

**Estudo toxicológico das sementes de *Moringa oleifera* Lam. utilizando o teste com
Artemia salina Leach**

Toxicological study of seeds *Moringa oleifera* Lam. using the *Artemia salina* Leach test

**Estudio toxicológico de las semillas de *Moringa oleifera* Lam. utilizando la prueba de
Artemia salina Leach**

Recebido: 06/08/2020 | Revisado: 14/08/2020 | Aceito: 20/08/2020 | Publicado: 26/08/2020

Danilo Lima Dantas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0780-3474>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: danilold.15@gmail.com

Ana Paula Moisés de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3319-7674>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: anapaulinha_15_6@hotmail.com

Jaciara Dantas Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0038-2021>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: dantasjaciara@gmail.com

José Anderson Machado Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0473-8443>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: jmo.anderson@gmail.com

Arthur Filgueira de Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9641-5037>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: arthur.filgueira@eq.ufcg.edu.br

Marisa de Oliveira Apolinário

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6018-2905>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: marisapoli@yahoo.com

Renato Alexandre Costa de Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7075-7709>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: renatoacs@ufcg.edu.br

Ana Regina Nascimento Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9029-6922>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: arncampos@ufcg.edu.br

Resumo

A busca por espécies vegetais, sobretudo aquelas que apresentam maiores benefícios econômicos e também sociais vem ganhando ênfase nas pesquisas científicas. Nesse contexto destaca-se a *Moringa oleífera* Lam., planta originária da Índia e que apresenta diversas aplicações nos setores alimentícios, industriais, medicinais, tratamento de água, dentre outros. Seus frutos são constituídos de vagens que contêm sementes ricas em minerais, vitaminas, proteínas, lipídios, carboidratos, metabólitos secundários e antioxidantes. O presente trabalho teve por objetivo fazer um estudo toxicológico das sementes da *M. oleífera* Lam. a partir do teste da *Artemia salina* Leach. Foram preparados dois extratos etanólicos, sendo um a partir das amêndoas e outro apenas com as cascas que as recobrem. Os extratos foram solubilizados em 5 concentrações diferentes. Cada tubo de ensaio continha os extratos em suas respectivas concentrações e 10 *A. salina* ativas. Após 24 h foi realizada a contagem para determinação da CL₅₀. Os dados obtidos foram analisados a partir de análise PROBIT com uso do software *Statistica*. A partir das análises realizadas concluiu-se que a nem a amêndoa e nem a casca da semente da *M. oleífera* Lam. apresentavam toxicidade, uma vez que ambas tiveram valores de CL₅₀ acima de 1000 µg.mL⁻¹, revelando inclusive uma menor toxicidade que outras plantas convencionalmente utilizadas no Brasil, como o endro e a erva doce.

Palavras-chave: Moringa; Sementes; Toxicidade.

Abstract

The search for plant species, especially those with the greatest economic and social benefits, has gained emphasis in scientific research. In this context, *Moringa oleífera* Lam. stands out, a plant originally from India and which has several applications in the food, industrial, medicinal, water treatment sectors, among others. Its fruits consist of pods that contain seeds rich in minerals, vitamins, proteins, lipids, carbohydrates, secondary metabolites and

antioxidants. The present work had as objective to make a toxicological study of the seeds of *M. oleifera* Lam. using the *Artemia salina* Leach test. Two ethanolic extracts were prepared, one from almonds and the other with only the husks covering the seeds. The extracts were solubilized in 5 different concentrations. Each test tube contained the extracts in their respective concentrations and 10 active *A. salina*. After 24 h, the count was performed to determine the CL₅₀. The data obtained were analyzed using PROBIT analysis using the Statistica software. From the analyzes performed, it was concluded that neither the almond nor the husk of the seed of *M. oleifera* Lam. presented toxicity, since both had CL₅₀ values above 1000 µg.mL⁻¹, revealing even less toxicity than other plants conventionally used in Brazil, such as dill and fennel.

Keywords: Moringa; Seeds; Toxicity.

