *M. oleifera* leaf powder at concentrations of 500 and 1000 mg/kg for 28 days, promoted liver and kidney damage observed through biochemical and histopathological parameters, suggesting the need for chronic studies. In view of the various studies on the chemical composition of *M. oleifera* leaves, it is important to deepen research on the standardization of extractive solutions that aim to ensure principles of reproducibility of extraction, which can affect the efficiency and safety of use. Thus, evaluating the influence of plant concentration, physical-chemical properties and extraction method of plant extractive solutions should be the first step during the technological development of phytopharmaceuticals (Ali et al., 2018). Authors report the presence of polyphenols as a constituent responsible for biological activities, thus being considered chemical markers of the species (Coz-Bolaños et al., 2018).

Thus, based on the type of extraction, solvent and environmental factors, the chemical composition of *M. oleifera* can be affected, generating distinct toxicological and pharmacological responses (Pop et al., 2022). Based on this, due to the lack of reports of toxicity studies of *Moringa oleifera* preparations cultivated in Brazil, the National Health Surveillance Agency (Anvisa) prohibited the production, commercialization, distribution and import of products containing parts of *M. oleifera* (Brazil, 2019).

Considering the popular use of this plant in the treatment of several diseases and the scarcity of toxicity studies, especially in Brazil, in the present study, the toxicity of the aqueous extract of *M. oleifera* leaves administered orally in mice of both sexes for 13 weeks were evaluated. For this, first parameters of plant proportion, dry residue and rutin content of aqueous extractive solutions were determined to obtain the optimized extract.

2. Materials and methods

2.1. Herbal material

Leaves of *Moringa oleifera* were collected in Recife, Pernambuco, Brazil (8°02'58.3" S 34°56'48.2" W), and identified by deposition of the specimen in the Dárdano de Andrade Lima Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) with the specimen number (n° 73,345).

Subsequently, the plant material was dried in a circulating air oven (48 h, 45 °C; Lucadema®), followed by grinding in a knife mill (Tecnal®).

2.2. Preparation of extractive solutions

The preparation conditions of the extractive solutions were studied through factorial design, in order to determine which are the best parameters of the extractive process that allowed obtaining a product with better chemical and technological characteristics. Different aqueous extractive solutions were obtained, under the following conditions: drug proportions (5, 10 and 15%; w/v) and methods (infusion: water 100 °C; turbolysis: 4 cycles of 30 s with 4 min intervals; and maceration: 36 h), following a 3² factorial design.

The responses evaluated were: marker content by high performance liquid chromatography (rutin) and dry residue to obtain extraction efficiency, according to methodologies proposed by Galvão et al. (2018).

2.3. Dry residue

The dry residue was evaluated on an infrared balance under 130 °C until constant weight.

2.4. Rutin content (RC)

The rutin content was calculated by HPLC, according to the methodology described below (2.6.2).

2.5. Extraction efficiency

To determine the maximum extraction efficiency of rutin (RC), it was calculated according to the formula:

$$EE = \frac{RC}{DR}$$

where: EE = extractive efficiency; RC = Rutin content; DR = dry residue.

2.6. Obtaining and characterizing the spray-dried extract

The procedure was performed in a mini spray dryer (MSD 1.0, Labmaq) under the following operational conditions: inlet air temperature: 130 °C, feed flow rate: 0.8 L/h and air flow rate: 40 L/min. The extract was kept under agitation throughout the operation (Machado et al., 2021).

2.6.1. High performance thin layer chromatography (HPTLC)

Samples (*M. oleifera* extracts) and standards were subjected to high-performance thin layer chromatography with the aid of a semiautomatic application system (Camag®) and controlled by a computer program. After elution in appropriate chambers, the plates were observed under ultraviolet light (254 and 366 nm) before and after derivatization with appropriate reagents (Wagner and Bladt, 2001). After scanning, identification was performed by comparing the color and R_fs of the bands observed in the sample profiles with the result observed for standards.

2.6.2. High performance liquid chromatography (HPLC)

The dried extracts were resuspended in water and filtered through PVDF membranes with a 0.45 µm pore opening, before injection into the HPLC equipment Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), coupled to a photodiode array detector (DAD; Thermo Fisher Scientific) and equipped with a binary pump (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degasser and autosampler equipped with a 20 µL loop (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). The analysis wavelengths were 270 and 350 nm. Chromatographic separations were obtained with a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm; Supelco®) equipped with a pre-column (4 mm × 3.9 µm C₁₈; Phenomenex®). The separations were performed

at a temperature of 25 ± 1 °C. The mobile phase consisted of ultrapure water (A) and methanol (B), both acidified with 0.05% trifluoroacetic acid, and flow adjusted to 0.7 mL/min. A gradient program was applied as follows: 0–10 min, 15–25% B; 10–15 min, 25% B; 15–20 min, 25–40% B; 20–25 min, 40–80% B; 30–32 min, 80% B; 32–34 min, 80–15% B; 34–36 min, 15% B. Data were analyzed, after injection in triplicate, and processed using Chromeleon software (Thermo Fisher Scientific, USA). The content of rutin was performed by peak areas of the respective substance and the results were expressed in %w/w rutin according to the equation for standard.

2.7. Animals and ethical aspects

This research project was developed in accordance with the current regulations expressed in Decree No. 6,899, of July 15, 2009, which provides for the composition of the National Council for the Control of Animal Experimentation – CONCEA. The animals were supplied by the Laboratory of Immunology Keizo Asami (LIKA – UFPE) and adapted in the premises of the Laboratory of Animal Experimentation of the Department of Biochemistry at UFPE. Swiss albino mice weighing around 30 g, kept for 50 days under controlled temperature conditions (22 ± 2 °C), with free access to food and drinking water on a 12 h light-dark cycle, were used. All procedures were submitted to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Pernambuco (process: 0014/2020).

2.8. Repeated dose toxicity assessment for 13-weeks

The subchronic toxicity study followed the [OECD 408 \(1998\)](#) protocol. Swiss mice were randomized (10 animals/sex/group) into control groups and treated with 250, 500 or 1000 mg/kg of the extract selected for the study (based on the previous study by [Barros et al., 2022](#)). For the treatment, the animals received a daily oral probe of 0.1 mL/10g containing the appropriate dose of extract. Mice in the control group received saline solution of 0.9% NaCl. Clinical observations (such as behavior, appearance, external genitalia, mental status, mortality rate, etc.) were monitored. At the end of the 13th week of the study, all mice were fasted for 8 h and sedated with xylazine and ketamine solution (1:10, v/v) to collect blood samples for coagulation, hematology and biochemistry analyses. ([Oliveira et al., 2019](#)). Then, the animals were euthanized by a high dose of anesthetic to collect internal organs for weight, macroscopic pathology and histopathology examinations.

2.8.1. Ophthalmological analysis

An eye examination was performed throughout the study with an indirect binocular ophthalmoscope instrument (Vantage Plus Digital, Keeler Ltd., England) and the conjunctiva, sclera, cornea, lens and iris of each eye were evaluated as previously described ([Cha et al., 2021](#)).

2.8.2. Hematological and biochemical analysis

Hematological analyzes were performed immediately after blood collection, using an automated hematology analyzer (Coulter STKS, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) and optical microscopy. Parameters included red blood cell and white blood cell count, hemoglobin (HB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), Erythrocyte distribution width (RDW) and differential leukocyte count (lymphocytes, segmented and monocytes).

For biochemical analyses, blood was centrifuged at $1480 \times g$ for 10 min to obtain serum and stored at -20 °C. The following parameters were determined: albumin, urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol, triglycerides, total protein, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase (GGT) and bilirubin. Measurements of these parameters were performed using specific kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brazil) and a COBAS Mira Plus analyzer (Roche Diagnostics

Systems, Basel, Switzerland).

2.8.3. Urine analysis

On the last day of the experiment, urine (for 6 h) was collected from mice in a metabolic cage to evaluate volume, pH, appearance, bilirubin levels, protein levels, ketone levels, specific gravity, presence of blood, glucose and urobilinogen using reactive strips for urine testing (Kasvi, Brazil) ([Oliveira et al., 2019](#)).

2.8.4. Evaluation of internal organs and histological analysis

Assessment of internal organ weights and macroscopic features (color, texture, morphology) were performed after the 13-week treatment phase. Histological analyzes of the liver, kidney, spleen, lung and heart of mice in the control and treatment groups were performed by optical microscopy. Organ sections were fixed in buffered formalin (10% v/v), dehydrated through a graded ethanol series (70–100%) cleared in xylol, and embedded in paraffin. Histological sections (5 μ m) were stained with hematoxylin-eosin and mounted with coverslips with Entellan resin (Merck, Germany) ([Kiernan, 2008](#)). Samples were observed using a Motic BA200 microscope coupled to a Moticam digital camera.

2.8.5. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD and submitted to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test, with a significance level of $p < 0.05$. Statistics were run in GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

3. Results and discussion

Moringa is widely used by the world population to treat diseases and as a nutritional source ([Ariani et al., 2023](#)); however, in Brazil, the Brazilian Health Surveillance Agency has prohibited the sale of products based on Moringa due to the lack of long-term use safety tests ([Brazil, 2019](#)). In order to control the quality of medicinal plants and natural products, it is necessary to identify and quantify phytochemical compounds, in order to understand possible toxicities and/or biotechnological and pharmaceutical actions ([Aware et al., 2022](#)). So far, there are still few studies on the toxicity of using *Moringa oleifera* and its extracts *in vivo* ([Liu et al., 2022](#)). Thus, this study aims to contribute with toxicity information for 13-weeks following international protocols.

3.1. Factorial design 2^3

Data from the factorial design matrix, as well as the results obtained for the study responses, are shown in [Table 1](#). The experiment data were used to obtain mathematical models for each of the analyzed responses. The mathematical models obtained showed good multiple correlation coefficients (r^2), the values of r^2 indicated that more than 99% of the variation that occurred in the experiment can be explained by the equations proposed for the respective models.

According to the responses obtained for the rutin content, it was possible to observe that the amount of drug and method had a negative influence on the rutin content, that is, with the maintenance of the two factors at the upper level, the lower rutin content was evidenced ([Fig. 1A](#)). As for the quadratic response, both had a positive influence on the marker content, demonstrated by the observed curvature. In a study with pomelo peels (*Citrus maxima*), a 2^3 factorial design was used to observe which extractive condition affected the pectin obtainment, the factors of greater interaction were related to pH and temperature, pH and extraction time and temperature, these results suggest that the mathematical model used can clarify the capacities of the factors studied with the value of r^2 equal to 97.15% ([Pagarra et al., 2019](#)).

In relation to the dry residue, the amount of drug has a positive influence on the response (86.93) and the method also, but smaller (11.42) ([Fig. 1E](#)). This fact is confirmed when we observe the response surface

Table 1

Matrix of the 2³ factorial design and results of dry residue, rutin content and extraction efficiency obtained for the extractive solutions of *Moringa oleifera*.

Encoded Variables		Natural Variables		DR (%)			Rut (g%)			EE (RUT/DR)		
Plant	Method	Plant (w)	Method	1	2	3	1	2	3	1	2	3
-1	-1	5	M	1,21	1,13	1,29	0,856	0,855	0,856	0,71	0,76	0,66
-1	0	5	I	1,61	1,34	1,37	0,580	0,581	0,580	0,36	0,43	0,42
-1	1	5	T	1,94	1,81	2,02	0,553	0,553	0,553	0,28	0,31	0,27
0	-1	10	M	2,52	2,50	2,42	0,821	0,821	0,821	0,33	0,33	0,34
0	0	10	I	3,19	3,26	3,29	0,655	0,655	0,655	0,21	0,20	0,20
0	1	10	T	2,85	2,89	2,91	0,499	0,499	0,499	0,18	0,17	0,17
1	-1	15	M	4,51	4,55	4,55	0,462	0,462	0,462	0,10	0,10	0,10
1	0	15	I	4,68	4,58	4,58	0,683	0,683	0,683	0,15	0,15	0,15
1	1	15	T	4,64	4,60	4,65	0,467	0,467	0,467	0,10	0,10	0,10

M: Maceration; I: Infusion; T: Turboextraction; DR: Dry residue; Rut: Rutin; EE: Efficiency of extraction. Data were expressed as mean, standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD).

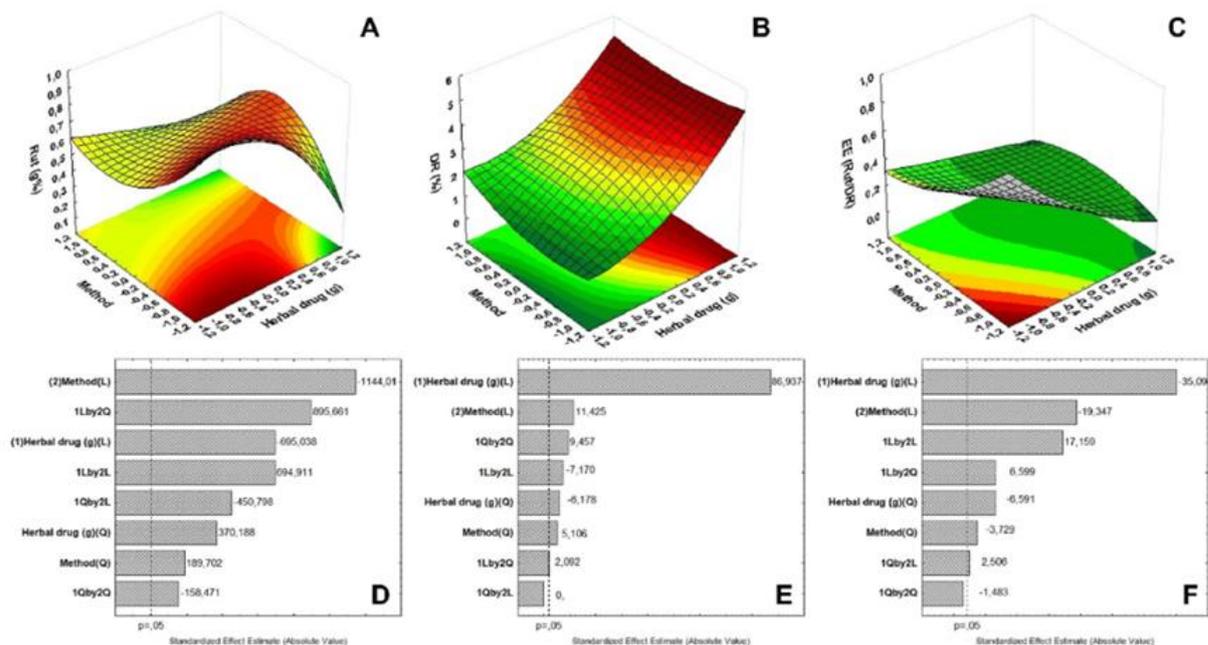


Fig. 1. Response surface and Pareto Chart for rutin content (A, D), dry residue (B, E) and extraction efficiency (C, F).

(Fig. 1B), in which it is possible to verify that a greater response (red surface area) is obtained when turbolysis is used as an extractive method and 15 g of drug quantity. The extraction efficiency response, on the other hand, showed a negative influence both for the amount of drug (-35.09) and the method (-19.34), but the latter to a lesser extent (Fig. 1C and F). From these data, it is possible to point out that the best extraction efficiency and rutin content in the raw material under study was achieved using 5 g of plant drug and extraction method by maceration (obtaining the Optimized Extract of *Moringa oleifera* = OEMo).

