

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 16 (1)

January 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/16120231731>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1731>



Avaliação do efeito biológico de *Moringa oleifera* Lam. *in vivo*

Evaluation of the biological effect of *Moringa oleifera* Lam. *in vivo*

Wemerson Aparecido da Silva Ferreira

Universidade Federal do Mato Grosso – Câmpus Universitário de Sinop

Erica Gabriele da Silva Pereira

Universidade Federal do Mato Grosso – Câmpus Universitário de Sinop

Danilo Henrique Aguiar

Universidade Federal do Mato Grosso – Câmpus Universitário de Sinop

Angellica Fernandes de Oliveira

Universidade Federal do Mato Grosso – Câmpus Universitário de Sinop

Corresponding author

Marina Mariko Sugui

Universidade Federal do Mato Grosso – Câmpus Universitário de Sinop

marina.sugui@ufmt.br

Resumo. A *Moringa oleifera* Lam. pertence à família Moringaceae, conhecida popularmente no Brasil como “moringa”, “lírio branco” ou “quiabo-de-quina”, possui inúmeros benefícios para a saúde, incluindo propriedades nutricionais e medicinais. O estudo proposto teve como objetivo avaliar as atividades mutagênica/antimutagênica e citotóxica do extrato aquoso de *M. oleifera* contra danos induzidos ao DNA pelo N-etil-N-nitrosurêia (ENU) em células de medula óssea de camundongos machos *Swiss*, através do teste do micronúcleo e a viabilidade celular em culturas de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), respectivamente. Foram utilizados 8 animais/grupo, que receberam durante 15 dias consecutivos o tratamento, via gavagem, com extrato aquoso de *M. oleifera*. No 15º dia, os animais receberam tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou ENU (50 mg/Kg), sendo sacrificados 24 horas após o tratamento para avaliação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs). Para a avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das células CHO foi utilizado o ensaio de exclusão com azul de tripan para as concentrações de 5000, 2500, 1000, 200, 100 e 50 µg/mL do extrato de *M. oleifera*. Os resultados obtidos mostram que o pré-tratamento com o extrato aquoso de *M. oleifera*, sob as condições testadas, reduziu significativamente ($p \leq 0,01$) a frequência de MNPCEs induzidos pelo ENU quando comparado com o grupo controle positivo, apresentando efeito antimutagênico. Não foi observado efeito mutagênico no grupo tratado somente com o extrato aquoso de *M. oleifera*. O teste de viabilidade celular pelo azul de tripan mostrou células viáveis somente nas concentrações testadas de 100 µg/mL (85,6%) e 50 µg/mL (95,5%). Neste contexto, o efeito antimutagênico apresentado pelo extrato aquoso de *M. oleifera* pode ser o resultado de uma ação sinérgica entre os diversos constituintes da planta e sua ação citotóxica depende da concentração utilizada. Nas condições realizadas, o estudo sugere que o extrato aquoso de *M. oleifera* não tem ação citotóxica em baixas concentrações e possui um efeito quimioprotetor para o câncer.

Palavras-chaves: *Moringa oleifera*, quimioprevenção, câncer.

Abstract. *Moringa oleifera* Lam. belongs to the Moringaceae family, popularly known in Brazil as "moringa", "lírio branco" or "quiabo-de-quina", has numerous health benefits, including nutritional and medicinal properties. The study aimed to evaluate the mutagenic/antimutagenic and cytotoxic activities of the aqueous extract of *M. oleifera* against damage induced to DNA by N-ethyl-N-nitrosurea (ENU) in bone marrow cells of male *Swiss* mice, through of the micronucleus test and cell viability in Chinese Hamster Ovary (CHO) cell cultures, respectively. Eight animals/group were used, which received for 15 consecutive days the treatment, via gavage, with aqueous extract of *M. oleifera*. On the 15th day, the animals received intraperitoneal treatment with 0.9% NaCl or ENU (50 mg/Kg), being sacrificed 24 hours after treatment to evaluate the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs). For the evaluation of

cytotoxic activity *in vitro* of CHO cells, the trypan blue exclusion assay was used for the concentrations of 5000, 2500, 1000, 200, 100 and 50 µg/mL of the extract of *M. oleifera*. The results obtained show that the pretreatment with the aqueous extract of the *M. oleifera*, under the conditions tested, significantly reduced ($p \leq 0.01$) the frequency of MNPCEs induced by ENU when compared with the positive control group, presenting antimutagenic effect. There was no mutagenic effect in the group treated only with the aqueous extract of *M. oleifera*. The cell viability test by trypan blue showed viable cells only at the tested concentrations of 100 µg mL (85.6%) and 50 µg mL (95.5%). In this context, the antimutagenic effect presented by the aqueous extract of *M. oleifera* may be the result of a synergistic action between the various constituents of the plant and its cytotoxic action depends on the concentration used. Under the conditions carried out, the study suggests that the aqueous extract of *M. oleifera* has no cytotoxic action at low concentrations and has a chemoprotective effect for cancer.

Keywords: *Moringa oleifera*, chemoprevention, cancer.