Resumen

La búsqueda de especies vegetales, especialmente aquellas con mayores beneficios económicos y sociales, ha ganado énfasis en la investigación científica. En este contexto, destaca Moringa oleífera Lam., Planta originaria de la India y que tiene varias aplicaciones en los sectores alimentario, industrial, medicinal, tratamiento de aguas, entre otros. Sus frutos consisten en vainas que contienen semillas ricas en minerales, vitaminas, proteínas, lípidos, carbohidratos, metabolitos secundarios y antioxidantes. El presente trabajo tuvo como objetivo realizar un estudio toxicológico de las semillas de *M. oleifera* Lam. Mediante el ensayo de lixiviación de *Artemia salina*. Se prepararon dos extractos etanólicos, uno de almendras y el otro con solo la cáscara cubriendo las semillas. Los extractos se solubilizaron en 5 concentraciones diferentes. Cada tubo de ensayo contenía los extractos en sus respectivas concentraciones y 10 *A. salina* solución salina activa. Después de 24 h, se realizó el recuento para determinar la CL₅₀. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis PROBIT utilizando el software Statistica. De los análisis realizados se concluyó que ni la almendra ni la cáscara de la semilla de *M. oleifera* Lam. Presentaban toxicidad, ya que ambas tenían valores de CL₅₀ superiores a 1000 µg.mL⁻¹, revelando aún menos toxicidad que otras plantas convencionalmente utilizadas en Brasil, como el eneldo y el hinojo.

Palabras clave: Moringa; Semillas; Toxicidad.

1. Introdução

Desde os primórdios das primeiras civilizações, os seres humanos utilizam as plantas para diversas finalidades, sejam alimentícias e/ou medicinais. Com o desenvolvimento da sociedade e o aperfeiçoamento científico a utilização de plantas que primariamente estavam interligadas especialmente a questões socioculturais, passou a ter empirismo (Albuquerque et al., 2020).

O uso de plantas terapêuticas é uma realidade que tem forte influência histórica e é muito utilizada nos dias atuais, tanto no setor rural, quanto urbano (Badke et al., 2019). Segundo Dhakad et al. (2019), cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais em suas práticas de saúde e 25% dos fármacos elaborados apresentam-se como matéria-prima compostos orgânicos extraídos de plantas, sendo de grande interesse para a indústria farmacológica.

A área de produtos naturais vem crescendo em todo mundo, e a busca por fontes naturais, sobretudo aquelas que apresentam maiores benefícios econômicos e também sociais vem ganhando ênfase, destacando-se o estudo de espécies vegetais (Sales, 2019).

Dentre as inúmeras plantas que vêm ganhando destaque, resalta-se a *Moringa oleifera* Lam. (*M. oleifera* Lam.). De origem Indiana, pertencente à família das Moringaceae e é cultivada em climas subtropicais e tropicais (Sermkaew; Plyduang, 2020), sendo dentre as 13 espécies do gênero *Moringa* a que apresenta maior adaptabilidade e também multiplicidade de usos (Santos, 2019).

Rica em minerais, vitaminas, proteínas, lipídios, metabólitos secundários e outros fitoquímicos, como esteróis, taninos, flavonóides, terpenóides, saponinas, alcaloides antraquinonas, carboidratos. Contém ainda 36 compostos anti-inflamatórios, mais de 90 nutrientes reconhecidos (Prabu; Umamaheswari; Puratchikody, 2020).

Seu fruto tem forma de vagem, e as sementes nela presentes possuem diversas aplicações na área nutricional; na elaboração de biodiesel e também por possuir grande quantidade de compostos fenólicos e antioxidantes, é de grande interesse para indústria farmacológica (Dantas, 2018; Tshabalala et al., 2019; Prabu; Umamaheswari; Puratchikody, 2020). É utilizada na elaboração de medicamentos para osteoporose, diabetes, hipertensão e também sendo amplamente utilizado na medicina popular de um grande número de países (Sermkaew; Plyduang, 2019).

Todavia vale salientar que mesmo as plantas sendo fontes naturais, devem ser realizados estudos toxicológicos para aprovar ou não sua utilização segura para uso na saúde

humana (Rahman; Pratama, 2020). Dantas et al. (2020) destacam em relação a *M. oleifera* Lam. que a toxicidade do fruto pode variar entre levemente tóxico ou atóxico, dependendo das condições morfoclimáticas que a planta foi cultivada.

O estudo toxicológico é de grande importância para assegurar o uso de determinado material biológico, além de permitir informações sobre suas potencialidades, uma vez que a partir deste tipo de estudo pode-se obter informações quanto atividade bioativa de determinado material. A toxicidade que é tida como a capacidade de determinado composto tender a causar uma desordem biológica e/ou até a morte de um organismo teste (Rahman; Pratama, 2019).

