

2º CÍCLO

TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS PARA O TRATAMENTO DA ÁGUA DE  
COMUNIDADES RURAIS DE MOÇAMBIQUE: O POTENCIAL DAS  
SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA***

Cardeal Victor Foutinho

**M**  
**2020**



Cardeal Victor Foutinho

**PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS PARA O TRATAMENTO DA ÁGUA DE  
COMUNIDADES RURAIS DE MOÇAMBIQUE: O POTENCIAL DAS  
SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA***

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em  
Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Paulo Sousa e Silva e  
Professor Doutor Carlos Afonso

Julho / 2020

## **DECLARAÇÃO DE REPRODUÇÃO**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao Altíssimo ALLAH (Deus), muitas palavras de gratidão pela vida, saúde e enúmeros favores, pois sem a permissão Dele nada disto se conseguiria alcançar.

Ao Prof. Doutor Paulo Sousa e Silva, orientador da dissertação, pelo (a) acompanhamento técnico e teórico, incansável disponibilidade, incentivo e a liberdade de trabalho que me permitiu ser mais autónomo. Pela revisão cuidada que fez na preparação deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Carlos Afonso, co-orientador da dissertação, pelo todo apoio e compreensão, pelas suas sugestões e críticas que melhoraram imenso o trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Sara Cunha, do laboratório de cromatografia gasosa, pelo apoio e colaboração na execução de análises em GC-MS.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Helena Ferreira, do laboratório de microbiologia, pelo apoio e colaboração na execução de ensaios microbiológicos.

À Dra Eulália Mendes, do laboratório de hidrologia, pelo apoio e colaboração na execução de ensaios de turvação.

À Dra Sara Cravo, pelo apoio e colaboração na extração de sementes até análise no FTIR e UV-vis.

À Dona Conceição, Cristina, Anabela e ao Joel, pelo todo o apoio prestado ao longo da execução laboratorial.

Aos Professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica (MTF), pelo conhecimento valioso que transmitiram, pela sua elevada humildade compreenderam as dificuldades que trazia e apoiaram.

À *UniLúrio: Support to Skills Development for Agriculture and Industry Project*, a entidade financiadora da bolsa, pelo suporte financeiro para frequentar o curso.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Carla Rego, presidente da Health4Moz, pelo acolhimento desde o primeiro momento que conheci o solo português.

Aos colegas do curso de MTF e às do grupo de trabalho, Marta e Ana, com elas aprendi muito.

Aos meus pais, que foram sempre presentes desde o berço. A vós tudo vos devo. Agradeço pelo amor e carinho incessante, um especial agradecimento por terem aturado estes momentos distantes do filho, a quem dedico este trabalho.

Aos meus irmãos, Lucas, Tina e Carmélia, por terem aturado viver esse tempo longe de mim.

À minha esposa Zalbia Ossufo, pelo amor e carinho e por ter aturado estes momentos distante do mim. À ela devo muito.

À minha primeira esposa, Sofia Fausto, ausente no mundo físico e presente na memória, a quem também dedico este trabalho. Que Deus lhe conceda um descanso eterno melhor na sua nova casa, a sepultura, e a introduza no degrau mais alto do paraíso.

Ao meu professor Teólogo Hassan bun Hassan, pelo apoio social e moral.

Finalmente, agradeço a todos que esqueci mencionar e que colaboraram de forma direta ou indireta para este trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** Nos países em desenvolvimento, a proximidade e a abundância de produtos naturais com potencial para serem usados na purificação da água e a possibilidade de os utilizar com sucesso sem requerer equipamentos sofisticados assume particular relevância. De entre as espécies vegetais usadas para a purificação de água, a *Moringa oleífera* (MO) é uma das mais importantes e das mais utilizadas. O potencial da utilização de sementes de MO na purificação de águas tem sido objeto de interesse e estudo ao longo dos anos. Nas zonas rurais de Moçambique, muitas famílias ainda recorrem a fontes de abastecimento de água inadequadas como rios, poços, lagos e lagoas. Como alternativa mais económica e ecológica surge também em Moçambique a MO, cujas sementes são utilizadas pelas populações rurais para purificar a água.

**Objetivos:** o objetivo principal do presente trabalho foi preparar cápsulas de pó de sementes de MO como forma de otimizar o tratamento de água em comunidades rurais de Moçambique.

**Métodos:** a caracterização da composição dos extratos das sementes foi estudada usando Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa (GC-MS), espectrofotometrias no Infravermelho (FTIR) e no Ultravioleta-Visível. A avaliação da eficiência de redução da turvação foi feita usando pó, granulado e extrato, que foram lidos no turbidímetro. A caracterização do pó foi feita determinando a massa volúmica aparente e índice de compressibilidade. As cápsulas foram submetidas aos ensaios de uniformidade de massa e desagregação. A atividade anti-bacteriana foi avaliada usando a técnica de contagem direta de microrganismos, tendo sido usado a *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Resultados:** os métodos de Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa, espectrofotometria no Infravermelho (FTIR) e espectrofotometria no Ultravioleta-Visível evidenciaram a presença de ácidos carboxílicos, compostos alifáticos e fenóis. O pó e o granulado demonstraram valores de índices de compressibilidade elevados, indicativos de que não escoam. As cápsulas satisfizeram aos ensaios de uniformidade de massa da Farmacopeia Portuguesa, tendo ocorrido a desagregação a 4 min e 30 s. As doses de 250 e 500 mg/l de pó e extrato demonstraram eficiência de redução da turvação de 98,5 %, tendo se reduzido a 4 UTN. O pó das sementes de MO demonstrou atividade antibacteriana reduzindo consideravelmente o número de colónias da *E.coli*.

**Conclusão:** as sementes de MO demonstraram principalmente a presença de ácidos gordos, tendo se verificado também a presença de metabolitos secundários de muito interesse, como os fitoesteróis e polifenóis. O pó e o extracto aquoso demonstraram maior eficiência de redução da turvação do que o granulado. Essa redução verificou-se nas doses de 250 e 500 mg/l de pó e filtrando com papel de filtro, tendo-se conseguido atingir 97 – 98,5 %. Conseguiu-se atingir 4 UTN, valor inferior a 5 UTN, o recomendado pela OMS. As sementes de MO demonstraram eficiência antibacteriana, diminuindo consideravelmente o número de bactérias (*E.coli*). As cápsulas mantiveram as propriedades coagulantes e/ou antibacterianas do pó após 15 dias de armazenamento na estufa a 30 °C.

**Palavras chaves:** *Moringa oleifera*, Tratamento de água, Coagulação

## ABSTRACT

**Introduction:** In developing countries, the proximity and abundance of natural products with the potential to be used in the purification of water and the possibility of using them successfully without requiring sophisticated equipment is of particular importance. Among the plant species used for water purification, *Moringa oleifera* (MO) is one of the most important and most used. The potential of using MO seeds for water purification has been the object of interest and study over the years. In rural Mozambique, many families still resort to inadequate sources of water supplies such as rivers, wells, lakes and lagoons. As a more economical and ecological alternative, MO also emerges in Mozambique, whose seeds are used by rural populations to purify water.

**Objectives:** the main objective of this work was to prepare capsules of MO seeds powder as a way to optimize water treatment in rural communities of Mozambique.

**Methods:** The characterization of the composition of seed extracts was studied using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS), infrared (FTIR) and UV-Vis spectrophotometries. The evaluation of the efficiency of turbidity reduction was made using powder, granules and extract, which were read in the turbidimeter. The characterization of the powder was made by determining the apparent volume mass and compressibility index. Antibacterial activity was evaluated using the technique of direct counting of microorganisms, using *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Results:** the Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry method, Infrared (FTIR) and Ultraviolet-Visible spectrophotometries showed the presence of carboxylic acids, aliphatic compounds and phenols. The powder and the granules showed high compressibility index values, indicating that they do not flow. The capsules satisfied the mass uniformity assays of Portuguese Pharmacopea, and disaggregation occurred at 4 min and 30 s. The doses of 250 and 500 mg/l of powder and extract demonstrated a turbidity reduction efficiency of 98.5%, and it was reduced to 4 NTU. The powder from MO seeds showed antibacterial activity by considerably reducing the number of *E.coli* colonies.

**Conclusion:** The powder and the aqueous extract showed higher efficiency of reducing turbidity than granules. This reduction occurred at doses of 250 and 500 mg/l of powder and filtering with filter paper, reaching 97 – 98.5 %. It was achieved 4 NTU, a value of less



than 5 NTU, the one recommended by WHO. MO seeds demonstrated antibacterial efficiency, considerably decreasing the number of bacteria (*E.coli*). The capsules maintained the coagulant and/or antibacterial properties of the powder after 15 days of storage in the oven at 30 °C.

**Key words:** *Moringa oleifera*, water treatment, coagulation

## ÍNDICE GERAL

DECLARAÇÃO DE REPRODUÇÃO .....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE GERAL .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS .....	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. Tratamento de água para consumo humano .....	3
1.2.1. Coagulação e floculação .....	3
1.2.2. Sedimentação .....	4
1.2.3. Filtração.....	4
1.2.4. Desinfecção .....	5
1.3. Parâmetros de controlo da qualidade da água potável .....	5
1.3.1. Parâmetros microbiológicos .....	5
1.3.2. Turvação.....	6
1.4. <i>Moringa oleifera</i> .....	6
1.4.1. Composição fitoquímica .....	8
1.4.1.1. Composição fitoquímica das sementes .....	18
1.4.2. Aplicações.....	19
1.4.2.1. Aplicação medicinal.....	19
1.4.2.2. Potencial no tratamento de água .....	20
1.5. Tratamento de água com sementes de <i>Moringa oleifera</i> .....	20

1.5.2. Componentes ativos com propriedades coagulantes .....	21
1.5.2.1. Mecanismo de ação.....	21
1.6. Uso tradicional de sementes de MO em Moçambique.....	22
1.7. Objetivos do trabalho .....	23
1.7.1. Geral.....	23
1.7.2. Específicos .....	23
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
2.1. Materiais.....	24
2.2. Material botânico.....	24
2.3. Métodos .....	26
2.4. Perfil cromatográfico (GC-MS) e espectrofotométrico (FTIR e UV-Vis) das sementes .....	27
2.4.1. Extração com solventes orgânicos .....	27
2.4.2. Extração com água.....	28
2.4.3. Análise em GC-MS.....	29
2.4.4. Análise FTIR do pó de sementes de MO e extratos orgânicos .....	29
2.4.5. Análise UV-Vis dos extratos orgânicos e aquoso.....	30
2.5. Obtenção e caracterização do pó das sementes de MO .....	31
2.5.1. Pulverização e tamisação.....	31
2.5.2. Determinação da humidade.....	31
2.5.3. Caracterização mecânica.....	32
2.5.3.1. Determinação da massa volúmica aparente e do IC .....	32
2.5.3.2. Características de escoamento.....	32
2.6. Formulação .....	33
2.6.1. Formulação do granulado .....	33
2.6.2. Verificação do granulado .....	35
2.7. Cápsulas contendo pó de MO .....	35
2.7.1. Preparação das cápsulas.....	35
2.7.2. Ensaio das cápsulas .....	36
2.8. Ensaio de turvação.....	37