Introdução

A genotoxicidade se situa na interface entre a toxicologia e a genética, por isto frequentemente denominada de genética toxicológica. Esta visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja na sua estrutura físico-química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético em níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (SILVA et al. 2003, SILVA et al. 2007).

O estudo do dano do DNA ao nível do cromossomo é uma parte essencial da toxicologia genética, porque a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese. O ensaio de micronúcleo é um dos métodos preferidos para avaliar o dano cromossômico porque permite que a perda cromossômica e a quebra cromossômica sejam medidas de forma confiável, uma vez que os micronúcleos só podem ser expressos em células que completam a divisão nuclear (FENECH, 2000).

Na natureza, as plantas produzem uma grande variedade de substâncias químicas que podem apresentar diversas atividades biológicas e, atualmente, constituem um recurso terapêutico relevante para uma parcela significativa da população mundial que não tem acesso aos medicamentos industrializados (TÔRRES et al., 2005). No entanto, a utilização de plantas na terapêutica e na alimentação deve ser restrita as plantas conhecidas e/ou corretamente identificadas (COLOMBO et al., 2010), devido a toxicidade de algumas espécies vegetais que podem provocar intoxicações e riscos à saúde.

A *Moringa oleifera* Lam. é um espécime da família Moringaceae, um gênero único com 13 espécies conhecidas, originária da Índia e comum no nordeste do continente africano. É uma árvore de médio porte que pode atingir cerca de 10 metros de altura. Possui diversas aplicações em muitos países, nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas (ALMEIDA, 2010; KHAWAJA et al., 2010). No continente africano existem vários relatos da utilização da *M. oleifera* no combate à desnutrição devido à sua alta concentração de nutrientes (BELLOSTAS et al., 2010).

No Brasil, a *M. oleifera* foi introduzida como planta ornamental por volta de 1950 (MATOS, 2002) e desde então, tem sido amplamente

cultivada devido ao seu alto valor nutricional, principalmente das folhas, ricas em caroteno, ácido ascórbico e ferro (BEZERRA et al., 2004; MAKKAR; BECKER, 1996). Um fator importante que explica o uso medicinal de *M. oleifera* é a sua ampla gama de antioxidantes e nutrientes, incluindo vitaminas e minerais. Quase todas as partes de *M. oleifera* podem ser usadas como fonte de nutrição com outros valores significativos (ABDULL, 2014).

Apesar dos benefícios para a saúde foi publicado no dia 3 de junho de 2019 pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), uma medida cautelar, a Resolução (RE) Nº 1.478 que se refere da proibição da comercialização, distribuição, fabricação, importação e propaganda de alimentos, que possuem em sua composição *M. oleifera*, uma medida atribuída devido ao comércio irregular e a falta da validação e comprovação de segurança.

Com base nesta realidade, verifica-se a relevância e torna-se indispensável o desenvolvimento de pesquisas visando à investigação de plantas medicinais, por meio de estudos químicos/farmacológicos, da atuação dos princípios ativos responsáveis pela ação terapêutica e toxicológica relatada em estudos etnofarmacológicos (ELISABETSKY, 2001).

Neste contexto, em vista dos efeitos terapêuticos da *M. oleifera* relatadas na literatura e ausência de estudos genotóxicos, o presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos biológicos na proteção de danos induzidos ao DNA através de ensaio de genotoxicidade *in vivo*, assim como o potencial tóxico *in vitro*.

Materiais e Métodos

Sistema teste

In vivo: Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com 6 semanas de idade, peso médio de 25g, obtidos do Biotério Central da UFMT/Cuiabá. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no Biotério do NUPADS/UFMT/Sinop, sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa (55 ± 10%), ciclo de luz (12 horas claro/escuro), exaustão e recebendo ração comercial peletizada e água filtrada *ad libitum*. O período de aclimação foi de 2 semanas e nessa fase os animais passaram por inspeção diária de viabilidade.

In vitro: Células de ovário de hamster chinês (CHO) com ciclo de 12 horas, foram cultivadas em meio Ham's F10 (Cultilab, Campinas – SP, Brasil), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e antibióticos (0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,06 mg/mL de penicilina) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ (SALVADORI et al., 1994).

Agente químico

A substância utilizada foi N-etil-N-nitrosurêia (ENU), marca Sigma (EUA). A dose utilizada seguiu protocolo de Sugui (2006).

Moringa oleifera Lam.

O vegetal em pó foi adquirido em um centro comercial, especializado em venda de produtos naturais, no município de Sinop/MT. O extrato aquoso foi obtido utilizando-se 10 g do pó adicionado em 150 mL de água filtrada aquecida a 100 °C, baseada em Baldisserotto et al. (2018), com algumas modificações. Em seguida foi armazenado congelado e descongelado em banho-maria, no momento do uso.