When analyzing the chromatograms obtained for the factorial design, it can be seen that regardless of the extraction method and amount of drug used, the chromatographic profile of the samples was similar (Fig. 2A). In the samples, 8 main compounds (Fig. 2B) were evidenced (detection performed at 350 nm). Other authors have also used factorial design to extract secondary metabolite compounds more effectively. Wong et al. (2015) used the planning, with the independent factors of pH, ethanol concentration, proportion of liquid to solid, temperature and time, in order to test the contribution of these factors in the antioxidant capacity, phenolic contents and total flavonoids in oil of palm, the authors determined that the ethanol concentration and the

liquid/solid ratio were extremely significant for obtaining the highest antioxidant activity. Alara et al. (2020) also used the factorial design for ethanolic extraction of flavanols and phenolics with *Vernonia amygdalina* leaves.

It was not possible to identify all the substances present, despite that, after analyzing the caffeic acid and rutin patterns (Fig. 2B), the peaks observed at retention times 9.55 min (1) and 13.36 min (2), whose absorption maximums were 217.3/325.2 nm and 217.3/327.3 nm, indicate the presence of cinnamic derivatives in the samples, with a scanning spectrum similar to the caffeic acid standard (217.5/324.2 nm) also analyzed. Although it is only possible to identify the presence of rutin, according to the scanning spectra it is possible that the other peaks have similar spectra, belonging to the class of flavonoids (peaks 3-8), at retention times 15.58 min (214.9/270/335.1 nm, 3), 17.7 min (212.7/270/337.9 nm, 4), 18.54 min (203/256.3/338 nm, 5), 19.22 min (203.2/256.3/356.6 nm, 6 - rutin), 19.44 min (203.5/256.4/356.8 nm, 7) and 20.26 min (198.3/265.1/348 nm, 8) (Fig. 2C).

Legend: Fig. 2a - Chromatography obtained for the extracts performed in the factorial methodology: A, B, C - Infusion 5, 10, 15%; D, E, F - Maceration 5, 10 and 15%; G, H, I - Turbolysis 5, 10, 15%. Fig. 2b

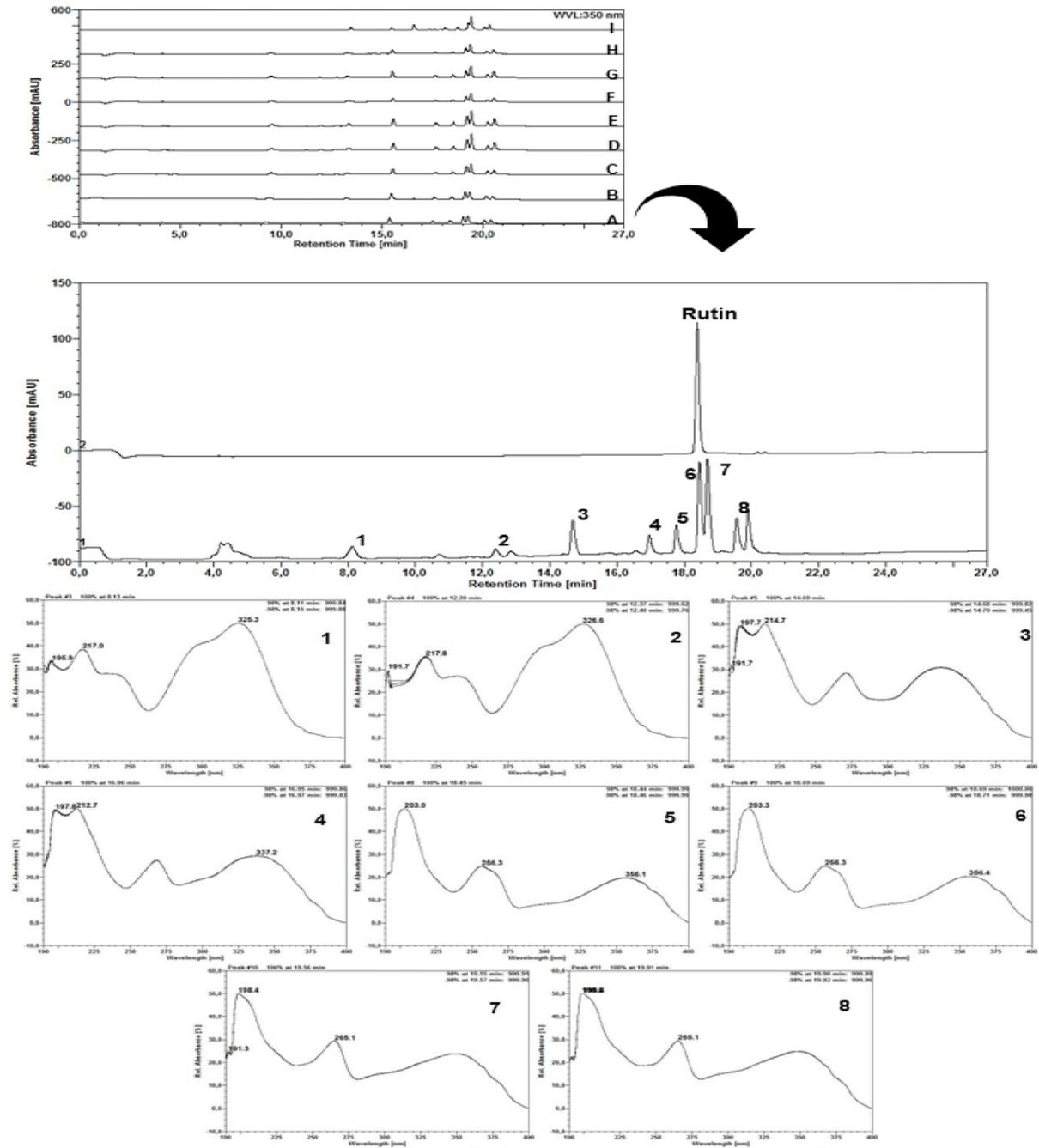


Fig. 2. Chromatograms obtained from extractive solutions of *Moringa oleifera* leaves.

-Identification of caffeic acid and rutin patterns in the 5% infusion extract sample. Fig. 2c - Chromatographic profile of the 5% infusion sample showing 9 compounds (detection at 350 nm). Fig. 2d - Peak 1 (retention time 9.55 min, absorption 217.3/325.2 nm) and Peak 2 (retention time 13.36 min, absorption maximum 217.3/327.3 nm) are equivalent to caffeic acid and rutin standards, respectively. Peaks 3–8 have similar spectra to the flavonoid class.

3.2. 13-Week repeated toxicity assessment

3.2.1. Clinical signs

No deaths related to OEMo treatment were observed in either group. Weekly in the open field evaluation, concentrations of 500 and 1000 mg/kg in both sexes, promoted a decrease in ambulation when compared to mice treated with saline. The evaluation of general

behavioral and sedative activity can be performed through the open field test, locomotion can indicate a state of alertness and the decrease in locomotor activity suggests a possible depressant effect on the Central Nervous System (CNS) (Ain and Khan, 2019). *Pyrus pashia* hydro-ethanolic extract showed a marked decrease in locomotor activity in the open field test (200, 400 and 600 mg/kg), suggesting that such extract has a sedative activity (Ain and Khan, 2019). With similar effects to *P. pashia*, high concentrations of *M. oleifera* also showed a possible CNS depressant action.

Mean body weight, food and water consumption in the 250 and 500 mg/kg OEMo treatments were not statistically different from those in the control group ($p > 0.05$); however, at the highest concentration (1000 mg/kg) both male and female mice showed a reduction in weight gain from the 5th week of treatment (Fig. 3). Furthermore, changes in body weight and food and water intake may be caused by metabolic changes and liver changes, which suggests toxicity of the tested substance (Bhardwaj et al., 2010) (Fig. 4).

Water consumption did not show significant changes for both genders throughout the treatment period. However, a reduction in feed intake was observed in males at 2 weeks and in females at 1 week with 1000 mg/kg treatment. Analysis of these indices is important, as food and water consumed on a regular basis is essential for the physiological state of the animal. Even with a high nutrient content, Stevens et al. (2015) described that *M. oleifera* leaves have antinutritional compounds in their composition, such as: saponins and phytates and oxalates. This hypothesis suggests that OEMo may not be toxic, but inhibits the bioavailability of nutrients promoting weight loss. Additionally, there were no treatment-related ophthalmologic changes in males or females at any concentration evaluated.

3.2.2. Urine analysis

Males in the concentrations of 500 and 1000 mg/kg showed the presence of proteins in an expressive way, while in females it was observed only in the 1000 mg/kg group. The other parameters remained unchanged when compared to the control. Proteinuria is one of the possible diagnostic markers of renal dysfunction and may indicate the presence of other renal pathologies. To confirm the diagnosis, the variation in proteinuria must be correlated with other biochemical changes, such as total plasma proteins, bilirubin and enzymes (Aissani et al., 2022). In addition, changes in protein levels may reflect significant changes in liver function. Therefore, despite the expressive presence of proteins in the urine analysis, data from the kidney biomarkers (Urea and Creatine) did not show significant differences that would indicate damage to this organ. On the other hand, liver functions were evaluated with plasma concentrations of ALT and AST, which showed a significant increase for the 1000 mg/kg group (Table 3). Cell damage occurs followed by the release of several enzymes into the blood, which is used as a means for clinical diagnosis (Aissani et al., 2022). In general, herbal medicines and extracts from medicinal plants have a lower risk of

toxicity, however they are not completely free of the possibility of inducing toxicity and other adverse effects (Thiesen et al., 2018; Tir et al., 2019). Thus, *Moringa oleifera* extract, in its highest concentration, presented a possible disturbance in liver function when administered orally for 13 weeks.

3.2.3. Hematological and biochemical analysis

The hematopoietic system is very sensitive to toxic compounds, so it is an important indicator of the physiological and pathological state (Obameso et al., 2021). The consumption of some substances, orally, can influence hematological parameters and trigger anemia, neutropenia and thrombocytopenia, so it is necessary to evaluate the effects of these substances on the hematopoietic system (Khatami et al., 2020). The hematological parameter results of the animals treated with OEMo are shown in Table 2. Oral treatment with OEMo, even with high doses, did not change the hematological parameters of male and female mice compared to the respective controls ($p > 0.05$). This fact demonstrates that OEMo does not destabilize the hematopoietic system, an important sign of absence of toxic effect.

Complementing the evaluations, the serum biochemical parameters of the mice were analyzed and the results presented in Table 3. The treatments in all concentrations of OEMo reduced the levels of triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) for both genders compared to the respective controls. This result corroborates that found by Aborhyem et al. (2016), who compared the use of *M. oleifera* extract with hypolipidemic extract (Atorvastatin), noting that the plant is effective for the treatment and prevention of diseases related to the lipid profile. Melebari and Elnaggar (2023) evaluated the use of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves against lead acetate intoxication, showing that treatment with leaves promoted a reduction in plasmatic levels of total cholesterol, high-density cholesterol (HDL-c) and low-density cholesterol (LDL-c), in addition to reducing triglycerides. However, the highest concentration of OEMo (1000 mg/kg) promoted an increase in alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels in male and female mice when compared to control groups ($p < 0.05$). This increase in transaminases promoted by OEMo treatment indicates possible liver damage, leading to the release of hepatocyte contents (Rezaee-hkorasany et al., 2019). Despite this, the 250 and 500 mg/kg groups did not express significant differences from controls in liver biomarkers for males and females.

3.2.4. Gross necropsy, organ weights and histopathological

The internal organs of male and female mice treated with OEMo or saline showed no change in color and texture. When evaluating the testicles and epididymis of the males, no alteration, signs of atrophy or enlargement of the organ was observed. Thus, no significant macroscopic changes were observed in either sex.

After the macroscopic evaluation, the organs were excised and weighed on an analytical balance. Regardless of dose or sex, liver,

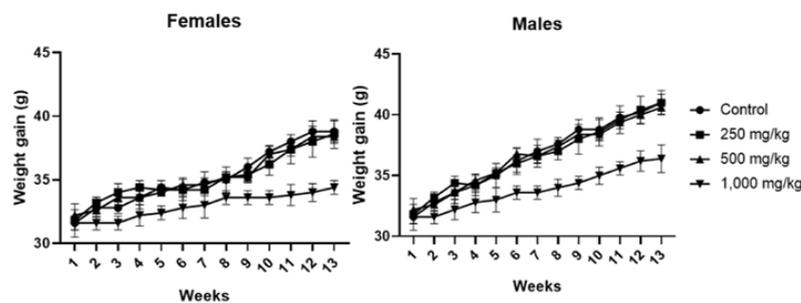


Fig. 3. Evaluation of weight gain in male and female mice treated orally with saline or OEMo for 13-weeks.

Legend: OEMo: Optimized Extract of *Moringa oleifera*. Values represent the mean \pm SEM ($n = 10$ /group). Significant differences ($p < 0.05$) were found in comparison with control.

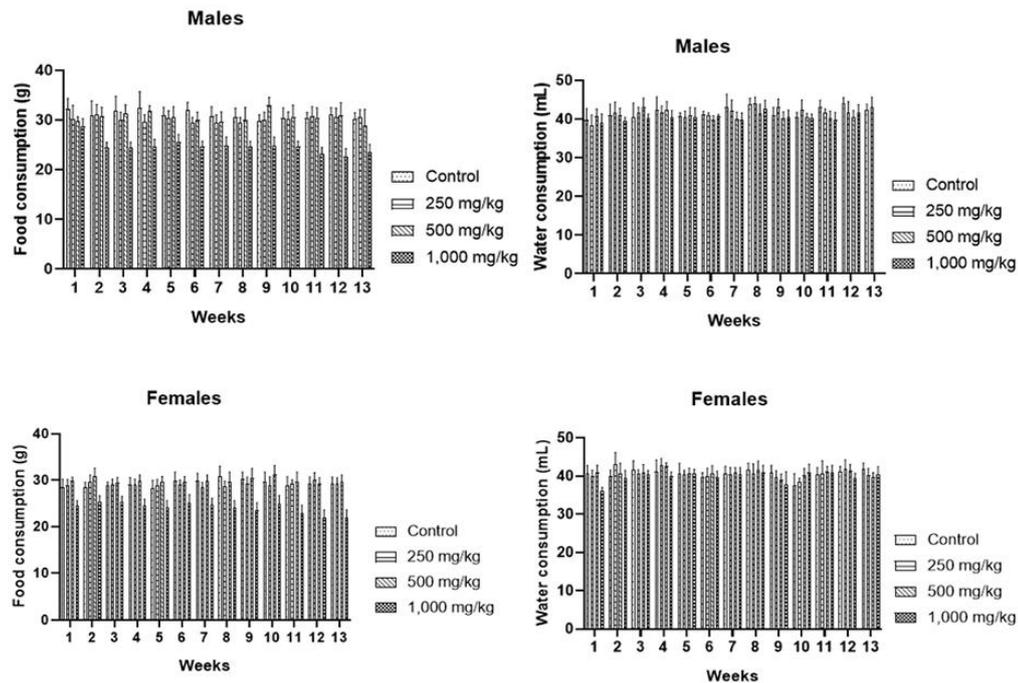


Fig. 4. Evaluation of feed and water intake of male and female mice treated orally for 13- weeks with saline or OEMo.

Legend: Legend: OEMo: Optimized Extract of *Moringa oleifera*. Values represent the mean \pm SEM (n = 10/group). Significant differences ($p < 0.05$) were found in comparison with control.

Table 2

Hematological parameters of male and female mice treated daily with the optimized extract of *Moringa oleifera per os* for 13-weeks.