2.8.1. Preparação da suspensão de caulino.....	37
2.8.2. Preparação do extrato a 1% de MO.....	39
2.9. Ensaio microbiológico .....	40
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1. Perfil cromatográfico (GC-MS) de extratos de sementes.....	41
3.2. Perfil espectral (FTIR) de sementes de MO e extratos orgânicos .....	46
3.3. Perfil espectral (UV-Vis) de extratos orgânicos e aquoso de sementes de MO .....	47
3.4. Características físicas e mecânicas de pó e granulado das sementes de MO .....	52
3.4.1. Características físicas e mecânicas do pó.....	52
3.4.2. Características físicas e mecânicas do granulado .....	54
3.5. Verificação das cápsulas .....	55
3.5.1. Uniformidade de massa.....	55
3.5.2. Desagregação .....	56
3.6. Ensaio de turvação.....	57
3.7. Análise microbiológica .....	63
4. CONCLUSÃO .....	65
5. ANEXOS.....	66
6. REFERÊNCIAS.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de MO.....	7
Figura 2: Sementes de MO .....	8
Figura 3: Classes principais de flavonóides.....	14
Figura 4: Subgrupos dos ácidos fenólicos .....	15
Figura 5: Sementes de MO com casca .....	25
Figura 6: Sementes de MO sem casca.....	25
Figura 7: Pulverização por almofariz.....	31
Figura 8: Funil (a) e método automático (b) do ensaio de escoamento.....	32
Figura 9: Granulação (granulador Erweka FGS).....	34
Figura 10: Sistema de placas usada no método manual.....	36
Figura 11: Acondicionamento das cápsulas .....	37
Figura 12: Extração de pó das sementes de MO .....	27
Figura 13: Evaporação de solventes.....	28
Figura 14: Extratos de pó das sementes de MO.....	28
Figura 15: GC-MS.....	29
Figura 16: Espectrofotómetro FTIR .....	30
Figura 17: Espectrofotómetro UV-Vis .....	30
Figura 18: Suspensão de caulino .....	38
Figura 19: Amostras de água com caulino .....	38
Figura 20: Turbidímetro ( <i>2100N Turbidimeter</i> ) .....	39
Figura 21: Perfil cromatográfico de sementes de MO (extração com hexano).....	41
Figura 22: perfil cromatográfico de sementes de MO (extração com acetato de etilo).....	43
Figura 23: Perfil cromatográfico de sementes de MO (extração com etanol anidro) .....	45
Figura 24: Perfil espectral (FTIR) de sementes de MO e extratos orgânicos.....	47
Figura 25: Perfil espectral (UV-Vis) de extracto de <i>n</i> -hexano (a) e <i>n</i> -hexano + NaOH 10%(b) .....	48
Figura 26: Perfil espectral (UV-Vis) de extracto de acetato de etilo .....	48
Figura 27: Perfil espectral (UV-Vis) de extracto de etanol anidro (a), etanol anidro + NaOH 10% (b) e etanol anidro + NaOH 10% + HCl 3M (c) .....	49
Figura 28: Perfil espectral (UV-vis) de extrato aquoso (a), água + NaOH 10% (b) e água + NaOH 10% + HCl 3M (c) .....	50
Figura 29: Percentagem de redução e turvação final atingida usando papel de filtro (a e b), pano grosso (a1 e b1) e pano fino (a2 e b2) a 200 UTN para diferentes doses de MO.....	58

Figura 30: Percentagem de redução e turvação final atingida usando papel de filtro (a e b), pano grosso (a1 e b1) e pano fino (a2 e b2) a 300 UTN para diferentes doses de MO..... 59

Figura 31: Percentagem de redução e turvação final atingida usando papel de filtro (a e b), pano grosso (a1 e b1) e pano fino (a2 e b2) a 400 UTN para diferentes doses de MO.....60

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:Espécies de Moringa no mundo .....	7
Tabela 2: Metabolitos secundários de MO .....	8
Tabela 3: Fórmulas de estruturas de metabolitos secundários de MO .....	10
Tabela 4: Materiais usados .....	24
Tabela 5: Métodos e equipamentos usados .....	26
Tabela 6: Formulação quali-quantitativa .....	33
Tabela 7: Fórmula do fabrico .....	33
Tabela 8: Volumes de extrato a 1% de MO adicionados à amostra de água turva .....	39
Tabela 9: Amostras teste e controlos usados.....	40
Tabela 10: : Perfil cromatográfico e compostos presentes em sementes de MO (extração com hexano) .....	42
Tabela 11: Perfil cromatográfico e compostos presentes em sementes de MO (extração com acetato de etilo).....	44
Tabela 12: Perfil cromatográfico e compostos presentes em sementes de MO (extração com etanol anidro) .....	45
Tabela 13: Volumes aparentes .....	52
Tabela 14: Massas volúmicas aparentes .....	53
Tabela 15: Índices de compressibilidade .....	53
Tabela 16: Volumes aparentes e IC.....	54
Tabela 17: Massa dos conteúdos .....	55
Tabela 18: Uniformidade de massa das cápsulas .....	56
Tabela 19: Ensaio de desagregação.....	56
Tabela 20: Número de colónias .....	63
Tabela 21: Percentagem de redução da turvação.....	66
Tabela 22: Turvação final .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

*E.coli* – *Escherichia coli*

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FP 9 – Farmacopeia Portuguesa 9

FTIR – Infravermelho de transformadas de Fourier

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa

GS – Glicosinolatos

IC – Índice de compressibilidade

Lab. – Laboratório

LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

MO – *Moringa oleifera*

MTF – Mestrado em Tecnologia Farmacêutica

NTU – Nephelometric turbidity unit

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA – Plate count agar

PVP - Polivinilpirrolidona

UTN – Unidade de turvação nefelométrica

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana

WMO – Organização Mundial de Meteorologia



## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Considerações gerais

A água para o consumo ou água potável é um recurso de suma importância para todos os seres humanos (1). Contudo, a disponibilidade de água no mundo varia amplamente e, mesmo que esteja disponível, é questionável se é segura e limpa para o consumo humano. Esta realidade é particularmente evidente nos países em desenvolvimento, onde o acesso à água potável é limitado. A água é considerada limpa quando estiver adequadamente livre de substâncias físicas, químicas e de agentes poluentes biológicos, a qual, destinando-se para o consumo humano, pode ser utilizada para todos os fins domésticos habituais, como consumo, preparação de alimentos e higiene pessoal. A água potável é considerada segura quando cumpre com as diretrizes da *Organização Mundial da Saúde* (OMS) ou padrões nacionais de qualidade de água potável em relação aos parâmetros microbianos, químicos e físicos (2, 3).

Segundo a *Organização Meteorológica Mundial* (WMO), mais de 780 milhões de pessoas - cerca de 11% da população mundial - não têm acesso a água potável. Refira-se que, 70% dos recursos globais de água doce vão para agricultura e irrigação, e apenas 10% para usos domésticos (4).

De acordo com a OMS, a nível mundial há pelo menos 2 mil milhões de pessoas usando uma fonte de água potável contaminada com fezes. Água contaminada e falta de saneamento são apontados como causas para a transmissão de doenças como cólera, disenteria, hepatite A, febre tifóide e poliomielite. Portanto, serviços de água e saneamento ausentes ou inadequadamente operacionais, expõem os indivíduos a riscos de saúde evitáveis (5).

As principais razões que explicam a falta de água potável nos países em desenvolvimento são, entre outras, a ausência de infraestruturas e produtos químicos de tratamento adequados, uma rede de distribuição deteriorada ou abastecimentos intermitentes que promovem a estagnação da água e o crescimento de agentes patogénicos (6, 7).

A produção de água potável a partir de águas superficiais ou subterrâneas envolve geralmente uma ou várias etapas de tratamento para remover substâncias indesejadas. Nos países desenvolvidos, a purificação dessas águas é principalmente baseada na utilização de processos convencionais. Esses processos normalmente incluem a coagulação, sendo frequentemente escolhidos sais de alumínio como agentes coagulantes. Contudo, o inconveniente da utilização de alumínio deve-se à persistente presença de resíduos deste

metal na água tratada, que quando do uso continuado, é responsável pelo desenvolvimento da doença de Alzheimer e de outras doenças neurológicas (8-11). Além disso, nos países com menos recursos, os custos da aquisição dos sais de alumínio podem constituir um problema difícil de ultrapassar. Esta e outras desvantagens apontadas aos tratamentos com floculantes metálicos, fazem que haja uma atenção crescente para métodos alternativos mais ecológicos, não-tóxicos e com o mínimo de efeitos indesejáveis. É o caso da utilização de agentes coagulantes naturais, nomeadamente de plantas com essas propriedades (12, 13).

Nos países em desenvolvimento, a proximidade e a abundância de produtos naturais com potencial para serem usados na purificação da água e a possibilidade de os utilizar com sucesso sem requerer equipamentos sofisticados assume particular relevância. De entre as espécies vegetais usadas para a purificação de água, a *Moringa oleífera* (MO) é uma das mais importantes e das mais utilizadas. O potencial da utilização de sementes de MO na purificação de águas não tratadas tem sido objeto de interesse e estudo ao longo dos anos (8, 14-16).

Moçambique, oficialmente designado República de Moçambique, é um país localizado no sudeste do continente Africano, na região denominada África Austral. Segundo o último recenseamento geral da população e habitação de 2017, a população é de 27,9 milhões de habitantes, das quais, a maior parte vive na zona rural, o que corresponde a 66,6% (17). Nas zonas rurais do país, muitas famílias ainda recorrem a fontes de abastecimento de água inadequadas como rios, poços, lagos e lagoas (18). O método convencional de uso domiciliar mais utilizado para garantir a potabilidade da água oriunda dessas fontes é o uso de um produto comercializado com o nome de Certeza®, que é uma solução diluída de hipoclorito de sódio. A Certeza® é vendida em garrafas de 150 mL a preços subsidiados pelo setor privado e distribuída gratuitamente durante situações de emergência (19). No entanto, o fraco poder de compra da maior parte da população rural e do baixo nível de cobertura da distribuição gratuita dessa solução nessas comunidades, são os factores mais evidentes que contribuem para o consumo de água não tratada. Como alternativa mais económica e ecológica surge também em Moçambique a MO, cujas sementes são utilizadas pelas populações rurais para purificar a água.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo preparar cápsulas contendo pó de sementes de MO. Esta forma sólida permitirá uma utilização simples e mais eficaz da MO para o tratamento de águas. As cápsulas desenvolvidas foram caracterizadas e sua eficácia avaliada por ensaios microbiológicos e físico-químicos.

## **1.2. Tratamento de água para consumo humano**

O processo de tratamento da água envolve uma variedade de operações unitárias que geralmente são executadas em série. Efectivamente, quanto mais limpa for a água bruta (água não tratada), menor será o número de etapas ou operações unitárias necessárias, e, menor ainda é o custo total do processo (20). Portanto, entende-se por água potável a que é própria para beber, para cozinhar os alimentos e para usos domésticos, estando isenta de risco de contaminação por agentes químicos ou biológicos a curto e longo prazo de utilização (21).

A água para consumo humano pode ter dois tipos de origens, subterrânea e superficial. As águas subterrâneas por sua vez podem ser de vários subtipos de origens: meteórica, juvenis, cósmicas, de restituição e as fósseis. Estas são as águas utilizadas principalmente pelo sector industrial e a sua quantidade e qualidade dependem sobretudo de factores geológicos (22). São geralmente consideradas mais limpas que as superficiais e, portanto, não requerem o mesmo grau de tratamento, sendo geralmente só submetidas a aeração e desinfecção, antes do fornecimento. Já as águas superficiais, devido a exposição ambiental, estão sujeitas à contaminação, facto que, requerem tratamentos adequados para remover os agentes patogénicos (23).

Os processos de tratamento de água podem variar de um local para o outro, dependendo dos meios e capacidade tecnológicos disponíveis e da água que se pretende tratar, porém os princípios básicos são os mesmos. Atualmente, os métodos mais comuns de tratamento de água descritos em literatura incluem a coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção (24, 25).