Teste do micronúcleo *in vivo*

A obtenção e preparo das lâminas de eritrócitos de medula óssea para avaliação da frequência de micronúcleo (MN) seguiram a metodologia proposta por MacGregor et al., (1987). Para cada animal foram realizados esfregaços em duplicata e corados para a diferenciação dos eritrócitos policromáticos (PCE) dos eritrócitos normocromáticos (NCE). Foram analisadas 1000 células por animal em microscópio de luz, com aumento de 1000 vezes (imersão). O material foi analisado em teste cego e as lâminas foram decodificadas ao final das análises.

Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos com 8 animais cada, distribuídos da seguinte maneira:

Grupo 1: Controle negativo. Os animais foram tratados com água, via gavagem, durante todo período experimental. No 15º dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal, com NaCl 0,9% (0,1 mL/10g p.c.) e sacrificados 24 horas após o tratamento para obtenção de células de medula óssea.

Grupo 2: Controle positivo. Os animais foram tratados com água, via gavagem, durante todo período experimental. No 15º dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal, com ENU (50 mg/Kg p.c.) e sacrificados 24 horas após o tratamento para obtenção de células de medula óssea.

Grupo 3: Os animais foram tratados com extrato aquoso de *M. oleifera* (0,3 mL/dia), via gavagem, durante todo período experimental. No 15º dia os animais receberam tratamento intraperitoneal com ENU (50 mg/Kg p.c.) e sacrificados 24 horas após o

tratamento para obtenção de células da medula óssea.

Grupo 4: Os animais foram tratados com extrato aquoso de *M. oleifera* (0,3 mL/dia), via gavagem, durante todo período experimental. No 15º dia os animais receberam tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (0,1 mL/10g p.c.) e sacrificados 24 horas após o tratamento para obtenção de células da medula óssea.

Análise Histológica

Previamente ao início de cada coleta dos tecidos, os animais foram eutanasiados e em seguida foram retirados os fragmentos e fixados em formaldeído tamponado 10% para posterior processamento. Inicialmente, os fragmentos de amostras foram lavados com água destilada e imersos em álcool 70% por 24 horas. Depois seguiu a desidratação das amostras, com banhos crescentes de álcool 80%, por 2 horas, e em seguida, álcool 95% por 4 horas, sendo feitas 2 trocas do álcool a cada concentração. Em seguida, as amostras foram imersas na mistura de resina plástica mais álcool 95% por 6 horas, e posteriormente, imersas em resina pura de infiltração por 48 horas. Finalmente, as amostras foram embebidas na historresina utilizando-se um endurecedor na solução da resina e as mesmas foram incluídas em histomoldes de plástico até o seu completo endurecimento. Então, após algumas horas, o fragmento foi retirado do molde e embocado com cola plástica em bloco de madeira devidamente identificado.

Na etapa de microtomia foi utilizado o aparelho micrótomo rotativo semi-automático da marca Leica modelo 2245 com a função de seccionar o material embocado em secções transversais de 3 µm, cortadas em navalhas de vidro e coletadas em lâminas. As fatias do tecido obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para um recipiente com água e em seguida recolhidas a uma lâmina histológica devidamente identificada. Finalmente, as lâminas histológicas foram colocadas em uma estufa para se retirar a umidade por 24 horas até o início do processo de coloração.

Para a coloração HE as lâminas foram imersas em água e depois em uma cuba contendo a hematoxilina por 20 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente para se retirar o excesso de corante e logo depois imersas na eosina por 10 minutos. O excesso de corante foi retirado com água corrente e as lâminas foram desidratadas com banhos crescentes de álcool (80%, 95% e 100%, respectivamente), diafanizadas com xilol e montadas em permanente. Os cortes histológicos foram utilizados na análise e processamento de imagem, utilizando-se um sistema de análise modelo Moticam 2.0. As imagens foram fotografadas e processadas para a caracterização histológica dos tecidos.

Teste de citotoxicidade

O efeito citotóxico do extrato da *M. oleifera* foi avaliado pelo teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripan de acordo com Sugui (2006). Foram plaqueadas $0,25 \times 10^6$ /mL células de CHO por concentração testada (5000, 2500, 1000, 200, 100 e 50 µg/mL). O extrato aquoso da *M. oleifera* foi incubado por 3 horas com células CHO a 5% de CO₂, 37 °C. Foram adicionados 30 µL de cada suspensão celular com 30 µL do corante azul de tripan e a quantificação das células foram realizadas em câmara de Neubauer usando um contador manual e um microscópio óptico. As células não viáveis coram-se de azul e o teste foi feito em triplicata, considerando a viabilidade mínima de 70%.

Análise estatística

A frequência de células micronucleadas nos diferentes grupos experimentais foi comparada pelo teste qui-quadrado (PEREIRA, 1991). A porcentagem de redução na frequência de MN foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Water et al. (1990), através da fórmula:

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{MN em A} - \text{MN em B}}{\text{MN em A} - \text{MN em C}} \times 100$$

Onde A= grupo tratado com ENU (controle positivo); B= grupo tratado com *M. oleifera* mais ENU e C= grupo tratado com NaCl 0,9% (controle negativo)

Princípios Éticos

Essa pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/UFMT) e foi aprovada dentro dos princípios éticos e da legislação vigente, sob o número de protocolo 23108.920651/2017-71.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta o efeito da *M. oleifera* sobre danos no DNA, induzidos quimicamente pelo composto N-etil-N-nitrosuréia (ENU, 50 mg/Kg p.c.), em camundongos pré-tratados com o extrato aquoso de *M. oleifera*. Os resultados mostram que o grupo tratado com o extrato aquoso da *M. oleifera* e ENU apresentou redução na frequência de PCEMNs em relação ao grupo controle positivo. O grupo tratado somente com o extrato aquoso não apresentou aumento significativo de PCEMNs em relação ao grupo controle negativo.