Parameter	Males				Females			
	Control	Extract			Control	Extract		
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	5.44 \pm 0.30	5.28 \pm 0.45	5.30 \pm 0.52	5.24 \pm 0.31	5.32 \pm 0.80	5.72 \pm 0.77	5.60 \pm 0.82	5.21 \pm 0.93
Hematocrit (%)	42.10 \pm 0.43	43.40 \pm 1.24	41.87 \pm 1.34	42.26 \pm 1.33	40.10 \pm 0.53	40.66 \pm 1.84	41.03 \pm 1.41	40.32 \pm 1.35
Hemoglobin (%)	14.39 \pm 0.32	14.18 \pm 0.36	13.99 \pm 0.45	14.47 \pm 0.68	14.11 \pm 0.50	14.27 \pm 0.65	14.38 \pm 0.73	14.35 \pm 0.63
MCV (%)	42.76 \pm 0.56	43.07 \pm 0.79	43.01 \pm 0.79	42.31 \pm 0.92	42.22 \pm 0.56	42.43 \pm 0.72	42.33 \pm 0.90	42.73 \pm 1.03
MCH (%)	16.37 \pm 0.35	17.71 \pm 0.31	17.09 \pm 0.88	17.21 \pm 0.70	17.08 \pm 0.82	17.15 \pm 0.83	17.29 \pm 0.75	17.30 \pm 1.00
MCHC (%)	38.64 \pm 0.80	37.99 \pm 1.13	38.27 \pm 1.75	38.07 \pm 1.69	38.29 \pm 0.77	38.37 \pm 1.01	37.98 \pm 1.32	37.76 \pm 1.14
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	8.21 \pm 0.88	8.32 \pm 1.20	8.17 \pm 1.35	8.22 \pm 1.47	8.01 \pm 1.05	8.19 \pm 1.26	8.26 \pm 1.07	8.14 \pm 1.20
Segmented (%)	62.45 \pm 1.41	62.54 \pm 1.16	62.40 \pm 1.84	62.20 \pm 2.07	61.65 \pm 0.74	62.04 \pm 0.90	61.90 \pm 1.12	62.17 \pm 1.64
Lymphocytes (%)	27.20 \pm 0.30	27.02 \pm 0.34	27.37 \pm 0.50	27.45 \pm 1.05	28.19 \pm 0.68	27.60 \pm 0.95	27.73 \pm 0.95	27.52 \pm 1.01
Monocytes (%)	9.15 \pm 0.51	9.21 \pm 0.43	9.03 \pm 0.89	9.11 \pm 0.94	9.06 \pm 0.70	9.20 \pm 0.81	9.25 \pm 0.96	9.14 \pm 0.91
Eosinophils (%)	1.15 \pm 0.10	1.18 \pm 0.12	1.86 \pm 0.10	1.20 \pm 0.11	1.08 \pm 0.12	1.12 \pm 0.07	1.09 \pm 0.11	1.15 \pm 0.12
Basophils (%)	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01

MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. Values represent the mean \pm SEM (n = 10/group). No significant differences ($p > 0.05$) were found in comparison with control.

spleen, heart, kidney, stomach, lung and intestine did not differ significantly ($p > 0.05$) with mice in control groups (Table 4). Then, liver and kidney fragments were sectioned for histopathological analysis.

After administration of a drug into the body, the liver and kidneys are potentially the most commonly affected organs. Thus, Fig. 5 shows photomicrographs of the liver and kidneys of animals in the control and treated groups with OEMo of both sexes. In the kidneys, normal glomeruli, tubules and interstitium were observed in the control and treated groups with OEMo in both sexes. In the liver, the control groups and those treated with 250 and 500 mg/kg of OEMo showed organized hepatocyte cords with no fibrosis or apoptosis. However, in the treatment with the highest concentration (1000 mg/kg), the liver showed a

discreet leukocyte infiltrate and an increase in the space of Disse, when compared to the control animals. This alteration corroborates the biochemical findings of alteration of transaminases, as well as the findings of proteinuria. Thus, possibly the treatment with 1000 mg/kg of OEMo promotes changes in hepatocytes and may interfere with the processes of metabolism of substances.

Thus, in accordance with toxicity assessment data for 13 weeks, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) is established at 500 mg/kg for male and female mice. Barros et al. (2022) reported that NOAEL for infusion of *M. oleifera* leaves and powder was 1000 mg/kg and 250 mg/kg, respectively.

Table 3
Biochemical parameters of male and female mice treated daily with the optimized extract of *Moringa oleifera per os* for 13-weeks.

Parameter	Males				Females			
	Control	Extract			Control	Extract		
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Albumn (g/dL)	36.70 ± 1.22	36.90 ± 1.05	36.01 ± 1.76	35.90 ± 1.49	34.30 ± 1.28	35.12 ± 1.30	35.49 ± 1.13	35.78 ± 1.84
ALT (U/L)	60.92 ± 5.44	61.10 ± 6.66	69.22 ± 6.06	91.46 ± 7.31*	60.10 ± 6.03	61.02 ± 5.35	65.65 ± 6.44	90.34 ± 4.56*
AST (U/L)	131.54 ± 12.72	131.02 ± 13.64	144.44 ± 14.09	199.94 ± 16.18*	132.22 ± 11.11	134.03 ± 12.25	133.91 ± 15.32	205.67 ± 17.82*
ALP (IU/L)	13.82 ± 0.31	13.51 ± 0.72	13.09 ± 0.65	13.01 ± 0.89	13.27 ± 0.73	13.40 ± 0.65	13.29 ± 0.81	13.74 ± 0.91
GGT (U/L)	14.29 ± 0.42	14.11 ± 0.93	14.58 ± 0.73	14.52 ± 0.91	9.83 ± 0.80	9.52 ± 0.72	9.41 ± 0.61	9.99 ± 0.83
TP (g/dL)	65.82 ± 5.75	65.29 ± 4.21	65.57 ± 5.93	65.70 ± 5.06	62.64 ± 3.54	62.86 ± 4.26	63.01 ± 3.22	63.73 ± 4.43
BUN (mg/dL)	0.41 ± 0.19	0.35 ± 0.10	0.40 ± 0.15	0.36 ± 0.11	0.37 ± 0.16	0.41 ± 0.22	0.40 ± 0.34	0.35 ± 0.17
CREAT (mg/dL)	4.47 ± 0.12	4.65 ± 0.13	4.40 ± 0.16	4.36 ± 0.19	4.27 ± 0.41	4.38 ± 0.43	4.30 ± 0.51	4.39 ± 0.62
BILI (mg/dL)	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.07	0.25 ± 0.05	0.31 ± 0.09	0.32 ± 0.09
TC (mg/dL)	99.37 ± 7.85	87.72 ± 6.50*	82.79 ± 5.25*	78.88 ± 7.83*	98.94 ± 8.50	85.86 ± 5.74*	80.30 ± 6.13*	75.64 ± 5.22*
TG (mg/dL)	65.36 ± 4.12	56.28 ± 5.12*	55.43 ± 5.33*	48.36 ± 4.30*	69.54 ± 4.19	55.73 ± 4.10*	52.93 ± 6.11*	47.46 ± 5.18*

ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transferase; TP: Total protein; BUN: blood urea nitrogen; CREAT: Creatinine; BILI: Bilirubin; TC: Total Cholesterol; TG: Triglycerides. Values represent the mean ± SEM (n = 10/group). No significant differences (p > 0.05) were found in comparison with control.

Table 4
Organ weight (g/10 g b.w) of male and female mice treated daily with the optimized extract of *Moringa oleifera per os* for 13-weeks.

Parameter	Males				Females			
	Control	Extract			Control	Extract		
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Liver	5.14 ± 0.11	5.21 ± 0.14	5.19 ± 0.10	5.09 ± 0.12	5.09 ± 0.13	5.17 ± 0.25	5.23 ± 0.31	5.19 ± 0.28
Spleen	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.05	0.35 ± 0.04	0.39 ± 0.05	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.35 ± 0.03
Kidney	1.14 ± 0.13	1.11 ± 0.09	1.15 ± 0.08	1.10 ± 0.07	1.16 ± 0.08	1.10 ± 0.10	1.12 ± 0.12	1.14 ± 0.09
Heart	0.47 ± 0.07	0.45 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.45 ± 0.05	0.47 ± 0.07	0.50 ± 0.08	0.44 ± 0.08
Lung	0.58 ± 0.05	0.54 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.55 ± 0.05	0.53 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.53 ± 0.06	0.49 ± 0.08

Values represent the mean ± SEM (n = 10/group). No significant differences (p > 0.05) were found in comparison with control.

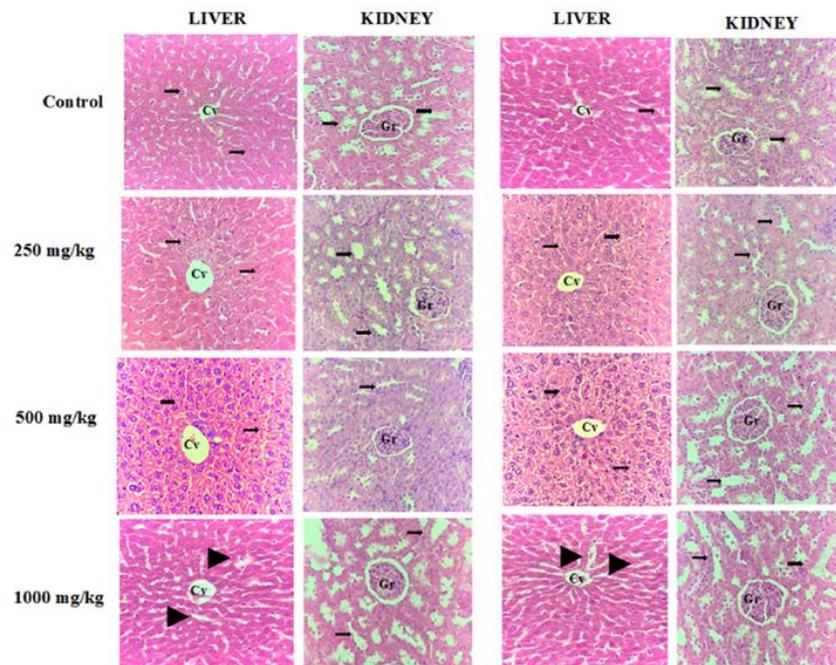


Fig. 5. Photomicrograph of liver and kidney of male and female mice treated orally for 13-weeks with saline or OEMO.

Legend: Representative photomicrographs of the livers and kidneys of male and female mice from the control groups and those treated with OEMO at a dose of 250, 500 and 1000 mg/kg. Livers: the centrilobular vein (cv) is seen on all images and space of Disse (arrow). Kidneys: Renal glomeruli (Gr) and the convoluted tubes (arrowheads) are preserved and in order. Hematoxylin and eosin staining was used. Magnification: 400x.

4. Conclusion

The *Moringa oleifera* extract had its composition characterized by cinnamic derivatives, caffeic acid, flavonoids and rutin. The oral administration of OEMo for 13-weeks did not affect the physiological and hematological parameters of mice at concentrations of 250 and 500 mg/kg, attributing a low or absence of toxicity. However, the highest concentration (1000 mg/kg) increased levels of transaminases (ALT and AST), suggesting liver damage. Finally, in all concentrations and gender, treatment with OEMo reduced cholesterol and triglyceride parameters, as reported in popular medicine. These findings contribute to describe the safety of oral use of *Moringa oleifera* leaves and reveal a possible antilipemic potential.

CRediT authorship contribution statement

Nathália Regina Galvão Silva: Writing – original draft, Visualization, Validation, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Wédeo Kennedy Costa:** Software, Formal analysis, Data curation. **Magda Rhayanny Assunção Ferreira:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho:** Writing – review & editing, Funding acquisition. **Luiz Alberto Lira Soares:** Supervision, Resources, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Thiago Henrique Napoleão:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Patrícia Maria Guedes Paiva:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Alisson Macário de Oliveira:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (IBPG-1365-2.08/20) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 405297/2018-1; CNPq - 307110/2018-4) for financial support.

References

- Aborhyem, S., Ismail, H., Agamy, N., Tayel, D., 2016. Effect of *Moringa oleifera* on lipid profile in rats. *J. High Inst. Public Health* 46 (1), 8–14. <https://doi.org/10.21608/jhiph.2016.20201>.
- Ain, Q., Khan, H., 2019. Pharmacological basis for sedative and hypnotic like effects of *Pyrus pashia* using in vivo experimental models. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 34 (9), 1345–1350. <https://doi.org/10.1002/gps.5059>.
- Aissani, F., Grara, N., Guelmamene, R., 2022. Phytochemical screening and toxicity investigation of hydro-methanolic and aqueous extracts from aerial parts of *Sonchus oleraceus* L. in Swiss albino mice. *Comp. Clin. Path.* 31 (3), 509–528. <https://doi.org/10.1007/s00580-022-03349-x>.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Olalere, O.A., 2020. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *J. King Saud Univ. Sci.* 32 (1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.08.001>.
- Ali, M.A., Yusof, Y.A., Chin, N.L., Ibrahim, M.N., Muneer, S., 2018. Development and standardization of *Moringa oleifera* leaves as a natural dietary Supplement. *J. Diet. Suppl.* 16 (1), 66–85. <https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1429517>.
- Ariani, L.N., Estiasih, T., Sunarharum, W.B., Khatib, A., 2023. Potential of moringa (*Moringa oleifera*) leaf powder for functional food ingredients: a review. *Czech J. Food Sci.* 41 (1) <https://doi.org/10.17221/221/2022-CJFS>.
- Aware, C.B., Patil, D.N., Suryawanshi, S.S., Mali, P.R., Rane, M.R., Gurav, R.G., Jadhav, J.P., 2022. Natural bioactive products as promising therapeutics: a review of natural product-based drug development. *S. Afr. J. Bot.* 151, 512–528. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.028>.
- Barros, M.C., Silva, A.G.B., dos Santos Souza, T.G., Chagas, C.A., Machado, J.C.B., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., 2022. Evaluation of acute toxicity, 28-day repeated dose toxicity, and genotoxicity of *Moringa oleifera* leaves infusion and powder. *J. Ethnopharmacol.* 296, 115504 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115504>.
- Bhardwaj, S., Srivastava, M.K., Kapoor, U., Srivastava, L.P., 2010. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food Chem. Toxicol.* 48 (5), 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.009>.
- Brazil, 2019. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE Nº 1.478, de 3 de junho de.
- Budaraga, I.K., Pramana, P.D., Wellyalina, W., 2020. Antibacterial activity of moringa leaf layer cake against *S. aureus* and *E. coli*. *J. Agric. Sci. Technol.* 4 (1), 694–708. <https://doi.org/10.32530/jaast.v4i1.130>.
- Cha, S.B., Li, Y., Bae, J.S., Song, S.W., Lee, I.C., Kim, J.C., 2021. Evaluation of 13-week subchronic toxicity of *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. root extract in rats. *J. Ethnopharmacol.* 267, 113621.
- Coz-Bolanos, X., Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Loarca-Piña, G.F., Guzmán-Maldonado, S., 2018. Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator in vitro. *Ind. Crops Prod.* 118, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.028>.
- Dzuovor, C.K.O., Pan, S., Amanze, C., Amuzu, P., Asakiya, C., Kubi, F., 2021. Bioactive components from *Moringa oleifera* seeds: production, functionalities and applications – a critical review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 42 (2), 271–293. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1931804>.
- Galvão, M.A.M., Arruda, A.O.D., Bezerra, I.C.F., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., 2018. Evaluation of the Folin-Ciocalteu method and quantification of total tannins in stem barks and pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) LP Queiroz. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 61.
- Hammi, K.M., Essid, R., Tabbene, O., Elkahoui, S., Majdoub, H., Ksouri, R., 2020. Antileishmanial activity of *Moringa oleifera* leaf extracts and potential synergy with amphotericin B. *S. Afr. J. Bot.* 129, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.008>.
- Kashyap, P., Kumar, S., Riar, C.S., Jindal, N., Baniwal, P., Guiné, R.P., Kumar, H., 2022. Recent advances in Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves bioactive compounds: composition, health benefits, bioaccessibility, and dietary applications. *Antioxidants* 11 (2), 402. <https://doi.org/10.3390/antiox11020402>.
- Khatami, M., Ebrahimi, K., Galehdar, N., Moradi, M.N., Moayyedkazemi, A., 2020. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles and their effects on liver function and hematological parameters in mice. *Turk. J. Pharm. Sci.* 17 (4), 412–416. <https://doi.org/10.4274/tips.galenos.2019.28000>.
- Kiernan, J., 2008. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, fourth ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Long Island.
- Liu, R., Liu, J., Huang, Q., Liu, S., Jiang, Y., 2022. *Moringa oleifera*: a systematic review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 74 (3), 296–320. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab131>.
- Machado, J.C.B., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., 2021. Optimization of the drying process of standardized extracts from leaves of *Spondias mombin* L. using Box-Behnken design and response surface methodology. *J. Food Process. Preserv.* 45 (7), e15595 <https://doi.org/10.1111/jfpp.15595>.
- Mehwish, H.M., Riaz Rajoka, M.S., Xiong, Y., Zheng, K., Xiao, H., Anjin, T., He, Z., 2022. *Moringa oleifera* – a functional food and its potential immunomodulatory effects. *Food Rev. Int.* 38 (7), 1533–1552. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1825479>.
- Melebar, S.J., Elnaggar, M.H., 2023. Impact of *Moringa oleifera* leaf extract in reducing the effect of lead acetate toxicity in mice. *Saudi J. Biol. Sci.* 30 (1), 103507 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103507>.
- Obameso, J.O., Akinyele, B.J., Oladunmoye, M.K., Osho, I.B., 2021. Immunomodulatory and toxicological properties of *Ganoderma mushrooms*. *Int. J. Microbiol* 10 (1), 1–5. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.746>.
- OECD, 1998. OECD guideline for the testing of chemicals: 90-day oral toxicity study in rodents (test guideline No. 408). Retrieved from. https://www.oecd.org/env/ehs/testing/E408_1998.PDF.
- Oliveira, A.M., Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Medeiros, P.L., Soares, L.A.L., Napoleão, T.H., 2019. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *J. Ethnopharmacol.* 234, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.036>.
- Omotoso, G.O., Gbadamosi, I.T., Olajide, O.J., Dada-Habeeb, S.O., Arogundade, T.T., Yawson, E.O., 2018. *Moringa oleifera* phytochemicals protect the brain against experimental nicotine-induced neurobehavioral disturbances and cerebellar degeneration. *Pathophysiology* 25 (1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.12.003>.
- Oyeyinka, A.T., Oyeyinka, S.A., 2018. *Moringa oleifera* as a food fortificant: recent trends and prospects. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 17 (2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>.
- Pagarra, H., Rahman, R.A., Muis, A., 2019. Screening of factors influencing pectin extraction of pomelo peels using 2-level factorial design. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 551, 012127 <https://doi.org/10.1088/1757-899X/551/1/012127>.