### **1.2.1. Coagulação e floculação**

A coagulação é frequentemente um dos primeiros passos no tratamento de água (26). A técnica facilita a remoção de sólidos em suspensão e partículas coloidais, geralmente inferiores a 10  $\mu\text{m}$  (20, 26). As partículas coloidais que podem existir na água são argilas, óxidos metálicos, macromoléculas proteicas e micro-organismos. Essas partículas coloidais são tão pequenas, que a sua remoção da água sem o auxílio de agentes coagulantes seria difícil. Está descrito que as partículas dispersas na água de tamanhos reduzidos tendem a ter cargas elétricas negativas e, portanto, repelem-se umas às outras, evitando a agregação entre elas (27). Assim, utiliza-se um agente coagulante, que é um composto neste caso com carga positiva, que estabelece ligações químicas com as partículas em suspensão e/ou coloidais, e que quando adicionado à água atua desestabilizando-as por neutralização

induzindo-as a agregarem-se em partículas maiores, conhecidas como flocos. Os mecanismos que explicam os processos de coagulação são complexos, porém estes incluem a adsorção, a neutralização de cargas e o arrastamento dentro da matriz físico-química formada (20, 25, 28).

Os coagulantes comumente usados são sulfato de alumínio, cloreto férrico, cloretos de poli-alumínio e polímeros sintéticos, entre outros (29, 30). Todos esses coagulantes têm em comum a capacidade de produzir íões positivamente carregados quando dissolvidos em água. Esses íões positivos são os que contribuem para a neutralização de cargas negativas das partículas dispersas na água. A concentração de coagulante a empregar depende de vários parâmetros, como tipo e concentração dos contaminantes, pH e temperatura (20, 31).

Na floculação, as partículas de tamanho menor colidem umas com as outras no seio do líquido. Esta colisão origina a agregação das partículas menores tornando-as maiores, chamadas flocos. A formação de flocos é aumentada quando o líquido é submetido à agitação. Assim, a velocidade, o tempo e o pH são descritos como factores que favorecem a ocorrência de coagulação-floculação (20).

### **1.2.2. Sedimentação**

Na sedimentação ocorre a deposição dos flocos no fundo do recipiente/depósito. Essa deposição é influenciada pelo peso dos flocos formados, quer por adição de um coagulante quer por floculação. Com a deposição dos flocos, surge à superfície a fase sobrenadante límpida que pode ser recolhida e submetida à etapa seguinte, a filtração (20, 25).

### **1.2.3. Filtração**

Normalmente, após a etapa de sedimentação, ainda pode haver resíduos sólidos finamente dispersos no seio do líquido que, geralmente, são provenientes quer da própria água, quer dos agentes coagulantes usados. A filtração surge então como etapa para remover esses resíduos sólidos. Geralmente, é o sobrenadante que é submetido a filtração, sendo que, pode-se usar filtros de diferentes composições, como os de areia, carvão, entre outros (20, 25).

#### **1.2.4. Desinfecção**

A desinfecção é uma etapa crucial no tratamento de água. Nesta etapa pretende-se eliminar os contaminantes microbiológicos. Normalmente, o processo ocorre após filtração. Efectivamente, este processo envolve o uso de agentes químicos reativos, como o cloro. A adição do cloro à água visa eliminar todos microrganismos patogénicos, como parasitas, bactérias, fungos e vírus, que podem existir no seio do líquido. Além disso, esse agente químico é adicionado à água com vista a garantir a protecção da mesma dos germes potenciais presentes nos canos de abastecimento (25, 32).

### **1.3. Parâmetros de controlo da qualidade da água potável**

No processo de avaliação da qualidade da água potável, é frequente serem levados em consideração vários parâmetros definidos pela OMS. Esses parâmetros envolvem procedimentos como a percepção sensorial, técnicas analíticas, físico-químicas e análise microbiológica (3, 22, 32). O seu cumprimento é indispensável com vista a garantir a potabilidade da água. Os parâmetros incluem a qualidade microbiológica, turvação, aspetos químicos, aceitabilidade, entre outros. Nesta seção irão se abordar parâmetros microbiológico e turvação, por fazerem parte do foco do presente trabalho.

#### **1.3.1. Parâmetros microbiológicos**

A análise microbiológica da água potável tem por objetivo a detecção de possíveis microrganismos patogénicos. A contaminação microbiana da água é na maioria das vezes devida à excrementos de animais, incluindo os dos humanos. Esta contaminação está associada à presença de grupos coliformes. Os coliformes são constituídos por bactérias que apresentam características bioquímicas e de crescimento bem definidas. As espécies bacterianas mais comuns desses grupos pertencem aos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiela*, *Citrobacter*, *Aerobacter*. Doenças como a febre tifoide e a cólera, são descritas como sendo de origem hídrica sendo causadas por bactérias. Esses microrganismos podem ser removidos da água usando o cloro (3, 22, 33).

### 1.3.2. Turvação

A turvação é uma medida da limpidez da água expressa em unidades de turvação nefelométricas (UTN) (20). Essa limpidez é conseguida quando são removidos os materiais em suspensão, recorrendo geralmente à filtração. Este parâmetro, por si só, não representa um risco para a saúde pública (34).

A turvação é devida à presença, na água, de materiais diversos finamente divididos, como limo, argilas, grãos de areia, partículas coloidais, matéria orgânica, entre outras causas (22). Isto pode estar associado à má qualidade da fonte de água, tratamento inadequado, entre outras falhas. Assim, níveis de turvação visível a olho nu reduzem a aceitabilidade da água potável pelos consumidores (32). Geralmente, a turvação é considerada um problema de água potável quando a fonte de captação é de águas superficiais. Assim, será necessário nível de turvação para água potável < 5 UNT, segundo como recomendado pela OMS (3, 35).

### 1.4. *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* (MO) é uma árvore que cresce amplamente em muitos países tropicais e subtropicais do mundo. É cultivada para fins comerciais na Ásia, África, América do Sul e Central. Essa árvore é nativa da região dos Himalaias (nordeste da Índia, Paquistão e Nepal), estando descritas 14 espécies da mesma família (Moringaceae) distribuídas pelo globo terrestre. Contudo, para alguns autores o género *Moringa* agrupa 13 espécies (tabela 1) (12, 15, 30, 36, 37).

A MO é descrita como uma árvore de porte médio (figura 1), mas que pode atingir 7 – 15 m de altura e 20 – 45 cm de diâmetro de tronco (38-41). A MO pode ser cultivada em áreas áridas, semiáridas e quentes, com temperaturas variando entre 25 e 35 °C, podendo tolerar até 48 °C, e também às geadas fracas das áreas subtropicais. É resistente à seca e precipitação anual entre 250 e 3000 mm, podendo crescer em altitudes entre 600 - 1350 m (38, 42).

Tabela 1:Espécies de Moringa no mundo

<b>Espécies</b>	<b>País</b>	<b>Ref.</b>
<i>Moringa arborea</i> **	nativa do Quênia	(43, 44)
<i>M. borziana</i> **	nativa da Somália	(43, 44)
<i>M. concanensis</i> *	nativa do norte da Índia	(43, 44)
<i>M. drouhardii</i> *	nativa do sudoeste de Madagáscar	(43, 44)
<i>M. hildebrandtii</i> **	nativa do sudoeste de Madagáscar	(43, 44)
<i>M. longituba</i> *	nativa do Quênia, Etiópia e Somália	(43, 44)
<i>M. oleifera</i> *	nativa da região dos Himalaias	(43, 44)
<i>M. ovalifolia</i> *	nativa de Namíbia e sudoeste de Angola	(43, 44)
<i>M. peregrina</i> *	nativa da região do Corno de África, Arábia e sul do Sinai (Egipto)	(43-45)
<i>M. pygmaea</i> **	nativa da Somália	(43, 44)
<i>M. rivae</i> **	nativa do Quênia e Etiópia	(43, 44)
<i>M. ruspoliana</i> **	nativa do Quênia e Etiópia	(43, 44)
<i>M. stenopetala</i> *	nativa do Quênia, Etiópia e Somália	(43, 44)

\*espécies comuns; \*\*espécies raras



Figura 1: Árvore de MO

A MO apresenta raiz axial e tuberculosa, folhas compostas e flores fragrantas. As sementes são globóides, quando secas apresentam cascas geralmente de cor acastanhada a tender para preto (figura 2) (38, 39, 46).

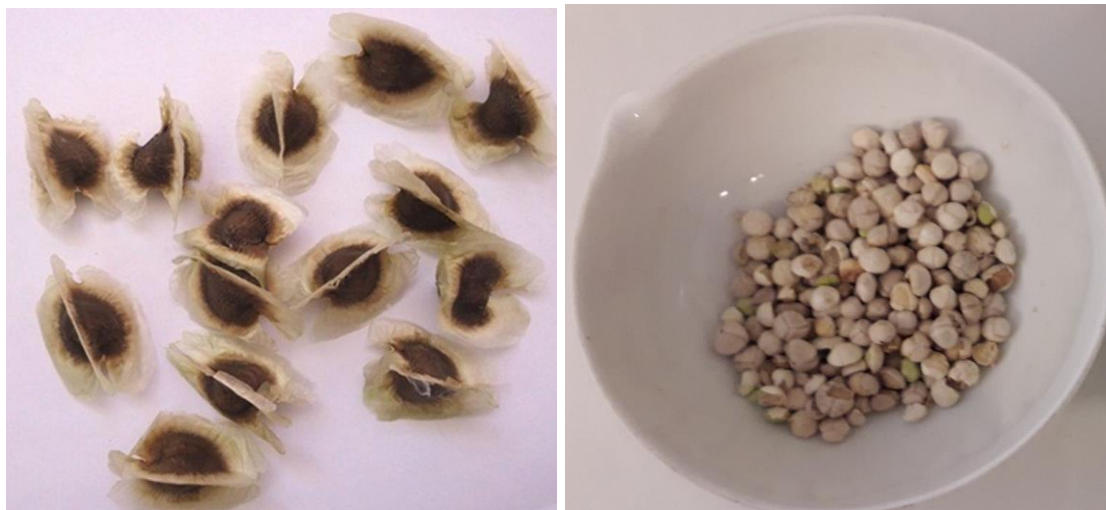


Figura 2: Sementes de MO

#### 1.4.1. Composição fitoquímica

Para além dos componentes estruturais (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) e dos sais minerais (Fe, Ca, Mn, Mg, Na, P, Zn e K) e vitaminas (A, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub>, C e K) a MO é uma fonte importante de metabolitos secundários como alcalóides, saponinas, taninos, fitoesteróis, polifenóis (flavonóides e ácidos fenólicos), glucosinolatos e terpenos (tabela 2) (14, 15, 44, 47, 48).