Existem diversos testes de determinação de toxicidade de plantas, com uso de animais como ratos, coelhos, uso de insetos etc. Apesar de terem eficácia apresentam problemas devido ao alto gasto econômico e tempo para obtenção de resultados, bem como o elevado sofrimento aos quais os animais são submetidos (Waldman; Dutra, 2016).

Devido a isso, testes alternativos vêm sendo estudados como forma de substituição aos testes convencionais, dentre os quais o teste com uso do bioindicador *Artemia salina* Leach (*A. salina* Leach). Este teste vem ganhando espaço dentro dos ensaios toxicológicos devido a sua rapidez, fácil reprodutibilidade e grande confiabilidade dos resultados (Rahman; Pratama, 2019).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo toxicológico com uso do bioindicador *A. salina* Leach. das sementes da *M. oleifera* Lam. cultivadas no município de Cuité-PB.

2. Metodologia

Este trabalho trata-se de pesquisa experimental de cunho quali-quantitativa (Pereira et al., 2018), realizada no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde (UFCG/CES).

Para o estudo toxicológico, sementes de *M. oleifera* Lam. foram utilizadas como matéria-prima. Estas foram retiradas manualmente de vagens coletadas de árvores adultas que foram cultivadas na referida instituição de ensino, localizado no município de Cuité, Paraíba.

As sementes possuem um envoltório externo de coloração escura e uma amêndoa creme em seu interior. A Figura 1A mostra sementes de *M. oleifera* Lam. sem as cascas que as recobrem (amêndoas) e a Figura 1B mostra sementes completas com cascas.

Figura 1. Sementes da *Moringa oleífera* Lam. A) amêndoas. B) sementes com cascas.



Fonte: Autoria própria

As cascas das sementes foram retiradas manualmente, resultando em amêndoas e cascas e então preparados dois extratos etanólicos: amêndoas na proporção de 1:3 (m/v) e outro apenas com as cascas na proporção de 1:15 (m/v). Os extratos resultantes tiveram um período de descanso de 72 h antes de serem utilizados no teste de toxicidade.

Os cistos de *A. salina* Leach. foram incubados em recipiente retangular de vidro com água salina artificial com concentração de 38 g/L, em temperatura média entre 28 °C, com iluminação constante por 48 h a partir de lâmpada incandescente de 40 watts (Meyer et al., 1982).

Os extratos etanólicos foram solubilizados e preparados em 5 concentrações: 1500, 1000, 500, 100, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os testes de toxicidade foram realizados em duplicatas, para todas as concentrações. Cada tubo de ensaio continha os extratos em suas respectivas concentrações e 10 *A. salina* ativas, totalizando 20 para cada concentração de extrato analisado.

Após 24 h foi realizada a contagem para a análise do número de organismos mortos, seguida da determinação da CL_{50} (concentração que produziu 50% de letalidade). Foram consideradas larvas mortas todas as que não apresentavam qualquer movimento normal em cerca de 10 s de observação.

O cálculo da concentração letal foi feito por análise PROBIT com software *Statistic*, com um intervalo de confiança (95%).

3. Resultados e Discussão

Os ensaios toxicológicos com o bioindicador revelaram que ambos os extratos preparados apresentaram resultados de CL₅₀ acima de 1000 ppm, indicando que as amêndoas e as cascas das sementes da *M. oleifera* Lam. não são tóxicas. De acordo com os critérios adotados por Meyer et al. (1982), valores de toxicidade acima de 1000 ppm caracterizam-se como atóxicas. Não houve morte de nenhuma *A. salina* no teste controle, o que mostra que o solvente utilizado é inofensivo ao microcrustáceo, e as mortes foram resultantes unicamente da ação dos extratos etanólicos.

A Tabela 1 apresenta os valores médios encontrados de CL₅₀, calculados com um limite de confiança de 95%, para os extratos etanólicos das amêndoas e das cascas.

Tabela 1. Valores da CL₅₀ para o extrato etanólico da amêndoa e das cascas das sementes da *Moringa oleifera* Lam.