Os resultados sugerem que o grupo tratado com o extrato aquoso de *M. oleifera* possui ação quimioprotetora contra os danos induzidos pelo ENU, com a possibilidade de produzir benefícios relacionados à prevenção contra danos ao DNA, como um agente antimutagênico. Assim, a capacidade do extrato proteger o organismo e células contra danos ao DNA, associado ao câncer e doenças degenerativas, tem sido relatada em vários estudos (SIDKER et al. 2013).

Tabela 1- Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos, após pré-tratamento com extrato aquoso de *M. oleifera* e ENU.

Tratamentos	Número de células analisadas	MNPCEs		% de Redução
		No.	%	
Água + NaCl 0,9% ^a	8.000	298	3,7	
Água + ENU (50 mg/Kg) ^b	8.000	608	7,6	
<i>Moringa oleifera</i> + ENU (50 mg/Kg)	8.000	502*	6,3	34,2*
<i>Moringa oleifera</i> + NaCl 0,9%	8.000	331	4,1	

^a Controle negativo; ^b Controle positivo; * p < 0,01. Teste do qui-quadrado

Promkum et al. (2010) verificaram o potencial anticlastogênico de *M. oleifera* através do ensaio do micronúcleo em reticulócitos de camundongos contra danos induzidos pela mitomicina C e também não observaram efeito clastogênico. Resultados semelhantes foram registrados no estudo de Sathya et al. (2010) onde demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *M. oleifera* proporcionaram proteção contra danos induzidos ao DNA pela ciclofosfamida em células de medula óssea (teste do micronúcleo) e em tecido hepático de camundongos através do ensaio cometa.

Em 2010, Purwal et al. relataram atividade dos efeitos *in vivo*, da administração oral de extratos metanólicos e hidrometanólicos de folhas de *M. oleifera* em modelo de tumor de melanoma murino. Os autores observaram que uma

administração oral de 500 mg/Kg durante 15 dias dos extratos determinou um atraso no crescimento dos tumores e um aumento significativo da vida útil de 48% e 32% para os extratos metanólicos e hidrometanólicos, respectivamente.

Jung et al. (2015), utilizando o extrato da folha da *M. oleifera* como um potencial anticancerígeno, observaram a inibição do crescimento das células tumorais, redução do nível de espécies reativas de oxigênio interno em células de câncer de pulmão, bem como em vários outros tipos de células cancerosas, desta forma sugerindo que o tratamento com *M. oleifera* reduz significativamente a invasão e a proliferação de células cancerígenas.

Os efeitos quimiopreventivos de *M. oleifera* podem ser atribuídos a alguns componentes específicos tais como 4-(a-L-ramnopiranosiloxi)

benzil glucosinolato, 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) benzil isotiocianato, isotiocianato de benzilo e niazimicina (ABDULL, 2014). As folhas contêm quercetina-3-O-glicosídeo e campferol 3-O-glicosídeo, que desempenha um papel na defesa antioxidante, como catadores de radicais livres, reduzindo assim o estresse oxidativo (AMAGLO et al., 2010; GOYAL et al., 2007). Os tiocarbamatos, como a niazimicina, são encontrados nas folhas e podem ser usados como agentes quimiopreventivos (ANWAR et al., 2007; GUEVARA et al., 1999).

Os resultados da atividade citotóxica *in vitro* estão apresentadas na Figura 1, onde apresenta a viabilidade celular sobre as células de CHO, sendo

possível observar que nas concentrações mais altas do extrato aquoso de *M. oleifera* houve uma porcentagem de 100% de morte celular em células CHO quando comparado com controle negativo. Somente a partir das concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do extrato observou-se viabilidade celular acima de 70% em CHO. Estes resultados mostram que nas concentrações mais altas utilizadas, o extrato de *M. oleifera* foi citotóxico, e que há possibilidade de proliferação celular das células CHO quando em exposição às baixas concentrações do extrato, nas condições testadas.