Tabela 2: Metabolitos secundários de MO

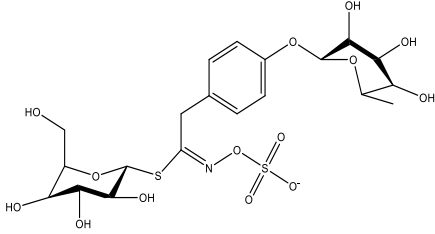
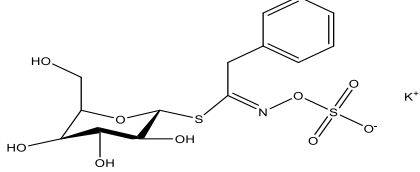
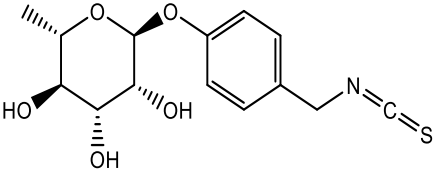
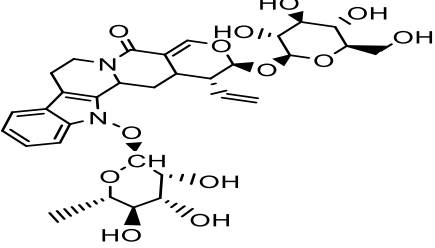
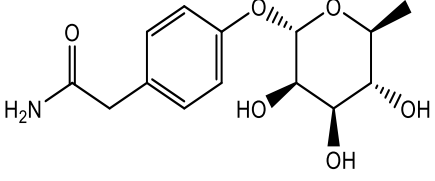
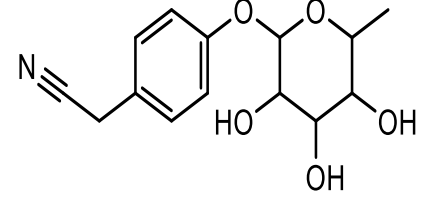
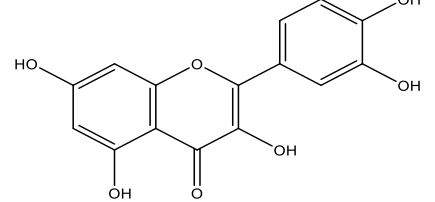
Metabolitos	Compostos identificados	Parte da planta	Referências
Glicosinolatos	Glicosinolato de 4- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopiranosiloxi-benzilo	Caule, folhas, flores, vagens e sementes	(44, 49)
	Glicosinolato de benzilo	Raizes	
Flavonóides	Quercetina	Folhas, sementes	(15, 44, 50)



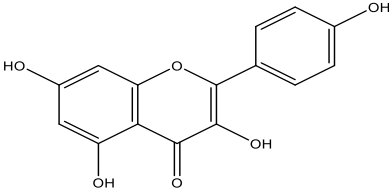
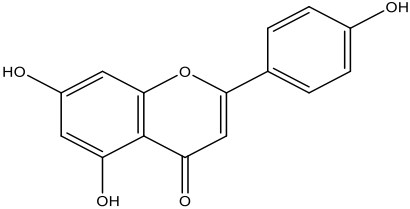
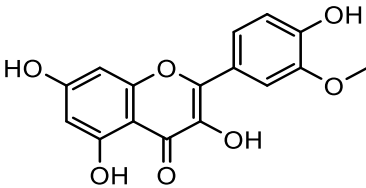
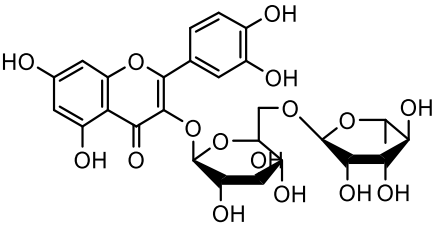
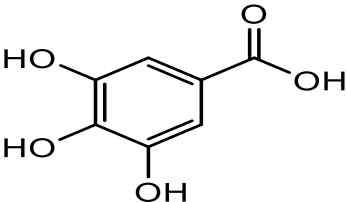
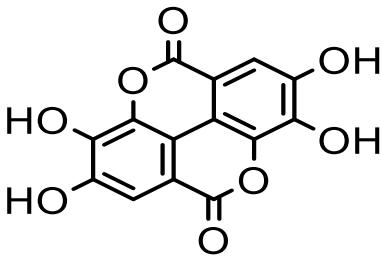
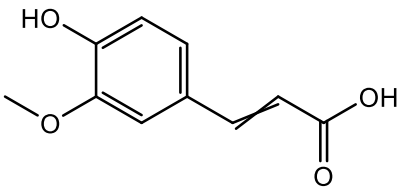
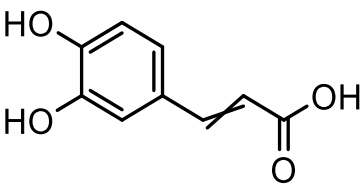
	Kaempferol		
	Apigenina		
	Isoramnetina		
	Rutina		
	Catequina		
	Epicatequina		
Ácidos fenólicos	Ácido gálico	Folhas	(49)
	Ácido elágico		
	Ácido ferúlico		
	Ácido cafeico		
	Ácidos <i>o</i> -cumárico e <i>p</i> -cumárico		
	Ácido clorogénico		
	Ácido gentísico		
	Ácido sirínico		
	Ácido sinapínico		
Alcalóides	Vincosamido de <i>N</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopiranosil	Folhas	(43, 49, 51)
	Marumosidos A e B		
	Niazirina		
Saponinas		Folhas	(43, 49)
Taninos		Folhas	(43, 49)
Fitoesteróis	$\beta$ -Sitosterol	Caule, folhas, sementes	(49)
	Campesterol		
	Estigmasterol		
Terpenos	$\beta$ -Caroteno	Folhas	(43)
	Luteína		

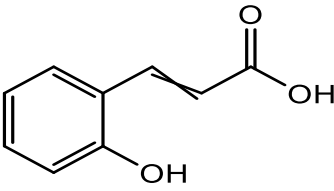
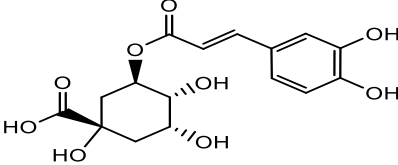
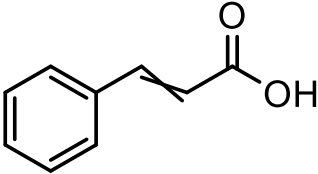
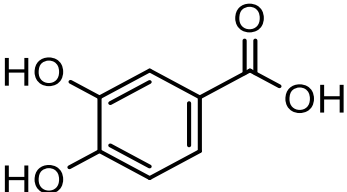
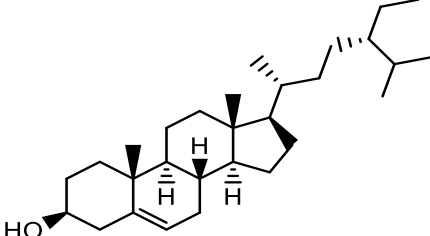
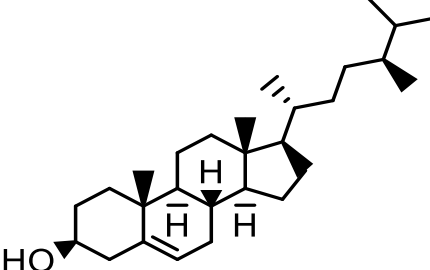
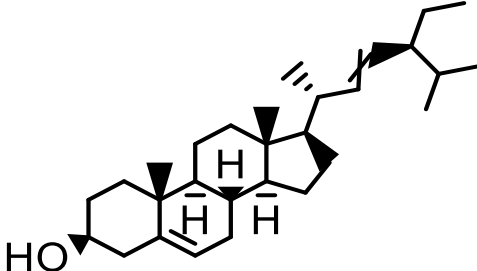
Está descrito que a MO contém cerca de 36 constituintes fitoquímicos com acção anti-inflamatória, 46 com atividade antioxidante e mais de 90 nutrientes reconhecidos (14). As fórmulas de estruturas químicas da maioria destes metabolitos secundários são apresentados da tabela 3.


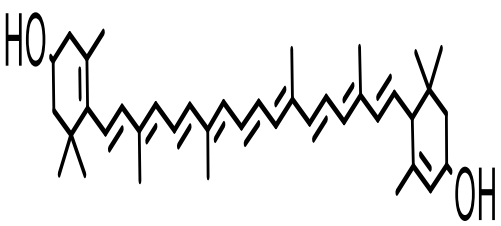
Tabela 3: Fórmulas de estruturas de metabólitos secundários de MO

	Nome	Estrutura	Ref.
Glicosinolatos	Glucomoringina <sup>1</sup>		(52, 53)
	Glicosinolato de benzilo		
Isotiocianato	Isotiocianato de 4- $\alpha$ -L-ramnosiloxi-benzilo		(54)
Alcalóides	Vincosamido de N- $\alpha$ -L-ramnopiranosil		(43, 51)
	Marumosido A		
	Niazirina		
Flavon	Quercetina		(52, 53)

<sup>1</sup> Glicosinolato de 4-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi-benzilo

	Kaempferol		
	Apigenina		
	Isoramnetina		
	Rutina		
Ácidos fenólicos	Ácido gálico		(52, 53)
	Ácido elágico		
	Ácido ferúlico		
	Ácido caféico		

	Ácido <i>o</i> -cumárico		
	Ácido clorogénico		
	Ácido cinâmico		
	Ácido protocatecuíco		
Fitoesteróis	$\beta$ -Sitosterol		(55, 56)
	Campesterol		
	Estigmasterol		

Terpenos	$\beta$ -Caroteno		(57-59)
	Luteína		

#### a. Glicosinolatos

Os glicosinolatos (GS) são compostos tiossacarídicos aniônicos e heterogêneos de ocorrência natural, encontrados principalmente nos vegetais das famílias botânicas Brassicaceae e Moringaceae (60, 61). É uma classe de compostos solúveis em água, estáveis ao calor, não voláteis, que apresentam átomos de enxofre e nitrogênio na sua estrutura e uma cadeia lateral derivada de aminoácidos, bem como uma ligação tioglicosídica ao carbono de uma oxima sulfonada (62, 63). São hidrolisados pela mirosinase produzindo D-glicose e vários produtos de degradação, particularmente os isotiocianatos, dependendo da parte da aglicona (60). Portanto, os GS representam um grupo importante de metabolitos secundários característicos da família Moringaceae. Contudo, o teor de GS varia em função do órgão da planta devido a factores genéticos, ao meio ambiente e nutrientes das plantas (64). Assim, está descrito que os caules de MO contêm concentrações mais baixas de GS do que as folhas e sementes (61).

Os GS da MO são constituídos por um anel benzénico ligado a duas moléculas de ramnose. Estes metabolitos da MO têm potencial anti-inflamatório, anticancerígeno e hipoglicémico, sendo o glicosinolato de 4-O- $\alpha$ -ramnopiranosiloxi-benzilo e glicosinolato de benzilo alguns dos exemplos destes compostos (65).

#### b. Flavonóides

Os flavonóides são metabolitos secundários amplamente distribuídos em todas as plantas, estando descrito que apresentam várias funções metabólicas (66). Também são

considerados como pigmentos responsáveis pela coloração da maior parte das flores, frutas e sementes (67).

Estes metabolitos são constituídos por um grande grupo de compostos polifenólicos com uma estrutura base de 15 carbonos distribuídos por 2 anéis aromáticos ligados por uma ponte de 3 carbonos, que podem formar um terceiro anel heterocíclico (68).

São classificados em sete classes principais (figura 3): chalconas, flavonas (por exemplo, a flavona, a apigenina e a luteolina), flavonóis (por exemplo, a quercetina, o kaempferol, a miricetina e a fisetina), flavanonas (por exemplo, a flavanona, a hesperetina e a naringenina), flavandióis, antocianinas e proantocianidinas ou taninos condensados (68, 69). Contudo, os flavonóis são descritos como uma das classes mais importante, pois, para além de serem os ancestrais e mais difundidos, apresentam amplas e potentes atividades fisiológicas (67). Estes compostos podem existir sob a forma livre (agliconas), porém comumente aparecem ligados a uma fração de açúcar (glicósidos) (66). Geralmente, os compostos como o kaempferol, a quercetina e a isoramnetina, são descritos como dos flavonóides mais comuns, existindo em abundância nos tecidos vegetais (70).