- Pop, O.L., Kerezi, A.D., Giont, Nagy C., 2022. A comprehensive review of *Moringa oleifera* bioactive compounds-cytotoxicity evaluation and their encapsulation. *Foods* 11 (23), 3787. <https://doi.org/10.3390/foods11233787>.
- Rezaee-Khorasany, A., Razavi, B.M., Taghiabadi, E., Yazdi, A.T., Hosseinzadeh, H., 2019. Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract on ethanol toxicity in rats: a biochemical, histopathological and molecular study. *J. Ethnopharmacol.* 237, 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.048>.
- Stevens, C.G., Ugese, F.D., Otitoju, G.T., Baiyeri, K.P., 2015. Proximate and anti-nutritional composition of leaves and seeds of *Moringa oleifera* in Nigeria: a comparative study. *Agro-Science* 14 (2), 9–17. <https://doi.org/10.4314/as.v14i2.2>.
- Suresh, S., Sisodia, S.S., 2018. Phytochemical and pharmacological aspects of *Cucurbita moschata* and *Moringa oleifera*. *J. Pharm. Biosci.* 45–53. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/6/i6/179239>.
- Thiesen, L.C., Oliveira Nunes, M.L., Meyre-Silva, C., 2018. The hydroethanolic *Litchi chinensis* leaf extract alleviate hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) through inhibition of hepatic inflammation. *Biomed. Pharmacother.* 107, 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.076>.
- Tir, M., Feriani, A., Labidi, A., Mufti, A., 2019. Protective effects of phytochemicals of *Capparis spinosa* seeds with cisplatin and CCl₄ toxicity in mice. *Food Biosci.* 28, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.002>.
- Vats, S., Gupta, T., 2017. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. from Rajasthan, India. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23, 239–248. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0407-6>.
- Wagner, H., Bladt, S., 2001. *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*, second ed. Springer, New York.
- Wong, W.H., Lee, W.X., Ramanan, R.N., Tee, L.H., Kong, K.W., Galanakis, C.M., Prasad, K.N., 2015. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. *Ind. Crops Prod.* 63, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.049>.

3.2. Artigo 2: Atividades antimicorbiana do extrato otimizado das folhas de *Moringa oleifera*

Artigo será submetido no periódico “South African Journal of Botany”

Fator de impacto: 2.7

Qualis A3



Atividades antibacteriana e antiviral do extrato otimizado das folhas de
Moringa oleifera

Nathália Regina Galvão Silva^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Poliana Karla Amorim^a,
Amanda Vieira de Barros^a, Cláudio Antônio de Moura Pereira^b, Lindomar José
Pena^b, Maria Betânia de Melo Oliveira^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Alisson
Macário de Oliveira^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bDepartamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: patricia.paiva@ufpe.br

Resumo

O estudo avaliou as atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral *in vitro* de extrato de folhas *M. oleifera* (OEMo), bem como atividade antibacteriana *in vivo* usando larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por *Escherichia coli*. A avaliação de atividades antibacteriana e antifúngica incluíram a determinação do efeito no crescimento, sobrevivência e formação de biofilmes. Adicionalmente, sinergismo com antibióticos foi investigado. A determinação da atividade antiviral do OEMo (0,3 a 0,9 mg/mL) usou células Vero CCL-81 infectadas por vírus Chikungunya. O extrato demonstrou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) de 125 e 500 µg/mL, respectivamente. OEMo inibiu a formação de biofilme em mais de 50% nas concentrações entre 100 e 400 µg/mL e reduziu o número de células viáveis de *E. coli* e *S. marcescens* em 38% e 18%, respectivamente. Além disso, o OEMo apresentou um efeito sinérgico com a ceftazidima. No modelo *in vivo* com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *E. coli*, OEMo não apresentou toxicidade e conferiu proteção significativa contra a infecção bacteriana, reduzindo as taxas de mortalidade das larvas. Atividade antifúngica não foi detectada contra as espécies de *Candida* e *Cryptococcus* testadas. OEMo apresentou ação contra o vírus Chikungunya, ampliando seu espectro antimicrobiano, mesmo infectadas, as células permaneceram viáveis indicando a atividade antiviral do extrato. Esses achados destacam o potencial do OEMo como agente antibacteriano e antiviral. Estudos adicionais são necessários para explorar suas aplicações clínicas e elucidar seus mecanismos de ação.

Palavras - chave: Sinergismo; Chikungunya; *Tenebrio molitor*; Biofilme; Moringa

Introdução

Moringa oleifera Lamarck, pertencente à família Moringaceae, é uma planta amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Dzuvor et al., 2021). Suas folhas são tradicionalmente utilizadas na alimentação devido ao alto valor nutricional, sendo uma importante fonte de proteínas, vitaminas e minerais (Oyeyinka et al., 2018). Além disso, a *M. oleifera* tem sido objeto de inúmeras pesquisas científicas, impulsionadas pelo seu histórico de uso na medicina popular para o tratamento de inflamações, dores e diversas patologias, o que lhe rendeu a alcunha de "árvore milagrosa" (Mehwish et al., 2022).

Estudos recentes têm destacado o potencial terapêutico das folhas de *M. oleifera*, que apresentam atividades antibacteriana (Budaraga et al., 2020), antioxidante (Vats; Gupta, 2017), além de efeitos antileishmania (Hammi et al., 2020) e ações contra broncoconstrição e inflamação das vias aéreas (Suresh et al., 2020).

De acordo com Silva et al. (2024), um extrato otimizado de folhas de *M. oleifera* (OEMo), não causou alterações significativas no ganho de peso, consumo de alimentos, nem nos parâmetros hematológicos ou histológicos em camundongos quando avaliado para toxicidade oral em doses repetidas (250 e 500 mg/kg) por 13 semanas. Esses resultados são cruciais para garantir a segurança do uso do extrato, especialmente quando se considera seu potencial como agente terapêutico para diversas condições, como infecções bacterianas. A dose mais alta (1000 mg/kg) mostrou modificações nas enzimas ALT e AST, que estão relacionadas a funcionalidade do fígado, em conjunto foi verificada alterações no espaço Disse no fígado, esses achados apresentam que a dose de 1000 mg/kg possui toxicidade. A ausência de efeitos tóxicos nas doses mais baixas reforça o potencial do OEMo como um agente farmacológica, com a vantagem adicional de ser seguro para uso em longo

prazo. Essa característica é fundamental para o desenvolvimento de preparações à base de *M. oleifera*.

A resistência bacteriana representa uma ameaça crescente à saúde pública global, com infecções causadas por patógenos como *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* sendo particularmente desafiadoras devido à sua resistência a antibióticos convencionais (Ahmad et al., 2021). Nesse contexto, os compostos de origem vegetal têm se destacado como alternativas promissoras, não apenas por sua capacidade de combater infecções bacterianas através de diferentes mecanismos antimicrobianos, mas também por apresentarem menor toxicidade em comparação com antibióticos sintéticos (Armengol et al., 2021). Este estudo investiga a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral do extrato otimizado de *Moringa*, visando explorar seu potencial como uma opção terapêutica eficaz e segura.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos

As bactérias *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Serratia marcescens* ATCC-13880, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus mutans* foram provenientes da coleção de culturas WDCM114 do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os fungos *Candida albicans* URM 5901, *Candida glabrata* URM 4246, *Candida krusei* URM 6391 e *Candida parapsilosis* URM 6345 foram provenientes da coleção de culturas da Universidade do Recife Micologia, localizada no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. *Cryptococcus neoformans* (sorotipo D) B3501,

Cryptococcus gattii (sorotipo B) R265 e *Cryptococcus neoformans* H99 sorotipo A foram fornecidos pelo Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As bactérias foram mantidas em caldo Mueller Hinton e os fungos em caldo Sabouraud Dextrose, ambos contendo glicerol a 10% (v/v) a -20 °C. Para a realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio ágar Mueller Hinton e os fungos em ágar Sabouraud Dextrose durante a noite (*overnight*), a 37 °C e 30 °C, respectivamente. Posteriormente, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO600), de modo a obter suspensões bacterianas com concentração de 10⁶ UFC/mL e fúngicas de 5 x 10⁴ UFC/mL. Para a realização dos ensaios, as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF 13 mm x 0,22 µm estéreis.

2.2. Obtenção do Extrato Otimizado de *Moringa oleifera*

O Extrato Otimizado de *Moringa oleifera* (OEMo) foi o mesmo utilizado no artigo de Silva e colaboradores (2024), desta forma, a caracterização do OEMo foi descrita previamente pelos autores.

2.3. Determinação da concentração mínima inibitória e mínima bactericida/fungicida

A concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi determinada pelo ensaio de microtitulação proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI, 2017, 2018). Em placas de microtitulação de 96 poços, OEMo foi adicionado

(80 µL) no terceiro e quarto poço a partir do qual foi diluído seriadamente em água destilada estéril até o décimo segundo poço da mesma fileira. Posteriormente, 40 µL do meio caldo Mueller Hinton ou caldo Sabouraud Dextrose foram adicionados em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µL do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. A suspensão bacteriana (80 µL; 10^6 UFC/mL) ou fúngica (80 µL; 5×10^4 UFC/mL) foram acrescentadas do segundo poço até o último poço da fileira. O segundo poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37°C ou 30°C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. A concentração mínima inibitória (CMI) correspondeu a menor concentração da amostra capaz de promover a redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%.

Para a determinação do CMB/CMF, alíquotas (10 µL) dos poços contendo concentrações das amostras \geq CMI foram inoculados em placas de petri contendo meio agar Mueller Hinton ou agar Sabouraud Dextrose, que foram posteriormente incubados a 37 °C ou 30°C por 24h. O CMB/CMF correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

2.4. Avaliação da formação de biofilmes

A formação de biofilme foi avaliada utilizando-se o método do cristal violeta. Em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato foi adicionado a cada poço 80 µL de água Milli-Q, 40 µL do meio de cultura líquido e 80 µL da suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL; em solução salina estéril), foram utilizadas as bactérias *E. coli* e *S.*

marcescens. A DO600 foi obtida no tempo zero e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, a DO600 foi registrada novamente a fim de se verificar o crescimento bacteriano. A etapa seguinte correspondeu à análise da formação do biofilme que ocorreu após a remoção das células não aderidas de cada poço da placa. Adicionalmente, os poços foram lavados com NaCl a 0,9 % estéril (três vezes) e os biofilmes (células aderidas à placa de poliestireno) foram incubados com álcool metílico a 60 °C por 60 min para fixação e, em seguida, foram marcadas com cristal violeta 0,4% (p/v) por 15 min a 25 °C. Os poços foram lavados com água para remoção do cristal violeta não aderido e, posteriormente, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado em etanol absoluto (15 min) e a absorbância a 570 nm foi mensurada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5. Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo

Para a avaliação da viabilidade celular foram utilizadas as cepas de *E. coli* e *S. marcescens*. As células bacterianas foram cultivadas por 24h na ausência (controle) ou na presença do extrato na concentração mínima inibitória (CMI). Para o controle positivo (morte) as células foram tratadas com hipoclorito de sódio a 2,5%. A morte celular foi avaliada usando o FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e os dados foram adquiridos no citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences). Um mínimo de 20.000 eventos foi coletado por amostra. Células não coradas foram consideradas viáveis. Cada ensaio foi realizado em triplicata e dois experimentos independentes foram realizados.

2.6. Ensaio de sinergismo com antibiótico comercial

Os efeitos sinérgicos entre OEMo e os antibióticos ceftazidima e ciprofloxacina foram avaliados utilizando o método descrito por Pilai et al. (2005). Cada experimento correspondeu a duas fileiras de uma microplaca de 96 poços. O primeiro poço correspondeu ao controle de crescimento 100%. OEMo foi adicionada ao terceiro poço da primeira fileira e diluição seriada em água Milli-Q estéril foi realizada até o penúltimo poço da segunda fileira. Em seguida, 80 µL do antifúngico em concentrações decrescentes foram adicionados do penúltimo poço da segunda fileira até o terceiro poço da primeira fileira. O segundo poço da primeira fileira continha apenas OEMo (80 µL, 4×CMI) e o último poço do segundo a segunda linha continha apenas antifúngico (80 µL, 200 µg/mL). Cada poço foi inoculado com suspensão (80 µL a 3×10^6 UFC/mL) e a placa foi incubada a 30°C. Foi realizada a medição da absorbância em densidade óptica (DO600) no tempo zero e após 48 h. A avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi realizada através da determinação do índice de concentração inibitória fracionária (Σ FIC), como segue: Σ FIC = (MIC da secreção em combinação / MIC da secreção sozinha) + (MIC do antibiótico em combinação / MIC do antibiótico sozinha). As combinações foram classificadas como sinérgicas (Σ FIC \leq 0,5), aditiva (Σ FIC 0.5-1.0), indiferente (Σ FIC 1.0 – \leq 4.0) ou antagonista (Σ FIC \geq 4.0).