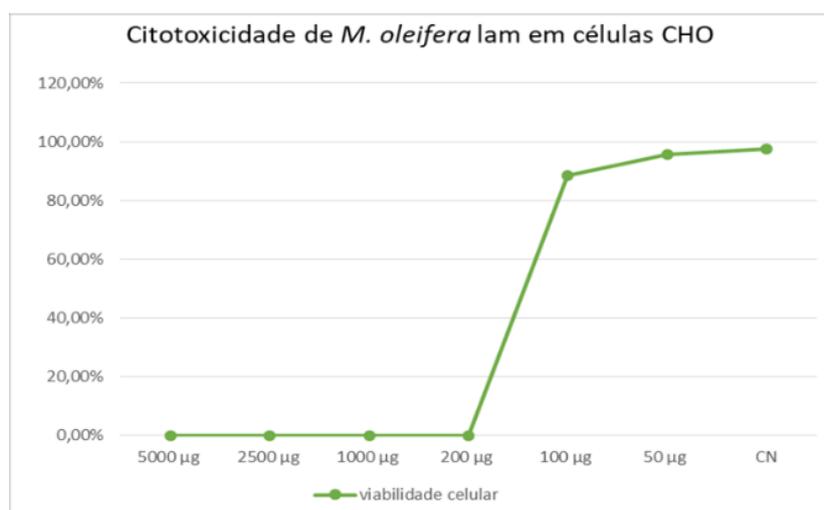


Figura 1 – Viabilidade celular de células CHO tratadas com extrato aquoso de *Moringa oleifera* comparadas ao controle negativo.

Poucos estudos mostram o efeito do extrato *M. oleifera* como agente anticâncer, sendo que a maioria deles avaliaram sua eficácia em relação à atividade supressora de tumores. Jung et al. (2015), realizaram a análise citotóxica em células tumorais de fígado (HepG₂) tratadas com diferentes concentrações de extrato *M. oleifera* (0-200 $\mu\text{g/mL}$) por 2 dias em ensaio MTT, observando que a proliferação celular foi significativamente inibida de uma maneira dependente da concentração pelo extrato *M. oleifera* ($p < 0,05$), e o tratamento com 200 $\mu\text{g/mL}$ de extrato *M. oleifera* produziu razões de inibição de até 80%.

Nair e Varalakshmi (2011), testaram o potencial anticancerígeno e citotóxico dos extratos de água quente, metanol e hexano da folha de *M. oleifera* em células de câncer cervical (linhagem celular HeLa) e linfócitos normais. Os resultados do ensaio de MTT mostraram que o extrato de folha aquosa causou uma diminuição dependente da dose na viabilidade celular de HeLa (IC_{50} : 70 $\mu\text{g/mL}$). Em contraste, os extratos metanólico e hexanos de folhas causaram um aumento na viabilidade das células HeLa em concentrações mais altas. O ensaio de exclusão do corante azul tripan foi realizado para o extrato aquoso da folha para verificar os resultados do ensaio MTT, nas

concentrações entre 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados deste estudo também mostraram uma diminuição dependente da dose na viabilidade celular para o extrato aquoso de folha.

Em outro estudo, Sreelatha e Padma (2011) exploraram o efeito modulatório dos extratos de folhas de *M. oleifera* contra a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e danos oxidativos na linha celular KB derivada de HeLa. A avaliação de citotoxicidade de H_2O_2 na presença e ausência de extratos de folhas de *M. oleifera* em células tumorais de KB pelo MTT mostrou que o H_2O_2 causou uma diminuição acentuada na viabilidade das células de KB e, à medida que a concentração dos extratos de folhas aumentavam, a viabilidade das células KB estabilizava. Eles também compararam a atividade entre extratos de folhas tenras e maduras extraídas com água quente e a composição fenólica usando cromatografia de camada fina de alto desempenho, identificaram quercetina e kaempferol como os principais compostos fenólicos presentes. Os extratos foliares maduros foram ligeiramente melhores na modulação dos efeitos do H_2O_2 em comparação com os extratos foliares tenros, indicando que o extrato de folha de *M. oleifera* é um bom

antioxidante, uma vez que remove H_2O_2 e aumenta a viabilidade das células KB expostas a H_2O_2 .

Por outro lado, também foram avaliados possíveis efeitos tóxicos do extrato aquoso de *M. oleifera*, durante o período experimental, através de mudança comportamental dos animais em relação ao consumo de ração e peso. Na Tabela 2 observamos que o consumo de ração e o ganho de

peso em todos os grupos tratados tiveram uma evolução considerada normal de acordo com Neves et al. (2013), bem como a quantidade de *M. oleifera* individualmente ingerida diariamente pelos animais que mostrou não apresentar toxicidade para os animais durante o período experimental.

Tabela 2 - Consumo médio de ração e peso corpóreo dos camundongos após pré-tratamento por 15 dias com o extrato aquoso de *Moringa oleifera*.

Tratamento	Nº de animais	Consumo de ração (g/dia/animal) X ± SD	Peso corpóreo (g) X ± SD	<i>Moringa oleifera</i> (mg/animal/dia)
Água + NaCl 0,9% ^a	8	44,70 ± 4,20	38,37 ± 1,80	-
Água + ENU (50mg/Kg) ^b	8	48,30 ± 5,93	38,25 ± 2,49	-
<i>Moringa oleifera</i> + ENU (50 mg/Kg)	8	49,90 ± 5,70	39,50 ± 2,44	0,18
<i>Moringa oleifera</i> + NaCl 0,9%	8	48,61 ± 9,72	38,75 ± 3,11	0,18

^aControle negativo; ^bControle positivo; X (Média); SD (Desvio padrão). Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