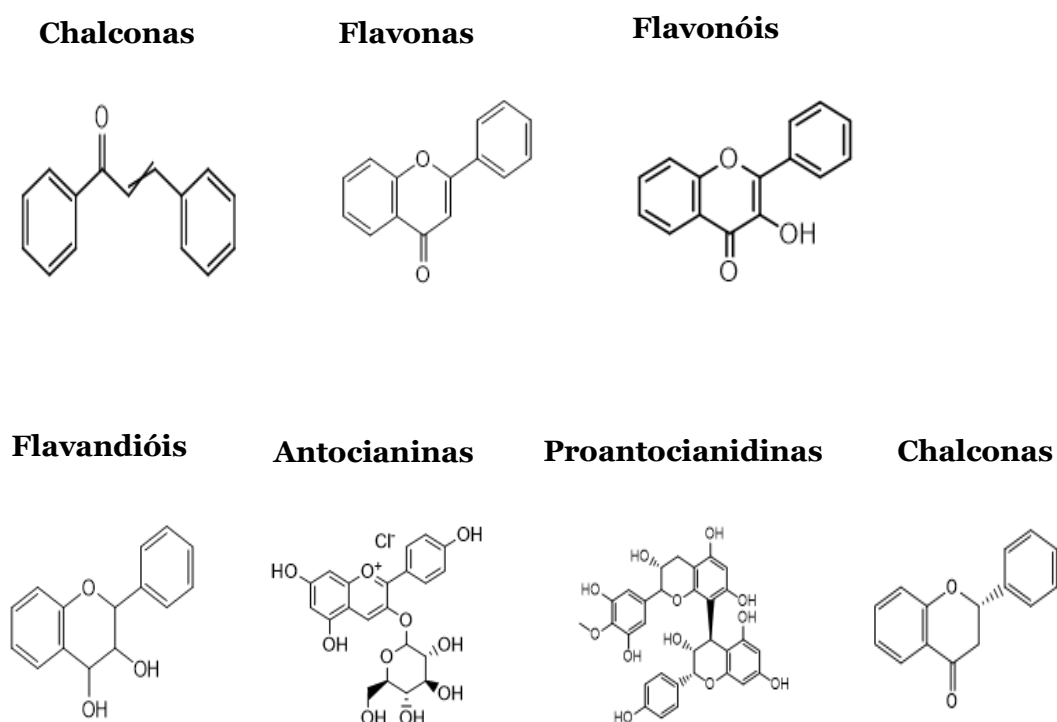


Figura 3: Classes principais de flavonóides

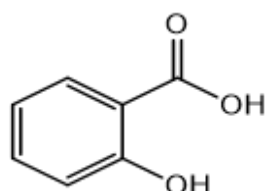
As funções biológicas atribuídas aos flavonóides resultam de efeitos bioquímicos diversos que podem ser aproveitados para o tratamento de várias doenças, como o cancro, a doença de Alzheimer e aterosclerose. De salientar as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-mutagénicas e anti-carcinogénicas, assim como a sua capacidade de modular as principais funções das enzimas celulares. São também inibidores potentes de várias enzimas, como a xantina oxidase, a ciclo-oxigenase, a lipoxigenase e a fosfoinositida 3-quinase, entre outras (67, 68). A elevada atividade antioxidante atribuída à MO é devida, principalmente, ao seu alto teor em flavonóides (71). Os flavonóides mais comuns da MO são a rutina, a quercetina, a ramnetina, o kaempferol, a apigenina e a miricetina (tabela 3) (15).

### c. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabolitos secundários que fazem parte de uma das principais classes de compostos fenólicos de plantas. Na sua estrutura apresentam um grupo ácido carboxílico e um grupo fenol, sendo por vezes designados por ácidos fenolcarboxílicos. Estes compostos fitoquímicos podem ser encontrados nas sementes, frutos e maioritariamente nas folhas (68).

Em função dos ácidos de que derivam, os ácidos fenólicos são divididos, em dois subgrupos (figura 4): ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (72). Os ácidos fenólicos mais comuns provenientes do hidroxicinâmico são os ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico e sinápico. Ao passo que, os provenientes do ácido hidroxibenzóico são os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e sirínico (73).

**Ácido hidroxibenzóico**



**Ácido hidroxicinâmico**

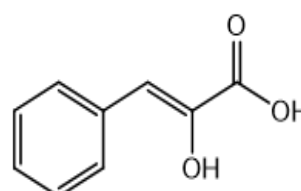


Figura 4: Subgrupos dos ácidos fenólicos

Uma das características inerentes a estes compostos fenólicos é a sua atividade antioxidante (74). Esta característica é atribuída à reatividade do hidroxilo ligado ao anel aromático e ao grupo carboxílico (75). O mecanismo que explica essa ação consiste, basicamente, na estabilização dos radicais produzidos nas células por doação ou captação de eletrões, agindo assim como antioxidantes (39, 76). Sendo componentes antioxidantes ativos, são responsáveis por diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória, anti-aterosclerótica e antidiabéticas, bem como na inibição de afeções por outros danos oxidativos ocorridos em doenças cardiovasculares e doenças oncológicas (77, 78). Na MO, estes metabolitos são geralmente abundantes nas folhas, mas também podem estar nas sementes e frutos (39, 44). Os ácidos fenólicos mais comuns da MO são ácidos gálico, elágico, ferúlico, caféico, o-cumárico, clorogénico, cinâmico e protocatecúico (tabela 3) (14).

#### d. Alcalóides

Os alcalóides são substâncias naturais que contêm átomos de nitrogénio básicos na sua estrutura (79). Esses metabolitos são derivados principalmente a partir do metabolismo de aminoácidos e classificam-se em alcalóides verdadeiros, protoalcalóides, pseudoalcalóides, entre outros (80). Os átomos de nitrogénio da sua estrutura podem ocorrer na forma de amina primária ( $\text{RNH}_2$ ), secundária ( $\text{R}_2\text{NH}$ ) ou terciária ( $\text{R}_3\text{N}$ ) (43).

Os alcalóides ocorrem naturalmente nas plantas, mas também são abundantes em microrganismos, organismos marinhos e animais (79).

Vários alcalóides têm sido utilizados na terapêutica estando associados a várias atividades biológicas, como eméticos, anticolinérgicos, antitumorais, diuréticos, simpatomiméticos, antivirais, anti-hipertensores, hipnoanalgésicos, antidepressivos, miorelaxantes, antitussígenos, antimicrobianos e anti-inflamatórios (51, 80). Embora incomum, a presença de vários alcalóides foi confirmada em MO, sendo o mais comum o vincosamido de *N- $\alpha$ -L-ramnopiranosil* (tabela 3). Entre os alcalóides considerados menos comuns, estão a niazirina e os marumosidos A e B (51).

#### e. Taninos

Os taninos são biomoléculas polifenólicas solúveis em água, presentes em muitos vegetais, apresentando propriedades adstringentes e sabor amargo (81). Para além de apresentarem grupos oxidrilos nas suas estruturas polifenólicas, podem exibir outros



grupos funcionais, facto que os confere a capacidade de estabelecer ligações cruzadas com proteínas e outras macromoléculas (82). De acordo com a sua estrutura e propriedades químicas, os taninos são divididos em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis e condensados (83).

Os taninos exibem várias propriedades biológicas, como anti-neoplásica, antiaterosclerótica, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antibacteriana e atividade de replicação anti-VIH. Estes metabolitos estão presentes na MO em concentrações reduzidas, sendo muito abundantes sobretudo nas folhas (43).

#### f. Saponinas

As saponinas são metabolitos secundários de natureza glicosídica amplamente distribuídos nas plantas, em alguns animais invertebrados marinhos e em insetos (84, 85). Esses metabolitos são caracterizados pela formação de espuma, tendo propriedades detergentes e tensioativas. Na sua estrutura contêm uma aglicona esteróide ou triterpenóide e uma ou mais cadeias de açúcares (86, 87). Essa diversidade estrutural confere importantes propriedades físico-químicas e biológicas, como a capacidade formação de espuma e a lise celular dos eritrócitos (84). Esses metabolitos têm aplicações na indústria, como para o fabrico de sabonetes, venenos para peixes, moluscidas, entre outras. Além disso, as saponinas têm sido atribuídas amplas propriedades biológicas e farmacológicas, como a modificação da permeabilidade da membrana celular, expectorante, anti-inflamatória, vasoprotetora, hipocolesterolémica, imunomoduladora, hipoglicémica, antifúngica, antiparasitária e muitas outras (84, 85).

As folhas de MO são descritas como a fonte principal destes metabolitos. Assim, a formação de espuma quando da preparação de extractos aquosos usando folhas ou sementes, tem sido a característica mais evidente, sugerindo assim a presença de saponinas em MO (43).

#### g. Fitoesteróis

Os fitoesteróis são álcoois esteróides vegetais (88). Essa família engloba mais de 100 fitoesteróis diferentes e mais de 4000 tipos de triterpenos (89) Estruturalmente os

fitoesteróis são semelhantes ao colesterol, porém são produzidos por plantas e incluem um grupo metilo ou etilo em C-24 e uma dupla ligação em C-22 (55).

Entre as funções dos fitoesteróis, está a propriedade de redução dos níveis de colesterol, estando descrito que o consumo dos mesmos está associado a uma redução de 20% das doenças coronárias (90, 91). Encontram-se descritos mais de 200 fitoesteróis. O  $\beta$ -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol são dos mais frequentes e abundantes, tal como acontece na MO (92).

#### h. Terpenos

Os terpenos constituem a maior classe de produtos naturais com mais de 55 mil compostos conhecidos e que diferem pela sua diversidade estrutural (58). Eles ocorrem em todos os organismos vegetais, sendo a grande maioria encontrada em plantas superiores (57). Em função da estrutura carbonada, estes metabolitos são classificados em hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (58).

Os terpenos apresentam importantes atividades biológicas, como analgésica, anticonvulsivante e cardiovascular (59). A luteína é o terpeno mais comum em MO, estando descrito também a presença de  $\beta$ -caroteno (tabela 3), entre outros (49).

#### 1.4.1.1. Composição fitoquímica das sementes

As sementes de MO contêm importantes metabolitos bioativos, como alcalóides, glucosinolatos, isotiocianatos e tiocarbamatos, ácidos fenólicos, flavonóides e fitoesteróis (tabela 3) (50). Além disso, está descrito que as sementes contêm 19 – 47% de óleo, 10 – 52% de proteínas, 5 – 5,5 % de hidratos de carbono e 2,5 – 20% de glucosinolatos (65, 93). O óleo contém aproximadamente 13% de ácidos gordos saturados (sendo o ácido palmítico o mais abundante) e 82% de ácidos gordos insaturados, sendo o ácido oleico o mais predominante do grupo na ordem dos 70% (94, 95).

Também, estão descritos outros compostos identificados nas sementes, como moringina, 3-O-(6-O-oleoil- $\beta$ -D-glicopiranosil)- $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-

glucopiranosídeo, glicerol-1-9-octadecenoato, roridina E, estrofantidina, glucosinalbina, glucorafanina, glucoiberina (50, 96, 97).

#### 1.4.2. Aplicações

A espécie MO é, entre todas da família Moringaceae, a mais utilizada e estudada (98). A sua grande valia é devido a importância nutricional (folhas, frutos verdes, flores e sementes torradas), medicinal (todas as partes da planta), ao seu valor como forragem (folhas, frutos e sementes), ao seu valor como condimento na culinária (principalmente as raízes), ao seu valor para indústria cosmética e ambiental (tratamento de águas). É utilizada em várias regiões de África, América e Ásia (10, 39, 47). Nesta seção irão se abordar aplicações relacionadas ao interesse do presente trabalho, como utilidades medicinal (potencial antimicrobiano) e para o tratamento de águas.

##### 1.4.2.1. Aplicação medicinal

A MO é amplamente utilizada no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, bem como para doenças sexualmente transmissíveis e diarreia (99, 100). Essa atividade antimicrobiana é exibida pela maioria das frações da planta (101).

Vários estudos feitos *in vitro* referem que extratos de raízes, caules, folhas, flores, vagens e sementes de MO apresentam propriedades antimicrobianas (14). Assim, está demonstrada a capacidade inibitória para bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e *Staphylococcus epidermidis*) e para bactérias Gram-negativas (*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) isoladas de amostras clínicas (102-105). Essa capacidade antibacteriana tem sido atribuído ao benzil-isotiocianato, que atua inibindo o crescimento bacteriano ao inibir os mecanismos de sínteses enzimática e membranas (106, 107). Por outro lado, esse efeito dos extratos de MO também é atribuído ao ácido gálico e aos taninos, que inibem o *Vibrio* spp (108, 109).