	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Intervalo de confiança 95%	
		Inferior	Superior
Amêndoa	1783,40	1593,07	1973,73
Cascas	1501,71	1444,08	1559,34

Fonte: Autoria própria

A partir dos dados apresentados na Tabela 1 percebe-se que as sementes da *M. oleifera* Lam. apresentam possibilidade de estudo para uso na saúde e na alimentação humana, uma vez que foi visto atoxicidade para seres humanos de acordo com o teste da *A. salina* Leach. É importante salientar que mesmo não apresentando toxicidade isso não implica que as sementes não possuem metabólitos secundários com atividades bioativas, mas sim indica que esses metabólitos presentes nas sementes ao serem ingeridos ou inalados em dada concentração por serem humanos não causam danos aos sistemas biológicos (Campos et al, 2016).

Em relação aos valores de CL₅₀ encontrados pode-se destacar uma proximidade com os obtidos por Arcanjo et al. (2012) e Assunção (2017) que também utilizaram estudos com o bioindicador *A. salina* e diferentes concentrações de extratos etanólicos, adotando o mesmo critério toxicológico de Meyer et al. (1982) e encontraram valores de toxicidade acima de 1000 ppm.

No entanto, Miodzki (2014) relata toxicidade aguda nas sementes de *M. oleifera* Lam. cultivadas em Curitiba-PA, tal contradição pode ser justificada por Dantas et al. (2020), que relacionam os valores de toxicidade também às condições morfoclimáticas de plantio.

Essa mudança no perfil toxicológico de plantas cultivadas em diferentes regiões pode ser explicada a fatores relacionados às condições do solo, às condições de plantio e também à diferenças pluviométricas, uma vez que na Paraíba o menor índice pluviométrico favorece o desenvolvimento dessa planta e também pode influenciar com isso a redução de metabolitos que tendem a aumentar a toxicidade da planta.

A Tabela 2 apresenta valores de toxicidade (CL₅₀), realizados frente à *A. salina* de algumas espécies vegetais comumente utilizadas na alimentação e medicina brasileira.

Tabela 2. Valores de CL₅₀ de algumas espécies vegetais.

Espécie	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Cuité (<i>Crescentia cujete</i>)	6416,67
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	3172,00
Endro (<i>Anethum graveolens</i>)	2624,50
Pata de vaca (<i>Bauhinia forficata</i>)	1780,00
Manjeriço (<i>Ocimum gratissimum</i>)	755,50
Pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>)	716,10
Erva-doce (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	428,00

Fonte: Pereira et al., (2015); Araújo (2015) e Brito; Silva; Figueira (2012).

Ao se fazer uma comparação com a citotoxicidade de outras espécies vegetais destacadas por Pereira et al., (2015) que estudaram a erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), endro (*Anethum graveolens*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e Brito; Silva; Figueira (2012), que avaliaram a pata de vaca (*Bauhinia forficata*) e o manjeriço (*Ocimum gratissimum*), percebe-se que as sementes da moringa apresentaram uma menor toxicidade do que plantas convencionalmente utilizadas, estando possivelmente seguras para o consumo humano.

4. Considerações Finais

O valor de CL₅₀ para as amêndoas das sementes foi igual a 1783,40 µg.mL⁻¹ e para as cascas que a recobrem foi 1501,71µg.mL⁻¹. Os dois extratos etanolicos analisados apresentaram valor superior de CL₅₀ >1000 ppm, indicando assim que os extratos analisados não são tóxicos.

Trabalhos direcionados à elaboração de produto farináceo a partir das sementes de *M. oleifera* Lam. utilizando diferentes métodos de secagens já vêm sendo desenvolvidos, e estudos futuros podem ser realizados para avaliar a possibilidade do uso dessa farinha na elaboração e/ou preparo de diversos produtos alimentícios, sendo necessária além da caracterização físico-química e nutricional, a análise sensorial dessas possíveis formulações

Referências

- Albuquerque, U. P., do Nascimento, A. L. B., Silva Chaves, L., Feitosa, I. S., de Moura, J. M. B., Gonçalves, P. H. S., Silva, R.H., Silva, T.C., Ferreira Júnior, W. S. (2020). The chemical ecology approach to modern and early human use of medicinal plants. *Chemoecology*, 30, 89-102. doi:10.1007/s00049-020-00302-8
- Badke, M. R., Barbieri, R. L., Ribeiro, M. V., Ceolin, T., Martínez-Hernández, À., & Alvim, N. A. T. (2019). *Significados da utilização de plantas medicinais nas práticas de autoatenção à saúde*. Revista da Escola de Enfermagem da USP, 53. doi: <https://doi.org/10.1590/s1980-220x2018047903526>
- Brito, A. F.; Silva, G. A.; Figueira, A. C. G. (2012). Avaliação Da Toxicidade De Plantas Mediciniais Brasileiras por meio do Bioensaio com *Artemia Salina* (anais) In: JIC - Jornada De Pesquisa e Iniciação Científica, Ceres, 3, 11 - 23.
- Campos, S. C., Silva, C. G., Campana, P. R. V., & Almeida, V. L. (2016). Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 373-382. https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_057