Na observação das imagens histológicas realizadas constatou-se que o grupo G1 (controle negativo) apresentou um padrão tecidual normal, sem alterações e com hepatócitos típicos dispostos em cordões, de tintura citoplasmática clássica acidófila e núcleo heterocromático central (Figura 2). No grupo G2 (controle positivo), não houve alteração tecidual, apesar da toxicidade da substância ENU administrada nos animais. Provavelmente, a ação mutagênica da droga ENU tenha tido efeito em outros níveis da atividade celular, não sendo possível constatar morfologicamente. Uma outra possibilidade, seria o tempo, talvez insuficiente, para alterar o padrão histológico dos hepatócitos. No que diz respeito à

vascularização do tecido hepático, não foram observadas alterações na estrutura dos vasos e a estrutura nuclear do hepatócito, a despeito do efeito mutagênico da substância (Figura 3).

No grupo G3 (*M. oleifera* + ENU), esperava-se observar o efeito hepatoprotetor do extrato da *M. oleifera*, porém o efeito mutagênico do ENU não provocou alterações na morfologia dos hepatócitos e no tecido conjuntivo ao redor. No entanto, vale ressaltar que o extrato aquoso da planta não provocou alterações na morfologia hepática (Figura 4). Em conformidade com o G3, o grupo G4 (*M. oleifera*) não mostrou alteração morfológica com a administração única do extrato de *M. oleifera* (Figura 5).

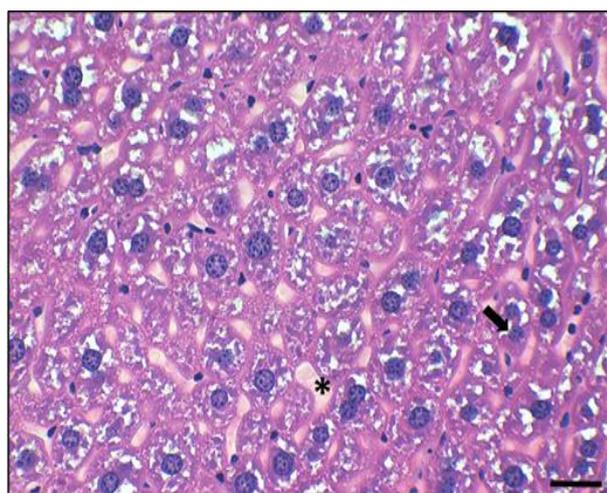


Figura 2- Fotomicrografia em corte longitudinal de fígado de camundongo do grupo G1. Observam-se hepatócitos com gotículas de gordura (seta) no citoplasma. Capilares sinusóides ao redor das células (asterisco). HE. Barra=50 µm.

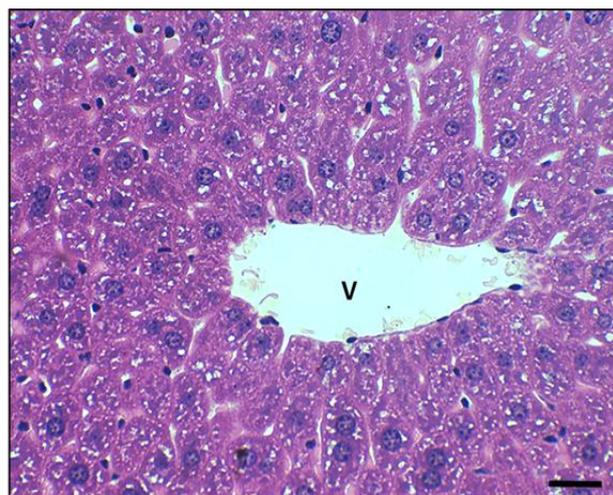


Figura 3- Fotomicrografia em corte longitudinal de fígado de camundongo do grupo G2. Observa-se a disposição radial dos hepatócitos ao redor da veia centrolobular (V). HE. Barra=50 µm.

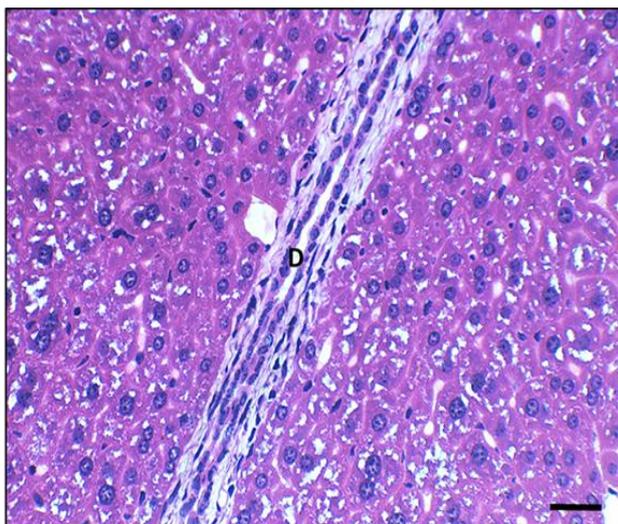


Figura 4- Fotomicrografia em corte longitudinal de fígado de camundongo do grupo G3. Observam-se os hepatócitos em padrão normal. No centro da imagem um ducto biliar em corte longitudinal (D). HE. Barra=50 µm.