Também, está demonstrada a capacidade inibitória dos extratos obtidos a partir das folhas, sementes, vagens e raízes de MO para fungos, como *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Microsporium gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *C. albicans* (14, 109-111). Além disso, está descrito que o óleo essencial da semente tem efeito inibidor sobre fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus niger* (14). A atividade antifúngica deste óleo essencial é atribuída aos polifenóis, hidrocarbonetos

(hexacosano, pentacosano, heptacosano), ao álcool terpénico fitol e ao fenol terpénico timol (112).

#### **1.4.2.2. Potencial no tratamento de água**

De entre as diferentes aplicações da MO, uma das suas potencialidades mais promissoras é o efeito coagulante das sementes, que são utilizadas no tratamento de água (12). Este processo é de importância primordial para remoção de impurezas dispersas e dissolvidas. As sementes de MO, dotadas de propriedades anticoagulantes, surgem assim como uma alternativa orgânica e ecológica aos sais de alumínio e de ferro no tratamento de águas e efluentes (113). As sementes têm a capacidade de melhorar a qualidade da água, reduzindo a matéria orgânica e carga microbiana, sendo, portanto, agentes coagulantes especialmente adequados para serem usados em comunidades rurais, substituindo outros coagulantes mais caros, mais poluentes e até nocivos para a saúde, como é o caso do sulfato de alumínio e de polímeros organo-sintéticos (29).

As sementes pulverizadas podem promover a redução da turvação (cerca de 90%) e da carga bacteriana (90 – 99%), bem como a cor da água, alcalinidade e dureza (114). A eficiência para a redução da turvação é dependente da turvação inicial da água (115, 116). Quanto mais elevada for a turvação inicial, maior será a eficiência de atuação das proteínas coagulantes (116). Assim, o uso de sementes de MO é considerado inadequado para o tratamento de água, quando a turvação inicial for consideravelmente baixa (117, 118).

#### **1.5. Tratamento de água com sementes de *Moringa oleifera***

O primeiro relato de utilização de MO para o tratamento de água foi feito por Jahn após ter observado o uso das sementes desta planta por mulheres do Sudão, que as empregavam para a clarificação da água turva do rio Nilo (12, 119). Desde então, a MO ganhou o interesse de muitos pesquisadores e tem sido extensivamente estudado no tratamento de água como coagulante e desinfetante, tanto a nível laboratorial quanto a escala mais alargada (120). A eficiência da MO para esse propósito está concensualmente aceite e, efectivamente, essa propriedade é atribuída às sementes (116, 121). Assim, como recurso amplamente disponível em muitos países em desenvolvimento, o uso para a obtenção de água potável tem sido recomendado como uma alternativa apropriada para lidar com a questão de altos custos operacionais associados aos métodos convencionais (122).

Na literatura científica, estão descritas basicamente três formas de utilização e/ou preparação das sementes de MO para o tratamento de água, nomeadamente o seu extrato (35, 120), o uso das sementes em pó (123) e saquetas contendo este pó (8, 124). A utilização do pó tem a inconveniente de contribuir para o aumento da matéria orgânica na água tratada tornando-a mais turva (125), o que pode ser evitado recorrendo ao uso de extratos (121, 126).

Tradicionalmente, o pó de sementes de MO é geralmente obtido usando pedras de moagem. Esta técnica consiste em friccionar uma pedra sobre a outra esmagando totalmente as sementes (127). O pó obtido é adicionado à água turva e agitado manualmente ou usando colheres durante alguns minutos, em seguida deixa-se em repouso por uns instantes e a água límpida é cuidadosamente decantada (97). No Sudão usa-se o pó colocado num saco de pano com um fio preso para agitar. Além do uso de sementes em pó, outro procedimento é obter um extrato aquoso, que consiste em adicionar a uma pequena quantidade de água para extrair as substâncias coagulantes, com agitação por 10 min, seguida pela adição do extrato à água turva a tratar (128).

### **1.5.2. Componentes ativos com propriedades coagulantes**

Os constituintes ativos das sementes de MO com propriedades coagulantes são essencialmente as proteínas (129). Estas são proteínas de características catiónicas diméricas (também chamadas proteínas hemaglutinantes ou lectinas), solúveis, de difícil desnaturação em solução, de baixa massa molecular na faixa de 6 – 16 kDa e um ponto isoelétrico entre 10 – 11 (8, 129-131). Assim, está descrito que as proteínas coagulantes podem ser obtidas por extração aquosa usando sementes desengorduradas ou cruas (97).

#### **1.5.2.1. Mecanismo de ação**

O mecanismo de coagulação atribuído às proteínas das sementes de MO está relacionado com as suas cargas elétricas catiónicas. Assim, está descrito que esse mecanismo consiste numa combinação de adsorção e neutralização de cargas ou ligações interpartículas, permitindo uma precipitação efetiva (130). Desta forma, quando o pó das sementes de MO é adicionado à água cede proteínas hidrossolúveis, que quando em contacto com partículas dispersas e devido a sua carga positiva, atuam como coagulantes de matéria orgânica presente na água, atraindo as partículas negativamente carregadas como barro, argila e bactérias (8, 97, 132). Broin *et al*, referem também que a atividade floculante

das proteínas de sementes de MO é devido a sua baixa massa molecular e alta densidade de carga positiva (131).

### **1.6. Uso tradicional de sementes de MO em Moçambique**

Em Moçambique, embora não esteja documentado, tenho conhecimento que o processo tradicional de preparação de sementes é feito da maneira seguinte: as sementes são recolhidas, secas ou maduras. As sementes secas são trituradas em almofariz de madeira (que normalmente é usado para triturar arroz, milho ou outros cereais) até obter o pó, o qual é tamisado por meio de tamis tradicional (ceifa). Uma certa quantidade de aproximadamente ½ colher de café deste pó é adicionado à 1L de água que se agita vigorosamente pelo menos durante 5 min e deixa-se em repouso por algum tempo não superior a 1h. A água é cuidadosamente decantada e/ou filtrada usando pano de algodão.

Outra forma de utilização tradicional é usando seu extrato aquoso, que consiste em adicionar certa quantidade de pó a 500 ml de água, que se agita e deixa-se em repouso nas mesmas condições como referido anteriormente. O extrato é decantado e/ou filtrado usando panos de algodão e é usado a seguir. Deste extrato são retirados com uma seringa ou outro medidor (geralmente usam-se tampas volumétricas de frascos de xaropes) 5 ml e adicionados a 1L de água a tratar. Quando se utilizam sementes maduras estas são previamente postas a secar ao sol e segue-se o processo de preparação já descrito.

Assim, o desenvolvimento de cápsulas teve em consideração à realidade do meio rural de Moçambique e tem como objetivo ter disponível durante todo ano e, de modo acessível, uma forma pronta a usar numa quantidade adequada. As cápsulas serão abertas e o conteúdo será adicionado à 1 L de água a tratar.

## **1.7. Objetivos do trabalho**

### **1.7.1. Gerais**

- ❖ Preparar cápsulas de pó de sementes de Moringa como forma de otimizar o tratamento de água em comunidades rurais de Moçambique.

### **1.7.2. Específicos**

- ❖ Estudar preliminarmente a composição dos extratos das sementes;
- ❖ Avaliar a eficiência das sementes para redução da turvação da água usando pó, granulado e extrato aquoso;
- ❖ Avaliar a eficiência anti-microbiológica das sementes usando a *E. coli*;
- ❖ Preparação de cápsulas de pó das sementes de *Moringa oleifera*.

## CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Para a realização desta dissertação, foram utilizados os materiais (solventes, matérias-primas e micro-organismos) apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Materiais usados

<b>Materiais</b>	<b>Utilização</b>	<b>Origem/Lote/Fabricante</b>
Sementes de MO	Preparação de cápsulas	Moçambique
Caulino	Preparação da água turva	1020/LTF
Acetato de etilo	Extração	I662768245
Etanol anidro	Extração	V9H082039I
<i>n</i> -hexano	Extração	P9M57199M
Tolueno	Diluição de extrato	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ensaio microbiológico	Lab. de microbiologia
Soro fisiológico estéril	Ensaio microbiológico	»
Água com terra	Ensaio microbiológico	LTF
Lactose	Formulação	0906/tabletose®
Polivinilpirrolidona (PVP)	Formulação	181257-N-1/ acofarma
Amidoglicolato de sódio	Formulação	62789-1-1
Estearato de magnésio	Formulação	62861
Cápsulas n° 0	Enchimento de cápsulas	180985-CA-2/ acofarma

### 2.2. Material botânico

As sementes de MO foram recolhidas em Moçambique, nos bairros periféricos da cidade de Nampula, província de mesmo nome, situado ao norte do país. A recolha das sementes aconteceu entre os meses de julho – setembro de 2019.



Foram recolhidas sementes secas e maduras. Todas as sementes foram secas ao sol por 2 semanas. A remoção das cascas das sementes (figura 5) foi feita manualmente (figura 6). Após isso, foram acondicionadas em frascos de plástico e à temperatura ambiente.



Figura 5: Sementes de MO com casca



Figura 6: Sementes de MO sem casca

### 2.3. Métodos

Tabela 5: Métodos e equipamentos usados

<b>Métodos</b>	<b>Equipamento</b>	<b>Marca/modelo</b>
Pulverização	Almofariz de porcelana	
	Trituradores automáticos	Moulinex Vorwerk
Tamisação	Tamises 0,710 – 1,4 mm	Retsch
Mistura	Almofariz de vidro	
	Misturador automático	TURBULA
Determinação de humidade	Moisture determination balance	AD – 4713
Determinação da massa volúmica	Tap density tester	
Determinação de ângulo de repouso	ERWEKA	ERWEKA GT
Granulação	Granulador ERWEKA	ERWEKA FGS
Encapsulação	Encapsuladora manual	
Uniformidade de massa	Balança analítica	Radwag AS 220.R2
Desagregação	Desintegration tester	ED-2L
GC-MS	GC-MS Hewlett packard	Agilent 6890N
Centrifugação	Centrífuga	eppendorf/ centrifuge 5804
Evaporação de solventes	Block heater	SBH200D/3
Espectrofotometria no Infravermelho	Espectrofotómetro FTIR	Thermo Scientific/ Nicolet is10
Espectrofotometria no UV - Vis.	Espectrofotómetro UV-vis	Varian/ CARY 1E
Contagem direta de microrganismos em placas		

## 2.4. Perfil cromatográfico (GC-MS) e espectrofotométrico (FTIR e UV-Vis) das sementes

Este estudo foi realizado com intuito de obter o perfil cromatográfico e espectrofotométrico das sementes de MO analisando o pó e extractos obtidos a partir das sementes. As sementes foram previamente pulverizadas de acordo com o descrito em 2.5.1. Os solventes utilizados abrangeram uma gama alargada de polaridades, nomeadamente o *n*-hexano, o acetato de etilo e o etanol anidro.

### 2.4.1. Extração com solventes orgânicos

Pesaram-se 6 x 1 g do pó de MO para “tubos de centrífuga” de 25 mL. Procedeu-se à extração com *n*-hexano (tubos 1a e 1b), acetato de etilo (tubos 2a e 2b) e etanol anidro (tubos 3a e 3b). Adicionaram-se 10ml de cada solvente. Os tubos foram submetidos a agitação usando um agitador orbital *Multi-Rotator (Multi RS-60)* durante 30 min (figura 7). Após agitação, procedeu-se à centrifugação a 2500 rpm durante 15 min usando a centrífuga *eppendorf (Centrifuge 5804)*. O sobrenadante foi transferido para tubos de vidro de 5 mL de capacidade e os solventes evaporados a 55,6°C com auxílio de uma placa de aquecimento *block heater (SBH200D/3)* (figura 8) sob corrente de azoto e posterior secagem em estufa a 40°C durante 24h. Os extratos (figura 9) obtidos foram conservados ao abrigo da luz a -20 °C até análise por GC-MS, UV-Vis e FTIR.