2.7. Ensaio in vivo com larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *Tenebrio molitor* foram mantidas em recipientes plásticos, com livre acesso a alimentos (farelo de milho) e fonte de umidade (vegetais). Para o experimento, as larvas foram mantidas a uma temperatura controlada de 5 °C (na geladeira para reduzir o metabolismo), observando ausência de lesões corporais visíveis ou melanização nas larvas selecionadas para o estudo.

Para a avaliação de toxicidade de OEMo em *Tenebrio molitor*, as larvas foram combinadas por peso (~800 mg) e aclimatadas por 1 hora em temperatura ambiente (23 ± 2 °C). Em seguida, as larvas foram divididas nos grupos experimentais: grupos controle (controle positivo de toxicidade: DMSO a 100%; controle negativo de toxicidade: solução salina a 0,9%) e o grupo tratado, utilizando as concentrações obtidas previamente no ensaio de concentração mínima inibitória (CMI) do OEMo (125 e 500 µg/mL). Para cada grupo, foram utilizados 10 indivíduos, o qual foram mantidos em temperatura e umidade ambiente, com iluminação controlada (escuro) e sem acesso a alimento (Andrade-Oliveira et al., 2023).

As amostras (10 µL) foram aplicadas na terceira perna falsa, e a taxa de sobrevivência foi observada durante cinco dias. Os animais mortos caracterizados como aqueles que apresentavam melanização negra extensa, encolhimento, ausência de sinais de irritabilidade ou nenhum movimento (letargia) e foram retirados do experimento (Andrade-Oliveira et al., 2023).

Para a avaliação do efeito das amostras (grupos descritos acima) na sobrevivência de larvas de *T. molitor* infectadas por bactérias, foram selecionadas 10 larvas, com peso aproximado de 800 mg, para cada grupo. Após a seleção, foi realizada infecção com 10µL das suspensões bacterianas de *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Serratia marcescens* ATCC 13880, ajustados a 0,5 MacFarland. Posteriormente, realizou-se a administração de 10µL dos tratamentos na CMI, previamente definida. Por fim, as larvas foram mantidas em estufa a 37 °C e monitoradas por cinco dias, seguindo a metodologia adaptada de Andrade-Oliveira et al. (2023).

2.8 Avaliação de citotoxicidade de OEMo em células Vero CCL-81

Células Vero CCL-81 foram cultivadas em frasco de cultivo T-75 em DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (penstrep) a 37°C e 5% de CO₂. Após o crescimento, as células foram tratadas com tripsina para dissociá-las da superfície do frasco e peletizadas por centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos. 1×10^5 células/poço foram semeadas em microplacas de 96 poços com 100 µL de volume por poço e incubadas por 24h para crescimento. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a confluência celular só foi considerada adequada quando superior a 90%. O meio de cultura foi removido das placas preparadas no dia anterior e, em seguida, 100 µL do OEMo em diluições (0,3 – 0,9 mg/mL em DMEM 1x) foram distribuídos nos poços em quadruplicata. Depois, as placas foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após o período de incubação, a microplaca foi vertida em papel toalha para remoção completa do meio de cultura + OEMo. Após isso, 50 µL de solução MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a 1 mg/mL foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi cuidadosamente removida para evitar o desprendimento do tapete de células. Em seguida, foram adicionados 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A placa foi então mantida em agitação a 160 rpm por 15 minutos em shaker e após isso a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 570 nm.

2.9 Avaliação de atividade antiviral de OEMo

Placas de 48 poços foram preparadas com 24h de antecedência com 1×10^5 de células Vero CCL-81 em um volume de 250 μL de DMEM 1x suplementado com 10% de SFB e 1% de penstrep, armazenadas em incubadora com 5% de CO_2 a 37°C . A alíquota do vírus Chikungunya (CHIKV) ($6,025 \times 10^6$ TCID₅₀/mL) utilizado foi descongelada em gelo por aproximadamente 60 minutos antes do uso. As placas previamente produzidas foram vertidas para remoção completa do meio de cultura. Em seguida, as células foram infectadas com 100 μL de CHIKV em multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1, exceto o Mock (controle), que recebeu 100 μL de DMEM suplementado 2% de SFB e 1% de penstrep. A placa foi incubada por 1h nas mesmas condições de incubação descritas anteriormente. Após esse período, a solução viral foi removida e os poços foram organizados em triplicatas da seguinte forma: Mock (controle), CC20 (OEMo 0,8 mg/mL) e CC50 (OEMo 0,9 mg/mL) e CN (controle negativo, sem tratamento com OEMo) em 300 μL de DMEM suplementado 2% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. A placa foi mantida incubada por 48h.

2.10 Análise estatística

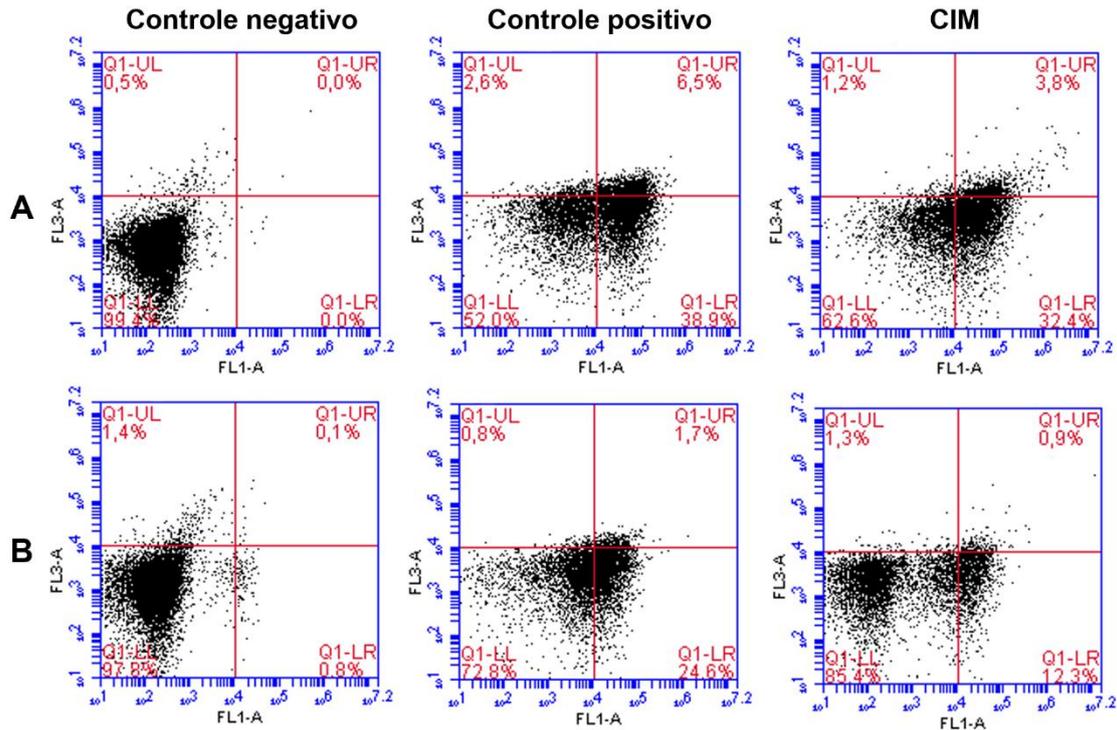
Os dados foram analisados no Software GraphPad Prism (GraphPad Software). Os resultados foram submetidos ao teste de Log-rank (Mantel-Cox), ANOVA de uma via simples, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultado e Discussão

OEMo não interferiu no crescimento de cepas fúngicas e de bactérias Gram-positivas. Por outro lado, foi capaz de inibir o crescimento das cepas *E. coli* e *S. marcescens*, com concentrações mínimas inibitórias de 125 e 500 µg/mL, respectivamente.

A análise de viabilidade por citometria de fluxo dos isolados de *E. coli* e *S. marcescens* incubados com OEMo revelou alterações na viabilidade celular (Figura 1), reduzindo a quantidade de células viáveis de *E. coli* e *S. marcescens* em 38% e 18%, respectivamente.

Figura 1. Análise de viabilidade por citometria de fluxo dos isolados de *E. coli* (A) e *S. marcescens* (B) tratados ou não com OEMo na CMI. No controle foi utilizada água destilada em lugar do extrato. As células foram coradas com laranja de tiazol (canal FL1) e iodeto de propídio (canal FL3). Os gráficos de pontos FL1 vs. FL3 foram controlados por dispersão usando o controle como referência. Nos gráficos representativos eventos correspondentes a células danificadas nos quadrantes LR, UL e UR. As células viáveis estão no quadrante LL.



Atividade antibacteriana também foi encontrada por Mehmood et al. (2022), que demonstraram a capacidade do extrato etanólico das folhas de *Moringa oleifera* em inibir o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Além disso, o extrato etanólico das folhas de moringa, caracterizado pela presença de alcaloides, saponinas, flavonoides, açúcares redutores, glicosídeos, antraquinonas, taninos e terpenoides, também foi capaz de inibir cepas de isolados clínicos de *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus*, com concentrações mínimas inibitórias variando de 6,25 a 50 mg/mL (Abadallah; Ali, 2019). No presente estudo, os resultados indicam que o OEMo apresentou uma eficácia antibacteriana mais pronunciada, uma vez que inibiu o crescimento bacteriano com concentrações significativamente inferiores às relatadas por Abadallah e Ali (2019), reforçando o potencial da *M. oleifera* como fonte promissora de compostos antimicrobianos.

Fadjataufik et al. (2021) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Moringa oleifera*, obtido a partir de uma concentração de 25% (m/v) de material vegetal, apresentou efeito inibitório frente a isolados bacterianos de forma dependente da dose, com a maior atividade observada na concentração de 200 mg/L. A atividade antibacteriana foi evidenciada contra cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., sendo a inibição mais expressiva para esta última. No presente estudo, o extrato obtido de *Moringa oleifera* (OEMo), preparado com uma concentração de 5% (m/v) em água, demonstrou uma atividade antibacteriana ainda mais significativa do que a relatada por Fadjataufik e colaboradores (2021), evidenciando a eficiência do extrato aquoso otimizado frente às cepas testadas.

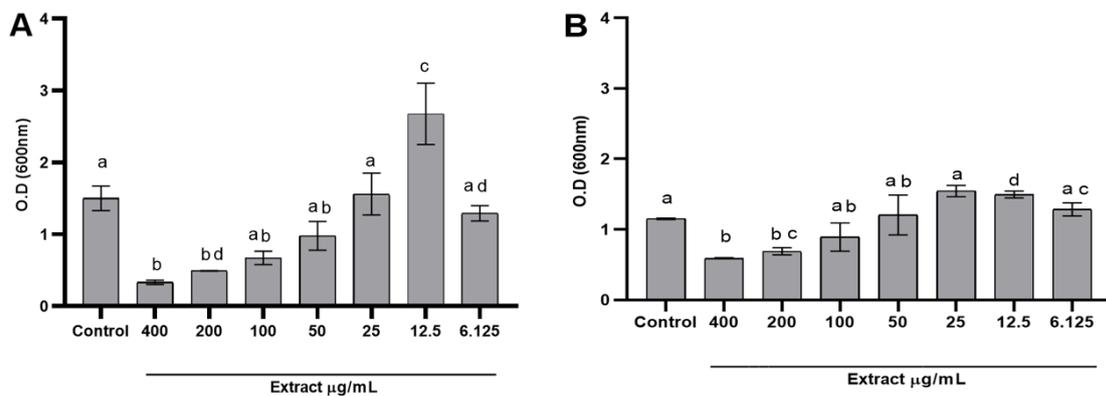
OEMo promoveu inibição significativa a formação de biofilmes de *E. coli* e *S. marcescens*, mostrando inibição maior que 50% nas concentrações 100 e 400 µg/mL, respectivamente (Figura 2A e 2B).

O biofilme é uma comunidade de bactérias cercada por uma matriz extracelular protetora autoproduzida, que tem função de proteger contra o contato de agentes antibacterianos (Payne; Boles, 2015). A estrutura e os atributos fisiológicos e bioquímicos do biofilme pode ocasionar em uma variada quantidade de doenças infecciosas crônicas e recorrentes (Bjarnsholt et al., 2013). Bactérias potencialmente patogênicas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas*, são fáceis de formar biofilme e conseqüentemente induzem a infecções persistentes como decorrência da liberação periódica dos biofilmes (Singh et al., 2014)

A atividade antibacteriana de OEMo pode ser atribuída aos compostos fitoquímicos que foram caracterizados. A rutina e outros flavonoides conseguem inibir o crescimento bacteriano, bem como uma capacidade efetiva de dissolução de biofilme (Fontana et al., 2023). Individualmente a rutina e flavonoides conseguem inibir

o crescimento bacteriano, entretanto, a atividade biológica tende a ser maior quando em conjunto. Desta forma, os compostos podem atuar de forma cooperativa para uma ação antibacteriana (Amin et al., 2015). Fontana et al. (2023) demonstraram a formação e remoção de biofilme em superfícies abióticas e bióticas com extratos hidroalcoólicos, metanoicos e extrato hidroalcoólico com maltodextrina das folhas de *M. oleifera*. Os dados da análise mostraram que extratos de folhas de *Moringa oleifera* e fenóis individuais foram capazes de inibir o crescimento do biofilme de *Xanthomonas campestris pv. campestris* em superfícies abióticas, mas a atividade de todo o fitocomplexo foi significativamente maior em comparação com a dos fenóis individuais.

Figura 2: Formação de biofilme de *E. coli* (A), *S. marcescens* (B) na ausência (controle negativo) ou na presença do OEMo em diferentes concentrações. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.



Com o aumento constante da resistência aos antibióticos, a busca por alternativas terapêuticas tem se intensificado, com ênfase no potencial antimicrobiano de produtos naturais. Os compostos de origem vegetal se destacam como alternativas promissoras, devido à sua capacidade de atuar por múltiplos mecanismos de ação e

com menor risco de efeitos colaterais (Silva et al., 2024). Esses compostos, frequentemente considerados agentes alternativos, podem não apenas complementar, mas também substituir os antibióticos tradicionais e antimicrobianos sintéticos, representando uma estratégia valiosa para enfrentar as limitações atuais dos tratamentos farmacológicos (Liu et al., 2019).

A avaliação da atividade sinérgica foi feita para detectar se OEMo e antibióticos convencionais teriam seus efeitos sobre as cepas de *E. coli* e *S. marcescens* potencializados quando combinados. O extrato combinado com o antibiótico ceftazidima teve um efeito sinérgico (Σ CIF 0,5) para as cepas de *E. coli* e *S. marcescens*. A combinação extrato + ciprofloxacina mostrou efeito indiferente não havendo interação entre os agentes (Tabela 2).

A sinergia observada entre o OEMo e a ceftazidima pode estar associada a presença dos metabólitos secundários do extrato. A associação de flavanoides com outros compostos fenólicos potencializa a atividade antibacteriana, possivelmente devido ao aumento da permeabilidade da membrana bacteriana e à facilitação do transporte do antibiótico para o interior celular (Morais-Braga et al., 2013).

Além disto, o ácido cafeico tem a capacidade de interferir nas membranas bacterianas, aumentando a permeabilidade celular e potencializando a eficácia de antibióticos (Morais-Braga et al., 2013). Esses resultados reforçam a hipótese de que a combinação de metabólitos secundários no OEMo potencializa a ação antibiótica, oferecendo uma estratégia promissora no combate à resistência bacteriana.

Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana do OEMo e antibióticos (separados ou em combinação) contra isolados de *E. coli* e *S. marcescens*

Bacteria	Avaliação					
	CMI		CMI em combinação		ΣCIF	Efeito da combinação
	Extrato	Antibiótico	OEMo	Antibiótico		
<i>E. coli</i>	125	Ceftazidima		Ceftazidima	0,5	Sinérgica
		16	62,5	0,125		
	125	Ciprofloxacina		Ciprofloxacina	2	Indiferente
		16	250	0,015		
<i>S. marcescens</i>	500	Ceftazidima		Ceftazidima	0,14	Sinérgica
		8	62,5	0,125		
	500	Ciprofloxacina		Ciprofloxacina	2	Indiferente
		8	1000	0,0078		

A avaliação de toxicidade do OEMo em modelo de *T. molitor* foi avaliada registrando-se a mortalidade das larvas nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e 5 após a administração. O grupo controle positivo apresentou 100% de mortalidade logo após o primeiro dia de experimento (Figura 3A). Já os grupos tratados com 500 µg/mL e 125 µg/mL de OEMo exibiram taxas de sobrevivência de 80% e 90%, respectivamente, indicando ausência de toxicidade significativa.

O efeito do OEMo na sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *E. coli* foi avaliado. O uso de *T. molitor* como modelo experimental é importante por ser amplamente empregado em pesquisas de patogênese microbiana e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como agentes antimicrobianos, antivirulentos e imunomoduladores (Souza et al., 2018). A suscetibilidade de *T. molitor* a patógenos como *Candida albicans*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* permite a análise dos efeitos de infecções bacterianas em nível sistêmico, refletindo alterações

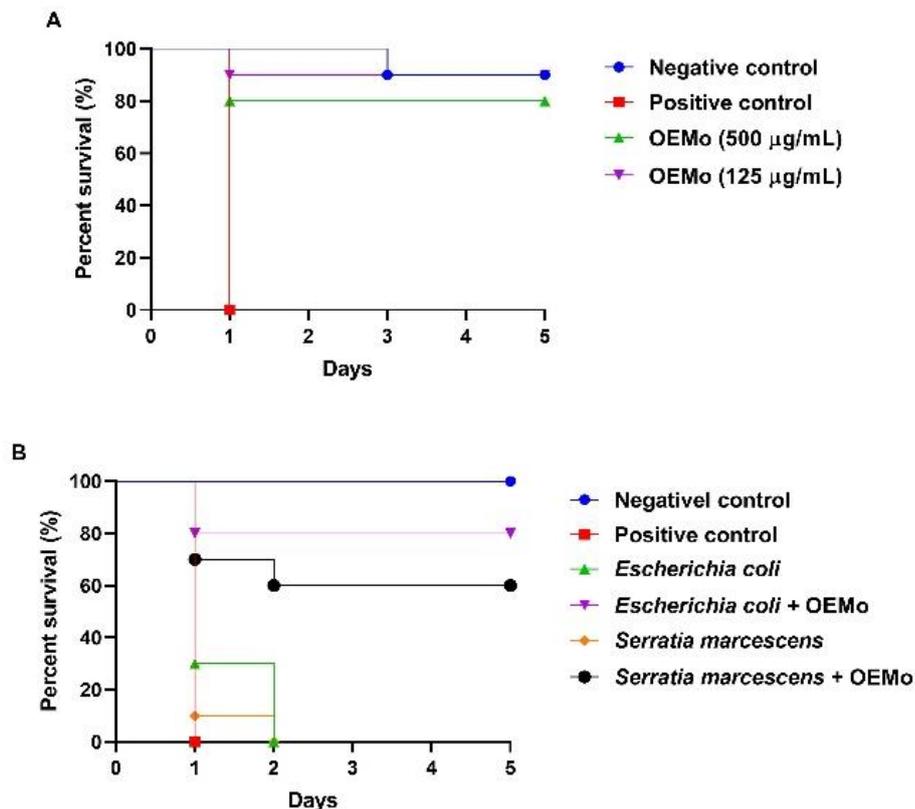
em tecidos, hemolinfa e fagócitos (Seong et al., 2018). Além disso, o sistema imunológico de *T. molitor* compartilha vias de sinalização importantes com organismos superiores, como a via Toll, a cascata de profenoloxidase e a via de autofagia, o que reforça sua relevância como modelo para estudos de resposta imune e avaliação de compostos bioativos (Yang et al., 2018).

Quando inoculadas apenas com as suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, as larvas apresentaram 100% de mortalidade após dois dias de experimento. Em contraste, nos grupos tratados com 125 µg/mL do extrato de *Moringa oleifera* (OEMo), as taxas de sobrevivência foram de 80% para as larvas infectadas por *E. coli* e de 60% para aquelas infectadas por *S. marcescens*. Observou-se que a maioria das mortes nos grupos tratados ocorreu nos dois primeiros dias de infecção, período considerado mais crítico. Após esse intervalo, as taxas de sobrevivência permaneceram estáveis até o término do experimento, indicando um efeito protetor do extrato ao longo do tempo.

=Esses resultados indicam que OEMo, além de não apresentar toxicidade, conferiu proteção às larvas de *T. molitor* contra a infecção causada pelas cepas bacterianas, reduzindo a taxa de mortalidade em ambas as concentrações de OEMo testadas.

Dias et al. (2021) destacam a utilização de *T. molitor* como modelo experimental para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, corroborando os achados do presente trabalho. No estudo com *Humiria balsamifera*, o tratamento das larvas com o extrato prolongou significativamente sua sobrevivência durante infecções bacterianas, sugerindo um efeito protetor atribuído à presença de compostos bioativos, como flavonoides e outros metabólitos secundários, que atuam na modulação da resposta imunológica e no combate direto aos patógenos.

Figura 3. Efeito do OEMo na sobrevivência de larvas de *T. molitor* (A) e efeito do OEMo na sobrevivência de larvas infectadas com *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* (B).



De forma semelhante, os resultados obtidos com OEMo demonstraram não apenas a ausência de toxicidade significativa nas larvas de *T. molitor*, mas também um efeito protetor frente à infecção induzida por *E. coli* e *S. marcescens*. Esses achados destacam o potencial do OEMo em reduzir a mortalidade associada à infecção bacteriana, possivelmente devido à ação de compostos fenólicos, como ácido cafeico, rutina e flavonoides, que são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras.

OEMo é constituído por um conjunto de polifenóis e tem sido relatado na literatura que um complexo de moléculas polifenólicas podem atuar na modificação

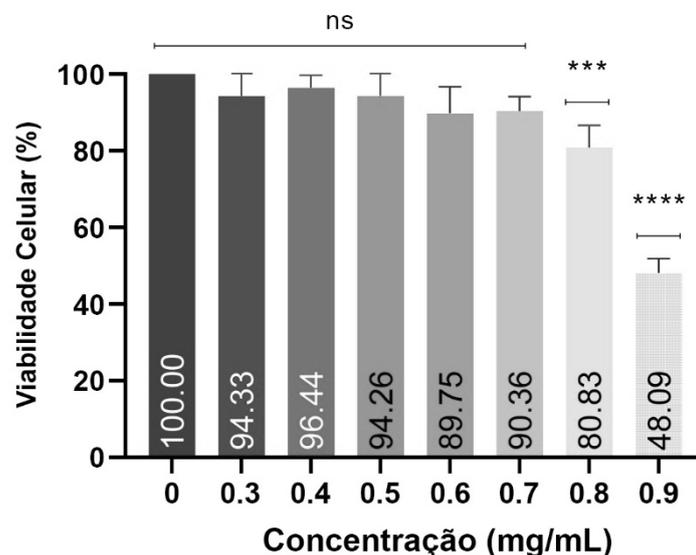
da permeabilidade da membrana bacteriana, induzindo a um desligamento da síntese de ATP e diminuição na seletividade de compostos elegíveis a penetração no citoplasma bacteriano (Neupane et al., 2019; Kou et al., 2018). Algumas moléculas de polifenóis conseguem modificar a permeabilidade e a integridade da membrana, através da promoção da passagem pelo citoplasma de compostos que podem inibir os complexos enzimáticos que estão envolvidos na replicação bacteriana (Nguyen; Bhattacharya, 2022).

Entre os fenóis simples que são detectados nas folhas de *Moringa oleifera*, a rutina tem sua atividade antibacteriana associada à sua solubilidade e interação com a membrana celular (Hooda et al., 2020). Flavonoides que possuem anel com hidroxila central, como a rutina, conseguem se ligar à subunidade β da DNA girase (GyrB) e desta forma, ocorre o bloqueio do sítio de ligação do ATP que compromete o processo de divisão celular e conseqüentemente a replicação cromossômica, desencadeando à inibição do crescimento bacteriano (Efenberger-Szmechtyk et al., 2021); ademais a rutina tem a capacidade de inibir a enzima topoisomerase tipo II, promovendo a clivagem do DNA (Ivanov et al., 2022). Além disto, Amin et al. (2015) e Wang et al. (2018) mostraram que os flavonoides são capazes de fato de interromper a integridade da membrana bacteriana, ocasionando a inibição do crescimento.

A viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações do OEMo foi avaliada pelo ensaio de MTT (Figura 4). As células Vero CCL-81 foram expostas a concentrações do extrato variando de 0 (controle negativo, apenas meio de cultura) até 0,9 mg/mL. A análise estatística revelou que não houve diferenças significativas entre as concentrações de 0,3 e 0,7 mg/mL ($p > 0,05$). No entanto, a concentração de 0,8 mg/mL resultou em uma redução significativa da viabilidade celular ($p = 0,0009$), sendo identificada como a concentração citotóxica 20% (CC20). Já a concentração de

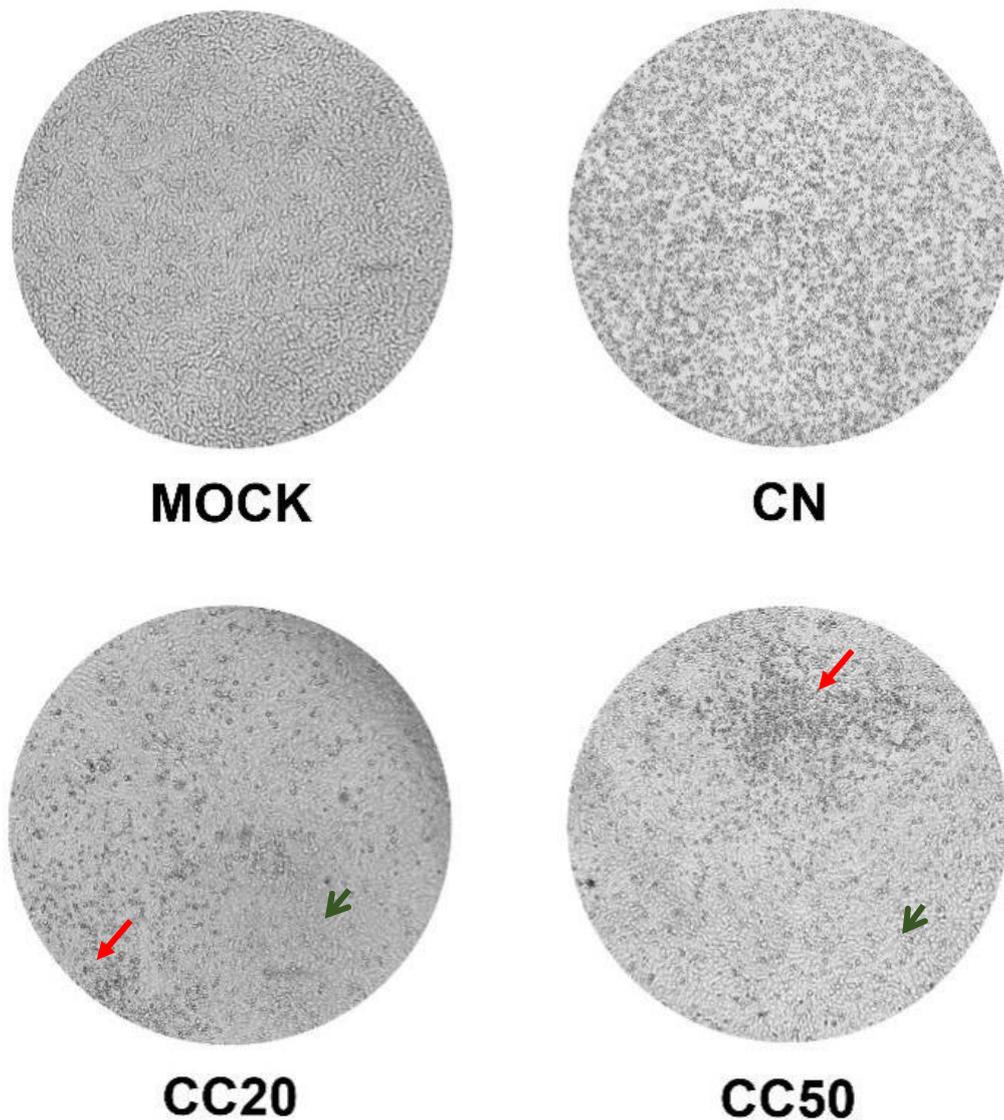
0,9 mg/mL reduziu a viabilidade celular para 48,09%, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), sendo identificada como a concentração citotóxica 50% (CC50). Esses resultados indicam um efeito citotóxico de acordo com a dose, com uma queda acentuada na viabilidade celular a partir de 0,8 mg/mL. Postestá et al. (2019) também identificaram um efeito citotóxico dependente da dose de extrato aquoso de *Moringa oleifera* em PBMCs, com concentrações acima de 0,25 mg/mL induzindo aumento na morte celular. Giugliano et al. (2024) testaram extrato de folha de *M. oleifera* em células Vero CCL-81 e Vero/SLAM e observaram um perfil de baixa citotoxicidade.

Figura 4 – Viabilidade celular (%) após tratamento com diferentes concentrações de OEMo. Células Vero-CCL-81 foram expostas a concentrações do extrato variando de 0 (apenas meio de cultura) a 0,9 mg/mL, e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (triplicata). "ns" indica diferença não significativa, enquanto "****" e "*****" indicam diferenças estatisticamente significativas, respectivamente.



As imagens microscópicas das células tratadas com as concentrações de CC20 (0,8 mg/mL) e CC50 (0,9 mg/mL) do OEMo (Figura 5) foram capturadas utilizando a objetiva de 40x em microscópio invertido, com o objetivo de avaliar as alterações morfológicas causadas pela infecção viral de Chikungunya nas diferentes condições experimentais. As células foram expostas a quatro condições: Mock (controle), CC20, CC50 e CN (controle negativo, infectado sem tratamento). Nos tratamentos com o OEMo, nas concentrações de CC20 e CC50, observaram-se alterações na morfologia celular, com a presença de algumas células apoptóticas, embora em número reduzido em comparação ao controle negativo. As células tratadas com o OEMo apresentaram uma proteção parcial contra os efeitos do vírus Chikungunya, pois, ao contrário do controle negativo, onde o tapete celular foi completamente comprometido e as células estavam morfológicamente alteradas e desprendidas do substrato, as células tratadas mantiveram maior integridade celular. Esses resultados sugerem que o OEMo possui potencial na redução das infecções virais em células expostas ao Chikungunya.

Figura 5. Imagens microscópicas das células Vero CCL-81 após tratamento com diferentes concentrações do OEMo. As células foram incubadas nas seguintes condições: Mock (controle), CC20 (OEMo 0,8 mg/mL), CC50 (OEMo 0,9 mg/mL) e CN (controle negativo), e infectadas com o vírus Chikungunya em um MOI de 0,1. As imagens representam a morfologia celular observada sob o microscópio para cada condição bem as alterações observadas, seta vermelha indica células apoptóticas (assim como o controle negativo), seta verde indica células com integridade celular.