Dantas, D. L. (2028). Elaboração de produto farináceo a partir da semente de *Moringa oleifera* Lam. Monografia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité. Recuperado de <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/11344/1/DANILO%20LIMA%20DANTAS%20-%20TCC%20QU%20C3%8DMICA%202018.pdf>

Dantas, D. L., Freitas; J. C. R., Campos, A. R. N., & Santana, R. A. C. (2020). Estudo morfométrico e toxicológico de vagens de *Moringa oleifera* Lam. Presentes no município de Cuité-PB. *Revista Educação, Ciência e Saúde*, 7(1), 58-69. doi: <http://dx.doi.org/10.20438/ecs.v7i1.234>

Dhakad, A. K., Shivani, M. I., Khan, S. S., Pandey, V. V., & Singh, A. Biological, nutritional and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam. (2019). *Phytotherapy Research*, 33 (11), 1- 34 doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.6475>

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., Mclaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45 (1), 31-34.

Mioduski, J. (2014). Avaliação da toxicidade de extratos da semente de *Moringa oleifera* lam. frente aos organismos *Daphnia magna* Straus. e *Artemia salina* Leach. (Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba). Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/964>

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da Pesquisa Científica*. Universidade Federal de Santa Maria. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1

Pereira, E. M., Leite Filho, M. T., de Assis Mendes, F., Martins, A. N. A., & Rocha, A. P. T. (2015). Potencial toxicológico frente *Artemia Salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande, PB. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 10(1), 52-56.

Prabu, S. L., Umamaheswari, A., & Puratchikody, A. (2019). Phytopharmacological potential of the natural gift *Moringa oleifera* Lam and its therapeutic application: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(11), 485. doi: <https://doi.org/10.4103/1995-7645.271288>

Rahman, M. F., & Pratama, A. A. (2019, June). Synthesis of Organonitrogen Compounds from Eugenol through The Ritter Reaction and The Toxicity Test on *Artemia salina* Leach. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 546(4), 042036. IOP Publishing. doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/4/042036>

Sales, H.C.D. (2019). A utilização de água destilada na extração dos compostos bioativos de plantas alimentícias não convencionais. (Monografia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité). Recuperado de <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/12313>

Santos, A. Y. O. (2019) Crescimento de mudas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) submetidas a doses crescentes de composto orgânico. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba.

Sermkaew, N., & Plyduang, T. (2020). Self-microemulsifying drug delivery systems of *Moringa oleifera* extract for enhanced dissolution of kaempferol and quercetin. *Acta Pharmaceutica*, 70(1), 77-88. doi: <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0012>

Araújo, A. L. (2015). Composição físico-química e toxicológica do Cuité (*Crescentia cujete* Linn). Monografia. Licenciatura em Química. Universidade Federal de Campina Grande, Cuité.

Tshabalala, T., Ncube, B., Madala, N. E., Nyakudya, T. T., Moyo, H. P., Sibanda, M., & Ndhlala, A. R. (2019). Scribbling the Cat: A Case of the “Miracle” Plant, *Moringa oleifera*. *Plants*, 8(11), 510. doi: <https://doi.org/10.3390/plants8110510>

Waldman, R. L., & Dutra, C. F. (2016). Direito humano à saúde e a dignidade animal: experimentação com animais para o benefício da saúde humana e a diretriz brasileira referente ao tratamento destes animais. *Revista Direito Ambiental e Sociedade*, 6(1). Recuperado de <http://www.ucs.br/etc/revistas/index.php/direitoambiental/article/view/3869>

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Danilo Lima Dantas – 50%

Ana Paula Moisés de Sousa – 10%

Jaciara Dantas Costa – 10%

José Anderson Machado Oliveira – 4%

Arthur Filgueira de Almeida – 4%

Marisa de Oliveira Apolinário – 4%

Renato Alexandre Costa de Santana – 6%

Ana Regina Nascimento Campos – 12%