Figura 7: Extração de pó das sementes de MO

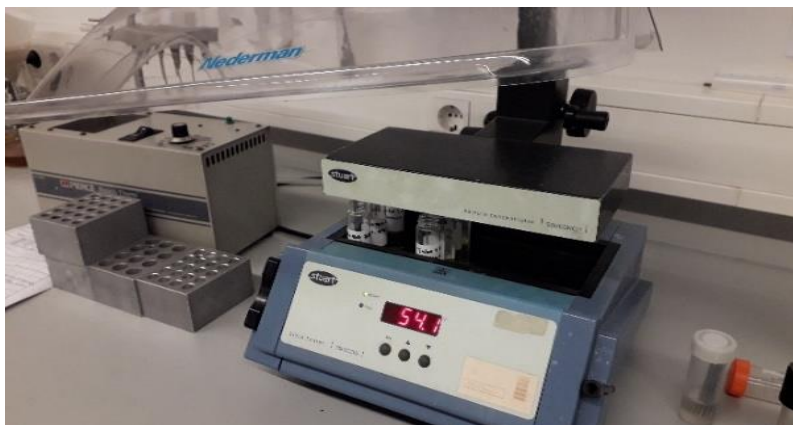


Figura 8: Evaporação de solventes

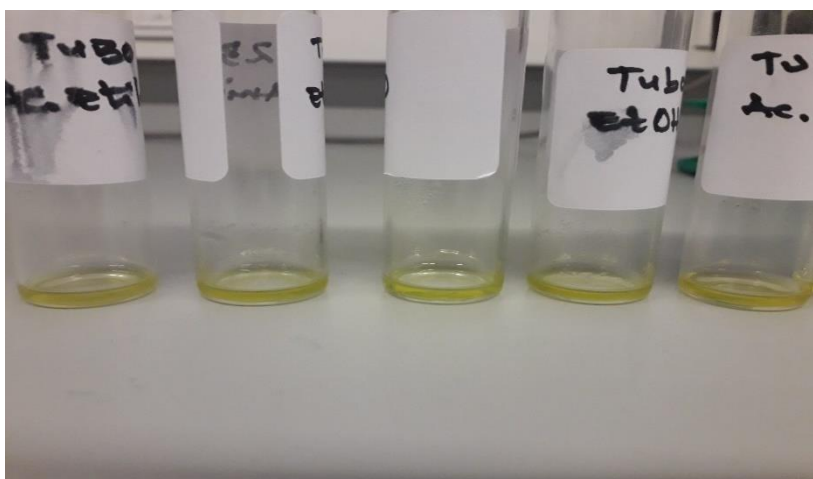


Figura 9: Extratos de pó das sementes de MO

#### 2.4.2. Extração com água

Pesaram-se 500 mg de pó de MO usando balança analítica Radwag AS 220.R2 e adicionou-se a um tubo de vidro no qual continha 25 ml de água destilada. Agitou-se a mistura por 8h usando o agitador referido na secção 2.4.1 e nas mesmas condições de agitação. Deixou-se em repouso durante 5 min. Na centrífuga também foram usadas as mesmas condições de centrifugação da secção anterior. O sobrenadante foi filtrado usando algodão lavado previamente com o mesmo solvente (água). O filtrado foi usado para análise por espectrofotometria do UV-Vis.

### 2.4.3. Análise em GC-MS

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo gasoso, Agilent 6890N (Agilent Technologies, USA), acoplado a um detector de massa (figura 10) quadrupolo Agilent 5973 (Agilent Technologies, USA), operando no modo de ionização eletrônica. As injeções foram realizadas em modo “Splitless” a 280 °C e o tempo de purga foi de 1 minuto. A separação foi realizada numa coluna cromatográfica com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária (J&W). O forno foi programado para iniciar a 80 °C, mantido durante 0,5 min, incremento de 8°C/min até 215°C, incremento de 20°C/min até 300°C mantido 2 min. O hélio foi o gás de arraste e foi usado um fluxo de 1 ml/min. As temperaturas da linha de transferência, fonte de íons e quadrupolo MS foram 250, 230 e 150°C, respectivamente. A detecção foi feita por impacto electrónico a 70 eV, em modo de varrimento contínuo (numa gama de massas de m/z 50 a m/z 600). Os analitos foram identificados e confirmados pelo banco de dados da biblioteca NIST V2.2 (EUA). Foi utilizado o agilent chemstation para coleta e processamento de dados.

Os extratos foram diluídos usando tolueno e injectados sem derivatização prévia.



Figura 10: GC-MS

### 2.4.4. Análise FTIR do pó de sementes de MO e extratos orgânicos

Pesaram-se cerca de 2 mg do pó e prepararam-se discos de brometo de potássio anidro (KBr) de qualidade espectroscópica. Usou-se um molde de 13 mm de diâmetro (*Specac Die PT n° 3000*) e uma prensa hidráulica *Specac*. Registaram-se os espectros no software *OMNIC 8.3.103* do aparelho *Thermo Scientific (NICOLET iS10)* (figura 11).

Os extratos referidos na secção 2.4.1 foram analisados colocando uma pequena gota entre discos de KBr, usando o mesmo espectrofotómetro, para registar os espectros.



Figura 11: Espectrofotómetro FTIR

#### 2.4.5. Análise UV-Vis dos extratos orgânicos e aquoso

Os espectros foram registados no espectrofotómetro de feixe duplo *Varian (CARY 1E)* (figura 12) usando o software *Cary WinUV*, usando os respetivos solventes de extração como compensação. Os extratos foram analisados em cuvetes de quartzo com um caminho óptico de 1 cm e volume total de 3 ml. Após registo dos espectros na gama de 200 a 800 nm, registaram-se novos espectros após adição de reagentes de deslocamento: 2 gotas de NaOH 10% (m/v), seguida de 2 gotas de HCl 3M.



Figura 12: Espectrofotómetro UV-Vis

## 2.5. Obtenção e caracterização do pó das sementes de MO

A obtenção e caracterização do pó incluiu a pré-formulação e consistiu na pulverização das sementes, tamisação, caracterização física e mecânica do pó.

### 2.5.1. Pulverização e tamisação

As sementes foram pulverizadas usando almofarizes de porcelana (figura 13) e um triturador automático *Moulinex A320R1*. Posteriormente, para triturar os resíduos obtidos usando *Moulinex*, utilizou-se *VORWERK TM5*. O pó foi tamisado usando tamises de 0,710 mm e 1,4 mm de abertura de malha.



Figura 13: Pulverização por almofariz

### 2.5.2. Determinação da humidade

Na balança para determinação de humidade (*Infrared moisture determination balance AD-4713*), pesou-se 1,05 g da amostra, o qual foi espalhado cuidadosamente no prato de alumínio. As condições de ensaio foram de 105 °C, 15 minutos. Ao fim do tempo, efetuou-se a leitura da percentagem de humidade.

### 2.5.3. Caracterização mecânica

Com intuito de estudar o comportamento do conjunto de partículas da amostra, realizaram-se os seguintes procedimentos:

#### 2.5.3.1. Determinação da massa volúmica aparente e do IC

De acordo com a técnica descrita na Farmacopeia Portuguesa 9, fixou-se a proveta de 100 ml no suporte *Tap density tester* e introduziu-se sem compactar, 30 g da amostra do pó. Procedeu-se a leitura do volume aparente não compactado, com aproximação de 1 ml. De seguida, submeteu-se à 10, 500 e 1250 batimentos, registando os valores de volumes (máximo e mínimo)  $V_{10}$ ,  $V_{500}$  e  $V_{1250}$ . O volume aparente obteve-se calculando o valor médio entre os volumes máximo e mínimo. Foram realizadas 3 determinações da amostra, tendo o cuidado de descompactar o pó entre os ensaios.

#### 2.5.3.2. Características de escoamento

Pesou-se 25 g de pó e foi colocado num funil immobilizado em suporte (figura 14a). Recorreu-se ao método automático usando o aparelho Erweka GT (figura 14b) e ponteira de 25 mm de diâmetro.



Figura 14: Funil (a) e método automático (b) do ensaio de escoamento



## 2.6. Formulação

### 2.6.1. Formulação do granulado

Atendendo às características mecânicas do pó, optou-se por preparar um granulado. O granulado preparado usou-se no ensaio de turvação e serviu para comparar com as duas formas de utilização de MO (pó e extrato). A formulação quali-quantitativa apresenta-se na tabela 6.

Tabela 6: Formulação quali-quantitativa

Matéria-prima	Quantidade (mg)	Quantidade (%)
Pó de MO	125	36,1
Lactose	209	60,4
PVP (sol. a 10%)	3,3	0,9
Amidoglicolato de sódio	7	2,0
Estearato de magnésio	2	0,6

A fórmula foi definida para uma massa total unitária de 345 mg. Os excipientes selecionados são habitualmente usados e considerados seguros. A concentração de MO baseou-se no estudo feito por Nkurunziza *et al* (120).

As concentrações de diluente, aglutinante, desagregante e lubrificante foram estabelecidas de acordo com os intervalos considerados como sendo aceitáveis pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth edition (133).

A fórmula com as quantidades totais dos constituintes calculados para massa global de 51,45 g, está apresentada na tabela 7.

Tabela 7: Fórmula do fabrico

Matéria prima	Lote	Qtd. total (g)
Moringa		18,75
Lactose	0906	31,35
PVP (sol. a 10%)	181257-N-1	0,5
Amidoglicolato de sódio	62789-1-1	1,05
Estearato de magnésio	62861	0,3

### a. Mistura dos constituintes

A mistura dos constituintes previamente pesados foi feita usando almofariz de vidro e misturador Turbula. Essa mistura teve 3 fases: a primeira foi misturar MO e o diluente (lactose) usando almofariz de vidro. A segunda e terceira fases da mistura foram feitas depois da granulação a húmido.

### b. Granulação

A granulação a húmido iniciou-se pelo humedecimento (malaxagem) dos pós da 1ª mistura (MO e lactose) em cápsula de porcelana usando cerca de 5 ml de solução de PVP a 10 % como líquido de humedecimento. De seguida, procedeu-se a granulação no granulador oscilante Erweka FGS usando uma rede de 1,6 mm (figura 15); seguindo-se a secagem do granulado na estufa a 40 °C durante 20 minutos. Determinou-se a humidade do granulado (100 °C, 5 minutos).



Figura 15: Granulação (granulador Erweka FGS)

Depois da secagem e calibração, seguiu-se a segunda fase de mistura que consistiu na adição do desagregante (amidoglicolato de sódio) tendo-se usado o misturador Turbula por 5 minutos. Por último, seguiu-se a terceira fase de mistura, que consistiu na adição do anti-aderente (estearato de magnésio) e misturou-se durante 5 minutos usando o mesmo misturador.

## 2.6.2. Verificação do granulado

### a. Determinação da massa volúmica aparente e IC

Introduziu-se sem compactar 30 g de granulado na proveta de 100 ml previamente fixada sobre o aparelho *Tap density tester* e determinou-se o volume inicial. Em seguida foi submetido a 10, 500 e 1250 batimentos. Com os volumes obtidos e recorrendo a fórmulas 1 e 2, foram calculados as massas volúmicas aparentes e o índice de compressibilidade (IC).

$$\rho = \frac{m (g)}{v (ml)} \text{ (fórmula \#1)} ; IC = \frac{V_0 - V_f}{V_0} \text{ (fórmula \#2)}$$

### b. Características de escoamento

Conforme descrito em 2.5.3.2.

## 2.7. Cápsulas contendo pó de MO

Por razões que se explicarão na discussão decidiu-se preparar cápsulas usando pó das sementes de MO.

Usaram-se cápsulas nº 0 de gelatina incolor para permitir acomodar aproximadamente 250 mg de pó.

A quantidade de pó das sementes de MO baseou-se no estudo feito por Muthuraman *et al* (35).