O extrato etanólico das folhas de *M. oleifera* demonstrou atividade antiviral contra os vírus H1N1 e SARS-CoV-2, com CC50 de 10,61 $\mu\text{g/mL}$ e 12,29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Allam et al., 2023). Além disso, Giugliano et al. (2024) relataram a ação do extrato de moringa frente a vírus responsáveis por infecções respiratórias, como o coronavírus 229E (HCoV-229E) e o vírus do sarampo (MeV). No presente estudo, a atividade antiviral do OEMo contra o vírus Chikungunya reforça o potencial terapêutico *Moringa oleifera* no combate a diversas infecções virais, ampliando seu

espectro de ação e destacando seu papel promissor no desenvolvimento de novas abordagens antivirais.

Conclusão

OEMo apresentou atividade antibacteriana significativa contra cepas clínicas de *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, reduzindo a sobrevivência e inibindo a capacidade de formação de biofilmes, apesar disso, o extrato não apresentou atividade antifúngica. O extrato foi sinérgico com a ação do antibiótico ceftazidima contra ambas as bactérias testadas o que é relevante do ponto de vista de estratégias terapêuticas combinadas. O estudo com larvas de *Tenebrio molitor infectadas* com *E.coli* demonstrou a eficiência do extrato em reduzir a mortalidade larval.

OEMo demonstrou atividade contra o vírus Chikungunya. No entanto, observou-se um efeito citotóxico dependente da dose, com queda acentuada na viabilidade celular a partir de 0,8 mg/mL, evidenciando a importância de se estabelecer limites de segurança para aplicações terapêuticas.

Os resultados obtidos reforçam o potencial do OEMo como agente antibacteriano e antiviral, com destaque para seu efeito protetor em modelos biológicos e sua capacidade de potencializar a ação de antibióticos. Essas evidências abrem caminho para estudos adicionais que visem explorar suas aplicações clínicas e compreender melhor seus mecanismos de ação.

Acknowledgements

Os autores expressão sua gratidão à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (IBPG-1365-2.08/20)) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 405297/2018-1; CNPq - 307110/2018- 4) pelo suporte financeiro.

Referências

- Abadallah, M. S.; Ali, M. 2019. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* leaf extracts against bacteria isolated from patients attending general Sani Abacha specialist hospital damaturu. *J. Allied Pharm. Sci*, v. 1, p. 61-66.
- Abushaheen, M. A., et al. 2020. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-month*, 66(6), 100971.
- Ahmad, I., et al., 2021. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101-111.
- Allam, O. G. et al. 2023. Virucidal effect of *Moringa oleifera* against SARS-CoV-2 and Influenza A/H1N1. *African Journal of Biological Sciences*, 19(1), 69-78.
- AMIN, M. U. et al. 2015. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 15, p. 1-12.
- Amin, M. U. et al. 2015. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 15, p. 1-12, 2015.
- Andrade-Oliveira, A. L., et al. 2023. *Tenebrio molitor* as a model system to study *Staphylococcus* spp virulence and horizontal gene transfer. *Microbial Pathogenesis*, 183, 106304.

- Armengol, E. S., Harmanci, M., Laffleur, F. 2021. Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. *Microbiological Research*, 252, 126867.
- Bjarnsholt, T. et al. 2013, Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed?. *Nature reviews Drug discovery*, v. 12, n. 10, p. 791-808
- Budaraga, I.K., Pramana , P.D., Wellyalina, W., 2020. Antibacterial Activity of Moringa Leaf Layer Cake Against *S. aureus* and *E. coli*. *J. Agric. Sci. Technol*, 4(1), 694-708. <https://doi.org/10.32530/jaast.v4i1.130> .
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018 *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th Edition, CLSI guideline M07.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 4th Edition, CLSI guideline M27.
- Dias, E. J. S. 2021. "Antimicrobial Activity of Extracts from the *Humiria balsamifera* (Aubl)" *Plants* 10, no. 7: 1479.
- Dzuvor, C. K., Pan, S., Amanze, C., Amuzu, P., Asakiya, C., Kubi, F. 2022. Bioactive components from *Moringa oleifera* seeds: production, functionalities and applications—a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(2), 271-293.
- Efenberger-szmechtyk, M. et al. 2021. Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 61, n. 1, p. 149-178, 2021
- F.B. Morais-Braga, et al. 2013. Phenolic Compounds and Interaction between Aminoglycosides and Natural Products of *Lygodium venustum* SW against

Multiresistant Bacteria. *Chemotherapy* 1. 58 (5): 337–340. <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1159/000343044>

Fadiataufik, M. et al. 2021. Antibacterial activities of *Moringa oleifera* leaf extract on some human pathogenic bacteria. *Saudi J. Med. Pharm. Sci*, v. 7, p. 426-431.

Fontana, R. et al. 2023. Effects of Flavonoids and Phenols from *Moringa oleifera* Leaf Extracts on Biofilm Processes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plants*, v. 12, n. 7, p. 1508.

Giugliano, R. et al. 2024. Antiviral properties of *Moringa oleifera* leaf extracts against respiratory viruses. *Viruses*, 16(8), 1199.

Hammi, K.M., Essid, R., Tabbene, O., Elkahoui, S., Majdoub, H., Ksouri, R., 2020. Antileishmanial activity of *Moringa oleifera* leaf extracts and potential synergy with amphotericin B. *S. Afr. J. Bot.*, 129, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.008>.

Hooda, H., Singh, P.; Bajpai, S.2020. Effect of quercetin impregnated silver nanoparticle on growth of some clinical pathogens. *Materials Today: Proceedings*, v. 31, p. 625-630

Ivanov, M. et al. 2022. Polyphenols as inhibitors of antibiotic resistant bacteria—Mechanisms underlying rutin interference with bacterial virulence. *Pharmaceuticals*, 15(3), 385.

Kou, X. et al. 2018. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, v. 10, n. 3, p. 343.

Liu, C. et al. 2019. Antibacterial and antibiotic synergistic activities of the extract from *Pithecellobium clypearia* against clinically important multidrug-resistant gram-negative bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*, v. 32, p. 100999..

Mehmood, Abid et al.2022. Phytochemical screening, antioxidants properties and antibacterial efficacy of moringa leaves. *J Xi'an Shiyou Uni Nat Sci*, v. 18, n. 10, p. 59-70.

Mehwish, H.M., Riaz Rajoka, M.S., Xiong, Y., Zheng, K., Xiao, H., Anjin, T., He, Z., 2022.

Moringa oleifera—a functional food and its potential immunomodulatory effects. *Food Rev. Int.*, 38(7), 1533-1552. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1825479>

Neupane, P. et al. 2019. ATP synthase: structure, function and inhibition. *Biomolecular concepts*, v. 10, n. 1, p. 1-10.

Nguyen, T. L. A.; Bhattacharya, D. 2022. Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. *Molecules*, v. 27, n. 8, p. 2494.

Oyeyinka, A.T., Oyeyinka, S.A., 2018. Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, 17(2), 127-136.

<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>

Payne, D. E.; Boles, B. R. 2016. Emerging interactions between matrix components during biofilm development. *Current genetics*, v. 62, p. 137-141.

Potestà, M. 2019. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of Moringa oleifera Lam on lymphoid and monocytoid cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18, 5-17. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7544>

S.K. Pillai, R.C. Moellering, G.M. Eliopoulos. 2005. Antimicrobial combinations V. Lorian (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, The Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia. pp. 365-440 fifth ed.

Seong, J.H. et al. 2018. Molecular Cloning and Effects of Tm14-3-3zeta-Silencing on Larval Survivability Against, *E. coli* and *C. albicans* in *Tenebrio molitor*. *Genes*, 9, 330.

Silva, N. R. G., et al. 2024. 13-Week repeated-dose toxicity study of optimized aqueous extract of Moringa oleifera leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 335, 118637.

- SILVA, P. M. et al. 2024. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) inhibits *Pseudomonas aeruginosa* replication, viability, aggregation, and biofilms. *South African Journal of Botany*, v. 165, p. 264-274.
- Singh, B. et al. 2014. Cefuroxime axetil loaded solid lipid nanoparticles for enhanced activity against *S. aureus* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 121, p. 92-98.
- Souza, P. C. et al. 2018. Custodio Caloni, C.; Wilson, D.; Sergio Almeida, R. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. *J. Fungi* 2018, 4, 125.
- Suresh, S., Sisodia, S.S., 2018. Phytochemical and Pharmacological Aspects of *Cucurbita moschata* and *Moringa oleifera*. *J. Pharm. Biosci.*, 45-53.
<https://doi.org/10.20510/ukjpb/6/i6/179239>.
- Vats, S., Gupta, T., 2017. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. from Rajasthan, India. *Physiol Mol Biol Plants* 23, 239–248. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0407-6>
- Wang, T. Y. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 13(1), 12-23.
- Yang, Y.T et al. 2018. *Tenebrio molitor* Gram-negative-binding protein 3 (TmGNBP3) is essential for inducing downstream antifungal Tenecin 1 gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007. *Insect Sci.* 25, 969–977

4. CONCLUSÃO

O extrato de *Moringa oleifera* (OEMo) contém derivados cinâmicos, ácido cafeico, flavonoides e rutina que são metabólitos secundários conhecidos por suas propriedades biológicas. Ensaio in vivo com camundongos revelou que quando administrado oralmente por 13 semanas nas concentrações de 250 e 500 mg/kg, OEMo não afetou os parâmetros fisiológicos e hematológicos dos camundongos, indicando baixa toxicidade ou ausência dela. No entanto, a dose mais alta (1.000 mg/kg) causou um aumento nos níveis de transaminases (ALT e AST), sugerindo possível dano hepático. O tratamento com OEMo nas concentrações menores resultou em uma redução significativa nos níveis de colesterol e triglicerídeos, corroborando seu potencial antilipêmico conforme relatado na medicina popular.

OEMo apresentou atividade bacteriostática contra *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) de 125 e 500 µg/mL, respectivamente. O extrato também foi capaz de inibir a formação de biofilmes bacterianos em mais de 50% nas concentrações de 100 a 400 µg/mL, o que destaca seu potencial no combate a infecções. OEMo apresentou efeito sinérgico quando combinado com o antibiótico ceftazidima, ampliando a eficácia do tratamento contra essas bactérias, o que é extremamente relevante no contexto da resistência bacteriana.

O estudo com larvas de *Tenebrio molitor*, revelou ausência de toxicidade nas concentrações testadas. Também foi demonstrado que OEMo reduziu a mortalidade de larvas infectadas com *E. coli*, proporcionando uma proteção considerável contra a infecção bacteriana.

OEMo demonstrou ação contra o vírus Chikungunya. Toxicidade celular dependente da dose foi detectada, com diminuição acentuada na viabilidade de células Vero CCL-81 a partir de 0,8 mg/mL. O estudo indica a necessidade de cuidados na determinação das doses terapêuticas.

O OEMo demonstrou eficácia contra infecções bacterianas e virais, e evidenciou um efeito protetor em modelos biológicos, com a capacidade adicional de potencializar a ação de antibióticos. Essas descobertas abrem importantes perspectivas para a utilização clínica do OEMo e incentivam novos estudos para

explorar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades biológicas detectadas e para a definição de possíveis aplicações terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABADALLAH, M. S.; ALI, M. Antibacterial activity of Moringa oleifera leaf extracts against bacteria isolated from patients attending general Sani Abacha specialist hospital damaturu. *J. Allied Pharm. Sci*, v. 1, p. 61-66, 2019.
- ABALAKA, M. E. et al. The antibacterial evaluation of Moringa oleifera leaf extracts on selected bacterial pathogens. **Journal of Microbiology research**, v. 2, n. 2, p. 1-4, 2012.
- ABDALLAH, Muhammad et al. Antibacterial activity of Moringa oleifera methanolic leaves extracts against some Gram-positive and Gram-negative bacterial isolates. *Microbes and Infectious Diseases*, v. 3, n. 1, p. 199-208, 2022.
- ADJI, Arga Setyo et al. A review of Leaves and Seeds Moringa oleifera Extract: The potential Moringa oleifera as Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antidiarrhoeal, And Antiulcer Approaches To Bacterial Gastroenteritis. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, v. 10, n. F, p. 305-313, 2022.
- AGBOUN, T.D.T., APUGO-NWOSU, T.U., MOHAMMED, J.A., AMEH, A.O., ABUBAKAR, G., MUSTAPHA, M., OKORO, P. Potentials of using Moringa oleifera seeds in the bioremediation of soil contaminated by crude oil. *British Journal of Applied Science & Technology*, v. 15, p.1–8, 2016.
- AHMAD, W., NOOR, M.A., AFZAL, I., BAKHTAVAR, M.A., NAWAZ, M.M., SUN, X., ZHAO, M. Improvement of sorghum crop through exogenous application of natural growth promoting substances under a changing climate. *Sustainability*, v. 8, p. 1330. 2016.
- AIN, Quratul; KHAN, Haroon. Pharmacological basis for sedative and hypnotic like effects of Pyrus pashia using in vivo experimental models. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 34, n. 9, p. 1345-1350, 2019.
- AISSANI, Fatine; GRARA, Nedjoud; GUELMAMENE, Rahma. Phytochemical screening and toxicity investigation of hydro-methanolic and aqueous extracts from aerial parts of Sonchus oleraceus L. in Swiss albino mice. **Comparative Clinical Pathology**, v. 31, n. 3, p. 509-528, 2022.
- AL-ASMARI, Abdulrahman Khazim et al. Moringa oleifera as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PloS one*, v. 10, n. 8, p. e0135814, 2015.
- ALI, Muhammad Azhar et al. Development and standardization of Moringa oleifera leaves as a natural dietary supplement. **Journal of dietary supplements**, v. 16, n. 1, p. 66-85, 2019.
- AMENI, Aline Zancheti et al. Toxicity study about a medicinal plant Casearia sylvestris: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 9-13, 2015.
- AMIN, Muhammad Usman et al. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant Staphylococcus aureus. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 15, p. 1-12, 2015.
- ANAND, Utpal et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
- ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N.º 49, de 23 de novembro de 2010, Aprova a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição edá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília-DF*, 24 de novembro de 2010

_____. RDC nº 219, de 22 de dezembro de 2006. Aprova a inclusão do uso das espécies vegetais e parte(s) de espécies vegetais para o preparo de chás constante da Tabela 1 do Anexo desta Resolução em complementação as espécies aprovadas pela Resolução ANVISA RDC nº. 267, de 22 de setembro de 2005. D.O.U. -Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de dezembro de 2006

_____. RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Espécies vegetais para o preparo de chás. D.O.U. –Diário Oficial da União; Poder Executivo, 23 de setembro de 2005.

_____. RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. D.O.U. -Diário Oficial União; Poder Executivo, 18 mar 2004.

ANWAR, Farooq et al. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.

ARAÚJO, Larissa Cardoso Corrêa et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from Moringa oleifera seeds. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013.

ARIANI, Lina Novi et al. Potential of moringa (Moringa oleifera) leaf powder for functional food ingredients: A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 41, n. 1, 2023.

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.

ASARE, George Awuku et al. Toxicity potentials of the nutraceutical Moringa oleifera at supra-supplementation levels. *Journal of ethnopharmacology*, v. 139, n. 1, p. 265-272, 2012.

ASENSI, Guillermo Doménech; VILLADIEGO, Alba Manuela Durango; BERRUEZO, Gaspar Ros. Moringa oleifera: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, v. 67, n. 2, p. 86-97, 2017.

ATRI, Neelam et al. Screening for endophytic fungi with antibacterial efficiency from Moringa oleifera and Withania somnifera. *J Sci Res*, v. 64, n. 1, p. 127-133, 2020.

AWARE, Chetan B. et al. Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 512-528, 2022.

AWODELE, Olufunsho et al. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of Moringa oleifera Lam.(Moringaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 330-336, 2012.

AZEEZ, Abdul et al. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in Gladiolus. **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1352-1357, 2007.