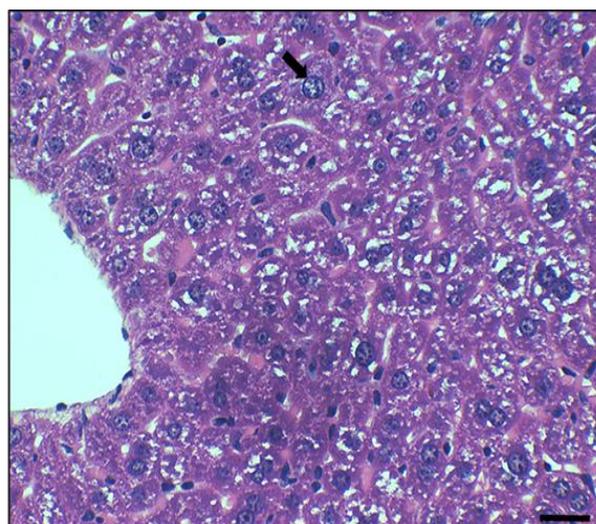


Figura 5- Fotomicrografia em corte longitudinal de fígado de camundongo do grupo G4. Observam-se os hepatócitos em padrão normal. Núcleo central heterocromático saudável (seta). HE. Barra=50 µm.

Observou-se, em todos os grupos, material citoplasmático estocado, inclusive gotículas de gordura, possivelmente sendo esta uma característica do estado hepático normal dos animais (Figura 2). Contudo, devido ao estado hepático prévio dos animais utilizados para a realização do presente estudo, não foi possível constatar a ação hepatoprotetora contra acúmulo de lipídios. Nossos achados histológicos estão de acordo com Awodele et al. (2012) que observaram que a *M. oleifera* não causa danos ao tecido hepático.

Assim, os resultados obtidos da avaliação do efeito biológico do extrato aquoso de *M. oleifera* sobre a mutagenicidade induzida pelo agente ENU *in vivo*, nas condições experimentais utilizadas, sugerem que o extrato possui compostos que reduzem significativamente a frequência de células micronucleadas da medula óssea de camundongos Swiss, sem apresentar atividade citotóxica e hepatotóxica. Essa propriedade antimutagênica pode contribuir para o efeito anticarcinogênico.

Conclusão

Nas condições realizadas, concluímos que extrato aquoso de *M. oleifera* apresentou potencial antimutagênico para a quimioprevenção do câncer e não possui atividade mutagênica, assim como não foi citotóxico em baixas concentrações utilizadas e não causa dano hepático. Neste contexto, outros estudos que visem avaliar os efeitos farmacológicos da *M. oleifera* sobre a saúde humana são relevantes para garantir a sua segurança no uso crônico ou a longo prazo.

Referências

- ABDULL, R.A.F., IBRAHIM, M.D., KNTAYYA, S.B. Health benefits of *Moringa oleifera*. Asian. Pac. J. Cancer Prev. v.15(20), p. 8571-6, 2014. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.20.8571
- ALMEIDA, I. L. S. Avaliação da capacidade de adsorção da torta de *Moringa oleifera* para BTEX em amostras aquosas. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- AMAGLO, N.K., BENNETT, R.N., LO CURTO, R.B., ROSA, E.A.S., LO TURCO, V., GIUFFRIDA, A., TIMPO, G.M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chem. v.122, p.1047-1054, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.073>
- ANVISA. RESOLUÇÃO-RE Nº 1.478, DE 3 DE JUNHO DE 2019. Proibidos alimentos com *Moringa oleifera*. ANVISA. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/proibidos-alimentos-com-moringa-oleifera/219201. Acesso em: junho de 2019.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. Phytother. Res. v. 21, p. 17-25, 2007. doi: 10.1002/ptr.2023.
- AWODELE, O., OREAGBA, I.A., ODOMA, S., SILVA, J.A.T., OSUNKALU, V.O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). Journal of Ethnopharmacology, v. 139, p. 330–336, 2012. doi: 10.1016/j.jep.2011.10.008
- BALDISSEROTTO, A., BUSO, P., RADICE, H., DISSETTE, V., LAMPRONTI, E.U., GAMBARI, R., MANFREDINI, S., VERTUANI, S. *Moringa oleifera* leaf