BAH, Clara SF et al. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. **Food chemistry**, v. 202, p. 458-466, 2016.

BAPTISTA, A. T. A. SILVA, M. O.; BERGAMASCO, ROSÂNGELA.; VIEIRA, A. M. S. Avaliação físico-química e sensorial de biscoitos tipo cookies elaborados com folha de Moringa oleifera. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 30, p. 65-74, 2012.

BARROS, Matheus Cavalcanti et al. Evaluation of acute toxicity, 28-day repeated dose toxicity, and genotoxicity of Moringa oleifera leaves infusion and powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 296, p. 115504, 2022.

BARROS FILHO, M. V.; MORAES DIAS, V.; SOUZA PIVATTO, H. J.; SOUZA PIVATTO, A. L.; GUIMARÃES DE SOUZA, T.; DUARTE GATTO, C.; MANFROI, A.; RODRIGUES TARDOQUE PEREIRA, N.; RIBEIRO DA SILVA, T. M.; MARTINS FERNANDEZ, J. H.; FELSKY RODRIGUES DOS ANJOS, N.; MEDEIROS, I. Chikungunya: Revisão das Evidências Científicas sobre Epidemiologia, Diagnóstico e Manejo Clínico. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 545–556, 2024. DOI: 10.36557/2674-8169.2024v6n10p545-556. Disponível em: <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/3567>. Acesso em: 29 abr. 2025.

BENUCCI, Ilaria et al. Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1349-1353, 2011.

BHARDWAJ, Shipra et al. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1185-1190, 2010.

BJARNSHOLT, Thomas et al. Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed?. *Nature reviews Drug discovery*, v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.

BOATENG, L.; NYARKO, R.; ASANTE, M.; STEINER-ASIEDU, M. Acceptability of complementary foods that incorporate Moringa oleifera leaf powder among infants and their caregivers. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 39, p. 137-148. 2018

BOUMAZA-HAMLADJI, Sarah et al. Flavonoic content and antibacterial evaluation of Moringa oleifera Lam. leaves grow in Algeria. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, v. 14, n. 3, p. 191-195, 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária –(ANVISA). RE nº 90, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. D.O.U.-Diário Oficial da União, Brasília-DF, 18 de março de 2004

_____. Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995. Instituir e normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Diário Oficial União. 6 fev 1995; Seção 1:1523

_____. Serviço de Fiscalização de Medicina e Farmácia. Portaria nº 22, de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. Diário Oficial da União. 16 nov 1967

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) -Guia para a Condução de Estudos Não clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília-DF, 2013. 48p.

_____. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. –Diário Oficial da União; Poder Executivo, 22 de junho de 2006b.

_____. Ministério da Saúde. Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras Providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 setembro 1976.

_____. Ministério da Saúde. RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 maio 2014.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 3 maio 2006a.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira et al. *Vibrio* spp. from Macrobrachium amazonicum prawn farming are inhibited by Moringa oleifera extracts. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 8, n. 11, p. 919-922, 2015.

BUDARAGA, I.K., PRAMANA, P.D., WELLYALINA, W., 2020. Antibacterial Activity of Moringa Leaf Layer Cake Against *S. aureus* and *E. coli*. *J. Agric. Sci. Technol*, 4(1), 694-708. <https://doi.org/10.32530/jaast.v4i1.130>

BUTLER, Mark S.; BUSS, Antony D. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics?. *Biochemical pharmacology*, v. 71, n. 7, p. 919-929, 2006.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 18, p. 373-382, 2016.

CAVALCANTE, Jerffeson Araujo et al. Morfologia de sementes e plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam) Moringaceae. *Magistra*, v. 29, n. 3/4, p. 290-297, 2017.

CHOI, Jun-Hui et al. Novel protease from the leaves of edible medicinal plant *Aster koraiensis* Nakai with antithrombotic activity: Purification and partial characterization. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. e12334, 2017.

CHUANG, Ping-Hsien et al. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource technology**, v. 98, n. 1, p. 232-236, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th Edition, CLSI guideline M27. 2017

_____. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th Edition, CLSI guideline M07. 2018

COPPIN, Julia P. et al. Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1892-1899, 2013.

CORIOLOANO, M. C. et al. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 198-205, 2020.

COZ-BOLAÑOS, X. et al. Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator in vitro. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 95-101, 2018.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.

DAYAL, Bishambar et al. Breaking up of biofilms with *Moringa oleifera*: insights into mechanisms. In: *Advances in Applied Nanotechnology for Agriculture*. **American Chemical Society**, 2013. p. 177-191.

DAYANAND, C. D. Evaluation of comparative total proteolytic activity in plant lattices. **Int J Life Sci Biotechnol Pharm Res**, v. 2, p. 47-55, 2013.

MELO, Danielle Brandão et al. Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 40919-40937, 2021.

- OLIVEIRA, Alisson Macário et al. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L.(Moraceae) in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 162-168, 2016.
- DJANDE, CY Hamany et al. Differential extraction of phytochemicals from the multipurpose tree, *Moringa oleifera*, using green extraction solvents. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 81-89, 2018.
- DONGMO, N. A. et al. In-vitro testing of extracts and fractions from two Cameroonian medicinal plants on bacteria gastroenteritis. **Am. J. Phytomed. Clin. Ther**, v. 3, n. 9, p. 575-588, 2015.
- DORNELLES, Leonardo Prezzi et al. Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides. **Food chemistry**, v. 245, p. 1169-1175, 2018.
- DOWLING, Aideen; O'DWYER, Jean; ADLEY, C. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. **Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs**, v. 1, p. 536-545, 2017.
- DZUVOR, Christian KO et al. Bioactive components from *Moringa oleifera* seeds: production, functionalities and applications—a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 271-293, 2022.
- EFENBERGER-SZMECHTYK, Magdalena; NOWAK, Agnieszka; CZYZOWSKA, Agata. Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 61, n. 1, p. 149-178, 2021.
- EGOROV, A. M; ULYASHOVA, M; RUBTSOVA, M. Y. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. **Acta Naturae**, v. 10, n. 4, p. 33 – 48, 2018.
- EILERT, U.; WOLTERS, B.; NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. **Planta medica**, v. 42, n. 05, p. 55-61, 1981.
- ELGAMILY, Hanaa et al. Microbiological assessment of *Moringa oleifera* extracts and its incorporation in novel dental remedies against some oral pathogens. **Open access Macedonian journal of medical sciences**, v. 4, n. 4, p. 585, 2016.
- ENERIJIOFI, Kingsley Erhons; AKAPO, Funmilayo Hannah; ERHABOR, Joseph Omorogiuwa. GC–MS analysis and antibacterial activities of *Moringa oleifera* leaf extracts on selected clinical bacterial isolates. **Bulletin of the national research centre**, v. 45, p. 1-10, 2021
- FADIATAUFIK, M. et al. Antibacterial activities of *Moringa oleifera* leaf extract on some human pathogenic bacteria. **Saudi J. Med. Pharm. Sci**, v. 7, p. 426-431, 2021.
- FONTANA, Riccardo et al. Effects of Flavonoids and Phenols from *Moringa oleifera* Leaf Extracts on Biofilm Processes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Plants**, v. 12, n. 7, p. 1508, 2023.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Centro de Informação Científica eTecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico. Brasil, 2016.
- _____. Centro de Informação Científica eTecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico. Brasil, 2023

- GIFONI, Juliana M. et al. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, p. 406-415, 2012.
- GONÇALVES, Rodrigo Noll et al. Plantas medicinais na atenção primária à saúde: riscos, toxicidade e potencial para interação medicamentosa. **Revista de APS**, v. 25, n. 1, 2022.
- GUALBERTO, André Ferrari et al. Características, propriedades e potencialidades da moringa, *Moringa oleifera* Lam.: aspectos agroecológicos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 9, n. 5, p. 4, 2014.
- HAMMI, K.M., ESSID, R., TABBENE, O., ELKAHOUI, S., MAJDOUB, H., KSOURI, R. Antileishmanial activity of *Moringa oleifera* leaf extracts and potential synergy with amphotericin **B. S. Afr. J. Bot.**, 129, 67-73. 2020
- 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.
- HOODA, Himani; SINGH, Priyanka; BAJPAI, Surabhi. Effect of quercetin impregnated silver nanoparticle on growth of some clinical pathogens. **Materials Today: Proceedings**, v. 31, p. 625-630, 2020.
- ILANKO, Pavithra et al. Interactive antibacterial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts and conventional antibiotics against bacterial triggers of some autoimmune inflammatory diseases. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 420-435, 2019.
- INGRAGAM, J.L.; INGRAHAM, C. A. *Introdução à Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- JOSHI, P., MEHTA, D., 2010. Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. *J. Metabolomics Syst. Biol.*, 1(1), 5-9. <https://doi.org/10.24154/jhs.v17i1.1292>.
- KASHYAP, P., KUMAR, S., RIAR, C. S., JINDAL, N., BANIWAL, P., GUINÉ, R. P., KUMAR, H. Recent advances in Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves bioactive compounds: Composition, health benefits, bioaccessibility, and dietary applications. *Antioxidants*, 11(2), 402. 2022
- KUMAR, Akhilesh et al. Traditional uses of medicinal plants for dermatological healthcare management practices by the Tharu tribal community of Uttar Pradesh, India. **Genetic resources and crop evolution**, v. 60, p. 203-224, 2013.
- LIN, Mengfei; ZHANG, Junjie; CHEN, Xiaoyang. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. **Journal of functional foods**, v. 47, p. 469-479, 2018.
- LIU, Rong et al. *Moringa oleifera*: a systematic review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 296-320, 2022.
- LOPES, Tiago Deiveson Pereira et al. Mo-CBP4, a purified chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a potent antidermatophytic protein: In vitro mechanisms of action, in vivo effect against infection, and clinical application as a hydrogel for skin infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 432-442, 2020.
- MANDAL, A. B. et al. Effect of dietary *Moringa oleifera* leaves powder on growth performance, blood chemistry, meat quality and gut microflora of broiler chicks. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 14, n. 2, p. 349-357, 2014.
- MARTINS, N. et al. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1167-1176, 2012.

MATIAS, Francisco Douglas Oliveira et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DA PLANTA MORINGA OLEIFERA: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 4, n. 3, p. 252-257, 2023.

MBIKAY, Majambu. Therapeutic potential of Moringa oleifera leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 24, 2012.

Mehwish, H.M., Riaz Rajoka, M.S., Xiong, Y., Zheng, K., Xiao, H., Anjin, T., He, Z., 2022. Moringa oleifera—a functional food and its potential immunomodulatory effects. **Food Rev. Int.**, 38(7), 1533-1552. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1825479>

NDHLALA, Ashwell R. et al. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen Moringa oleifera Lam. cultivars. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10480-10494, 2014.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**. v.25, n 2, p.327-329, 2002.

NESSE, Live L. et al. Evolution of antimicrobial resistance in E. coli biofilm treated with high doses of ciprofloxacin. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1246895, 2023.

NIJU, S.; BALAJI, M.; ANUSHYA, C. A comprehensive review on biodiesel production using Moringa oleifera oil. **International Journal of Green Energy**, v. 16, n. 9, p. 702-715, 2019.

NUGRAHA, Alexander Patera et al. Phytochemical, antioxidant, and antibacterial activity of Moringa oleifera nanosuspension against peri-implantitis bacteria: An in vitro study. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 13, n. 6, p. 720-726, 2023.

OLIVEIRA, Sonia Mariza Luiz et al. Composição química, atividade biológica e segurança de uso da Moringa oleifera Lam. Moringaceae. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 4, n. 3, p. E1612022-15, 2022.

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

OMOTOSO, G.O., GBADAMOSI, I.T., OLAJIDE, O.J., DADA-HABEEB, S.O., AROGUNDADE, T.T., YAWSON, E.OMoringa oleifera phytochemicals protect the brain against experimental nicotine-induced neurobehavioral disturbances and cerebellar degeneration. *Pathophysiology*, 25(1), 57-62, 2018.

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

PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, HJSAJOB. An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of Moringa oleifera. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 304-316, 2020.

PAIXÃO, Rebecca Manesco et al. Water decontamination containing nitrate using biosorption with Moringa oleifera in dynamic mode. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 21544-21554, 2018.

PEIXOTO, Jackson Rafael Oliveira et al. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, n. 3, p. 201-204, 2011.

RAJ, Anitha Jabamalai et al. Antimicrobial activity of Moringa oleifera (Lam.) root extract. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 5, p. 1426-1427, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Experimental Design and Process Optimization. 1. ed. [S. l.]: CRC Press, 2014.

ROLIM, Lucíola ADMM et al. Genotoxicity evaluation of Moringa oleifera seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. T53-T58, 2011.

ROYANI, Ahmad et al. The total phenolic and flavonoid contents of Aloe vera and Morinda citrifolia extracts as antibacterial material against Pseudomonas aeruginosa. **Materials Today: Proceedings**, v. 72, p. 2796-2802, 2023.

SALEEM, Ammara et al. HPLC analysis, cytotoxicity, and safety study of Moringa oleifera Lam.(wild type) leaf extract. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. e13400, 2020.

SANTOS, L. M. M. et al. Anti-Candida activity of the water-soluble lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL). **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 2, p. 101074, 2021.

SENIGALIA, Ritielly Laiany Carvalho et al. Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020.

SHIH, Ming-Chih et al. Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of Moringa oleifera. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 9, p. 6077-6088, 2011.

SILVA NETO, João Xavier et al. Role of membrane sterol and redox system in the anti-candida activity reported for Mo-CBP2, a protein from Moringa oleifera seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 814-824, 2020.

SILVA, Erika Matias et al. Planejamento fatorial no estudo da fitotoxicidade de extratos de plantas em sementes de alface. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 2, p. 2437-2458, 2021.

SILVA, Livia Lais et al. Effects of a solid formulation containing lectin-rich fraction of Moringa oleifera seeds on egg hatching and development of Aedes aegypti larvae. **Acta Tropica**, v. 214, p. 105789, 2021.

SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1102-1108, 2010.

SINGH, Yashvir et al. Effect of SiC nanoparticles concentration on novel feedstock Moringa Oleifera chemically treated with neopentylglycol and their trobological behavior. **Fuel**, v. 280, p. 118630, 2020.

SURESH, S., SISODIA, S.S. Phytochemical and Pharmacological Aspects of Cucurbita moschata and Moringa oleifera. *J. Pharm. Biosci.*, 45-53, 2018.

TAMBE, Bhavana Dnyandeo; PEDHEKAR, Pratiksha; HARSHALI, Pardeshi. Phytochemical screening and antibacterial activity of Syzygium cumini (L.)(Myrtaceae) leaves extracts. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 9, n. 5, p. 50-54, 2021.

TAVARES-CARREON, Faviola et al. Serratia marcescens antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. **PeerJ**, v. 11, p. e14399, 2023.

VATS, S., GUPTA, T. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of Moringa oleifera Lam. from Rajasthan, India. *Physiol Mol Biol Plants* 23, 239–248. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0407-6>, 2017.

VONGSAK, Boonyadist et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

WHO – World Health Organization. **Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2024**. Geneva: World Health Organization, 2024.

WINK, Michael. **Annual plant reviews, functions and biotechnology of plant secondary metabolites**. John Wiley & Sons, 2010.

XIAO, Xiao et al. *Moringa oleifera* Lam and its therapeutic effects in immune disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 566783, 2020.

XU, Yong-Bing; CHEN, Gui-Lin; GUO, Ming-Quan. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 296, 2019.

ZHANG, Min et al. Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* and *Murraya koenigii* leaves. **J. Med. Plants Res**, v. 5, n. 30, p. 6672-6680, 2011.

ZHOU, Ning et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 4775-4783, 2012.