- extracts as multifunctional ingredients for “Natural and Organic” Sunscreens and Photoprotective Preparations. *Molecules*, v. 23, p.664, 2018. doi: 10.3390/molecules23030664.
- BELLOSTAS, N., SORENSEN, J., NIKIEMA, A., SORENSEN, H., PASTERNAK, D., KUMAR, S. Glucosinolates in leaves of *Moringa* species grown and disseminated in Niger. *African J. Agr. Res.*, v. 5, p.1338-1340, 2010.
- BEZERRA, A., MOMENTÉ, V.G., MEDEIROS, F. S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. *Hort. Bras.*, v.22, p. 295-299, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000200026>.
- COLOMBO, M.L., ASSISI, F., DELLA, P. T., MORO, P., SESANA, F.M., BISSOLI, M., BORGHINI, R., PEREGO, S., GALASSO, G., BANFI, E., DAVANZO, F. Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. *J. Pharm. Sci. Res.*, v.2, n.7, p.417-25, 2010
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P.R.: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/UFSC RS. 833 p., 2001.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* v. 455, p. 81–95, 2000. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00065-8
- GOYAL, B.R., AGRAWAL, B.B., GOYAL, R.K., MEHTA, A. A. Phyto-pharmacology de *Moringa oleifera* Lam. an overview. *Nat. Prod. Rad.*, v. 6, p. 347-353, 2007.
- GUEVARA, A.P., VARGAS, C., SAKURAI, H., FUJIWARA, Y., HASHIMOTO, K., MAOKA, T., KOZUKA, M.; ITO, Y., TOKUDA, H., NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat. Res.* v.440, p. 181-188. 1999. doi: 10.1016/s1383-5718(99)00025-x
- JUNG, I. L., LEE, J. H., KANG, S. C. A potential oral anticancer drug candidate, *Moringa oleifera* leaf extract, induces the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Lett. Sep.* v. 3, p. 1597–1604, 2015. doi: 10.3892/ol.2015.3482
- KHAWAJA, T.M., TAHIRA, M., IKRAM, U.K. *Moringa oleifera*: a natural gift - A review. *J. Pharm. Sci. Res.* v. 2, p. 775-81, 2010.
- MacGREGOR, J. T., HEDDLE, J.A., HITE, M., MARGOLIN, B. H., RAMEL, C., SALAMONE, M.F., TICE, R.R., WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mut. Res.* v.189, p.103-112, 1987. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90016-4)
- MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.* v. 63, p. 211-228, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01023-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01023-1)
- MANOHARAN, K., BANERJEE, M. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* v. 9, n. 8, p. 783-789, 1985. doi: 10.1016/0309-1651(85)90096-7.
- MATOS, F.J.A.: *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 4ª ed. Fortaleza: UFC, SEBRAE/CE, 2002.
- NAIR, S., VARALAKSHMI, K. Anticancer, cytotoxic potential of *Moringa oleifera* extracts in HeLa cell line. *J. Nat. Pharm.* v. 2, p. 138-138. 2011. doi:10.4103/2229-5119.86260
- NEVES, S. M. P., ONG, F. M. P., RODRIGUES, L. D., SANTOS, R. A., FONTES, R. S., SANTANA, R. O. *Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*. 2013. 216 p. il. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.
- PEREIRA, C.A.B. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A, La, R., Montelleone-Neto (Eds.) *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo: FCA, p.113-21, 1991.
- PROMKUM, C., KUPRADINUN, P., TUNTIPOPIPAT, S., BUTRYEE, C. Nutritive evaluation and effect of *Moringa oleifera* pod on clastogenic potential in the mouse. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* v.11, p.627-632, 2010.
- PURWAL, L., PATHAK, A.K., JAIN, U.K. *In vivo* anticancer activity of the leaves and fruits of *Moringa oleifera* on mouse melanoma. *Pharmacology online.* v. 1, p. 655–665, 2010.
- SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., NATARAJAN, A.T. Effect of beta-carotene on clastogenic effects of mitomycin C, methyl methansulfonate and bleomycin in CHO cells. *Mutat. Res.*, v.9, p.53-57, 1994. doi: 10.1093/mutage/9.1.53.
- SATHYA, T.N., AADARSH, P., DEEPA, V., BALAKRISHNA, M. P. *Moringa oleifera* Lam. leaves prevent cyclophosphamide-induced micronucleus and DNA damage in mice. *Int. J. Phytomed.* v. 2, p.147–154, 2010. doi:10.5138/ijpm.2010.0975.0185.02023
- SIDKER, K., SINHA, M., DAS, N., DAS, D.K., DATTA, S., DEY, S. *Moringa oleifera* Leaf extract prevents in vitro oxidative DNA damage. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* v. 6, p.159–163, 2013.
- SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. 344 p., 2003.
- SILVA, G. N., DE CAMARGO, E. A., SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, D. A. Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic gents. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endontology*, v.104, p. 58-61, 2007. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.02.009
- SREELATHA, S., JEYACHITRA, A., PADMA, P.R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* v. 49, p. 1270–1275, 2011. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.006

SUGUI, M.M. Mecanismos de antimutagenicidade do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre lesões no DNA induzidas *in vivo* e *in vitro*. 111 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu- São Paulo, Brasil, 2006.

TÔRRES, A.R., OLIVEIRA, R.A.G., DINIZ, M.F.F.M., ARAUJO, E.C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. Rev. Bras. Farmacogn., v.15, n.4, p.373-380, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400019>.

WATERS, M.D., BRADY, A. L., STACK, H. F., BROCKMAN, H. E. Antimutagenic profiles for some model compounds. Mut. Res. v. 238, p. 57-85, 1999. doi: 10.1016/0165-1110(90)90039-e.