As cápsulas foram usadas para estudar eficácia do tratamento da água no ensaio microbiológico no tempo zero e 15 dias após armazenamento na estufa a temperatura de 30 °C.

### 2.7.1. Preparação das cápsulas

Pesaram-se previamente 30 invólucros para preparar cápsulas usando método de enchimento manual. Encheram-se 3 cápsulas e a média da diferença de massa de invólucros e cápsulas cheias foi usada para calcular a quantidade de pó a pesar para encher as restantes 27. O corpo das cápsulas foi inserido nos orifícios da placa superior de acrílico (figura 16) e pó previamente pesado foi arrastado com ajuda de uma espátula para interior de invólucro.

Após a rotação parcial da placa as cápsulas foram fechadas colocando-se a cabeça em cada uma das cápsulas.

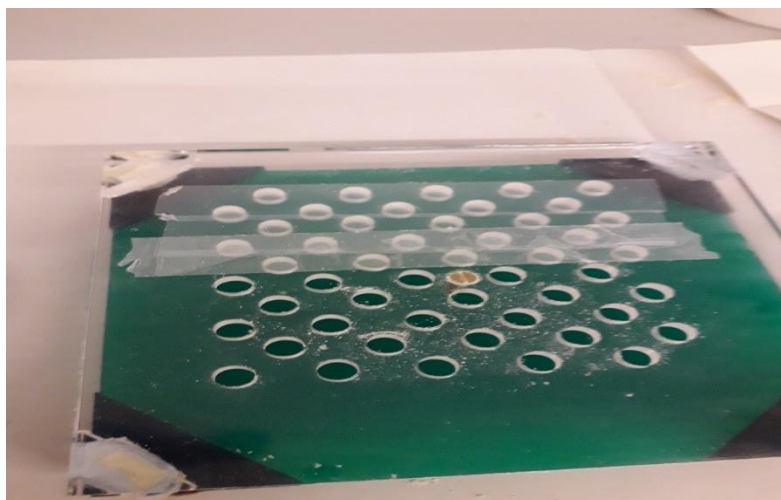


Figura 16: Sistema de placas usada no método manual

### 2.7.2. Ensaio das cápsulas

#### a. Uniformidade de massa

O ensaio foi realizado à semelhança do que é descrito no ensaio 2.9.5 da Farmacopeia Portuguesa 9. Pesaram-se individualmente 20 invólucros e encheram-se. Pesaram-se as cápsulas cheias e a massa do conteúdo foi calculada por diferença. Calculou-se os desvios à massa média do conteúdo exprimindo-os em percentagem.

#### b. Ensaio de desagregação

Para a realização do ensaio, foi usado o aparelho *Desintegration tester ED-2L*. O ensaio foi realizado conforme descrito na Farmacopeia Portuguesa 9. Utilizou-se 800 ml de água aquecida até a temperatura de  $37 \pm 2$  °C e 6 cápsulas que foram colocadas em cada um dos 6 tubos do cesto. Usaram-se os discos. Pós-se o aparelho a funcionar. Registou-se o tempo em que se verificou desagregação.

#### c. Ensaio de estabilidade

Com o intuito de avaliar a eficácia em períodos longos de utilização para o tratamento de água, foram acondicionadas 15 cápsulas no frasco de vidro incolor com tampa

metálica (figura 17). O frasco foi armazenado na estufa (*memmert*) a 30 °C durante 15 dias. Após os 15 dias, as cápsulas foram usadas no ensaio microbiológico para avaliar a eficácia antibacteriana.

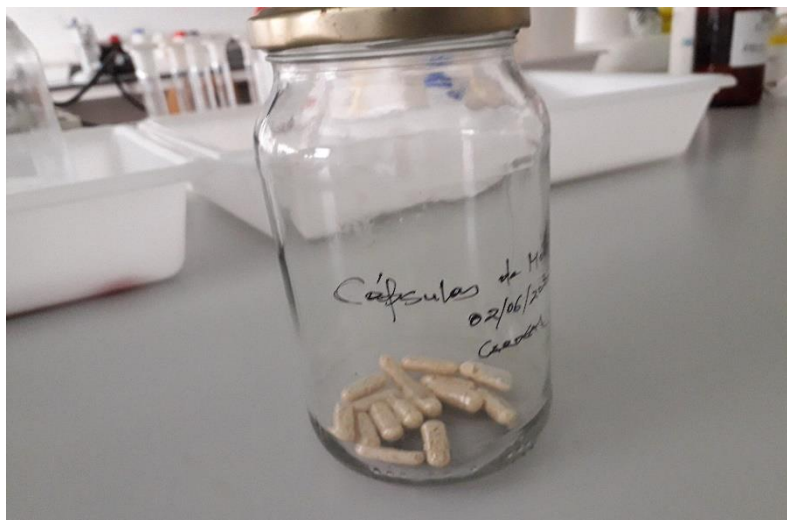


Figura 17: Acondicionamento das cápsulas

## 2.8. Ensaio de turvação

Os ensaios de coagulação-floculação foram realizados usando 4 placas de agitação magnética. Foram usados 4 gobelés nos quais foram adicionados amostras de 200 ml de água sintética de caulino.

### 2.8.1. Preparação da suspensão de caulino

A preparação da suspensão de caulino baseou-se no estudo feito por Ndabigengesere *et al.* (134). Pesou-se 10 g de caulino que foi adicionado a 1 L de água purificada. A mistura foi submetida a agitação magnética a 20 rpm usando uma placa magnética *Cimarec (Barnstead Thermolyne)* por 1h. A suspensão resultante foi deixada em repouso durante 24 h para garantir a hidratação total do caulino (figura 18).

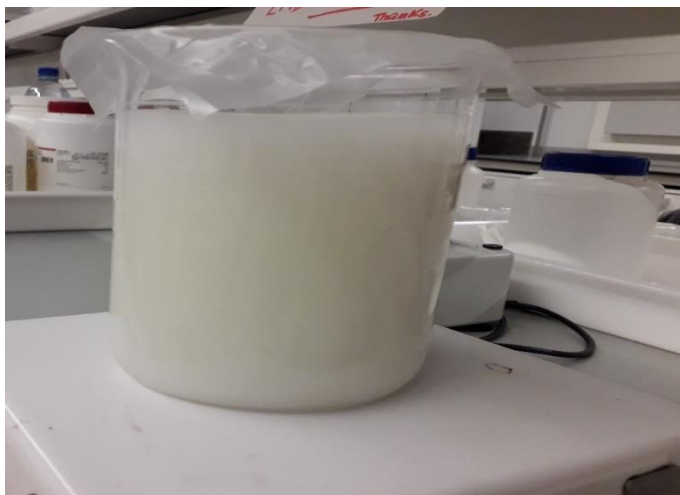


Figura 18: Suspensão de caulino

O sobrenadante foi transferido por decantação e diluiu-se com intuito de ter amostras de água com turvação de 200 unidades de turvação nefelométricos (UTN), 300 UTN e 400 UTN.

Foram preparadas 4 amostras de 200 ml de água com caulino (figura 19).

Foram adicionados às amostras: pó de sementes de MO, tendo se usado 50 mg, 100 mg e 150 mg; ou granulado nas mesmas quantidades de Moringa (a massa foi para isso ajustada); ou extrato salino, foram adicionados volumes de 5, 10 e 15 ml.

As concentrações de MO obtidas foram as seguintes: 250, 500 e 750 mg/l.



Figura 19: Amostras de água com caulino

As amostras de água foram submetidas a agitação de 500 rpm por 10 min e deixados em repouso durante 1h. Após o repouso, foram retiradas usando pipeta graduada de 25 ml introduzida a cerca de 0,5 cm do nível da água. As amostras retiradas foram filtradas usando papel de filtro, pano de algodão grosso e pano de algodão fino e posteriormente lidas no turbidímetro (*2100N Turbidimeter*) (figura 20) em unidades de turvação nefelométricas (UTN). O ensaio foi feito em triplicado.



Figura 20: Turbidímetro (*2100N Turbidimeter*)

### 2.8.2. Preparação do extrato a 1% de MO

Pesou-se 1 g de pó de MO e adicionou-se a 100 ml de solução de NaCl 1M. Agitou-se usando agitador magnético a 200 rpm por 10 min. Filtrou-se usando papel de filtro. Para obter extrato pouco turvo, utilizou-se na filtração 4 filtros de papel. Cada extrato foi usado 2 dias, sendo o próprio dia preparado e dia seguinte. A tabela 8 indica os volumes de extrato adicionados à amostra de água turva para obter as concentrações de 250, 500 e 750 mg/l.

Tabela 8: Volumes de extrato a 1% de MO adicionados à amostra de água turva

Volume do extrato recolhido (ml)	5	10	15
Massa de MO correspondente (mg)	50	100	150
Volume da amostra (ml)	200	200	200
Concentração correspondente (mg/l)	250	500	750

## 2.9. Ensaio microbiológico

Para a realização do ensaio, foi usada a estirpe bacteriana de *E. coli* de genótipo conhecido, *E. coli* ATCC 25922. Para a preparação do inóculo de *E. coli*, usou-se 10 ml de soro fisiológico estéril, suspendeu-se o número de colónias necessário a partir de cultura pura até a obtenção de uma turvação de 0,5 MacFarland usando densitómetro *McFarland Densitometer (DEN-1B)*. Foram usadas amostras de 100 ml de águas turvas com caulino e terra a 200 UTN. Às amostras teste foi adicionado 100 µl do inóculo de *E. coli* 0,5 MacFarland e 25 mg de pó das sementes de MO, agitou-se manualmente durante 10 minutos e ficaram em repouso por 1h. O ensaio foi feito também para avaliar as cápsulas no tempo zero e após quinze dias. A partir das amostras teste e controlos, retiraram-se 100 µl e adicionaram-se a 900 µl de soro fisiológico estéril. Foram feitas as diluições seriadas de 0,1, 0,01 e 0,001 usando o volume de 100 µl. Para plaqueamento, retirou-se 100 µl dessas diluições e semeou-se usando semeadores preparados a partir de pipetas de vidro estéreis de Pasteur com os quais os inóculos foram espalhados em meio de cultura de *Plate Count Agar (PCA)*. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h.

As amostras foram analisadas pela técnica de contagem direta de microrganismos em placas, que consistiu na contagem de colónias formadas no meio de *Plate Count Agar (PCA)*, tendo se considerado contagens entre 30 – 300 e os resultados apresentaram-se em ufc/ml. A tabela 9 apresenta as amostras teste e controlos usados nas contagens.

Tabela 9: Amostras teste e controlos usados

<b>Amostras teste</b>	<b>Controlos</b>
Inóculo de <i>E. coli</i> + pó de MO	Inóculo de <i>E. coli</i> 0,5 McFarland
	Pó de MO
Água turva de caulino + <i>E. coli</i> + pó de MO	Água turva de caulino
	Água turva de caulino + inóculo de <i>E. coli</i>
Água turva de terra + <i>E. coli</i> + pó de MO	Água turva de terra
	Água turva de terra + inóculo de <i>E. coli</i>



## CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Perfil cromatográfico (GC-MS) de extratos de sementes

Com o objetivo de obter alguma informação sobre o tipo de composição química das sementes de MO, obtiveram-se extratos do pó destas sementes e procedeu-se a sua análise por CG-MS.

Usaram-se como solventes extratores o hexano, o acetato de etilo e o etanol anidro de acordo com a secção 2.4.1. Desta forma pretendeu-se extrair das sementes os compostos com características apolares, medianamente polares e polares. O hexano tem mais afinidade para os compostos de natureza apolar (figura 21), o acetato de etilo para os compostos de polaridade intermédia (figura 22) e o etanol anidro para os compostos orgânicos mais polares (figura 23). Os extratos foram analisados após diluição com tolueno, sendo injectados sem derivatização prévia. As fórmulas moleculares foram obtidas recorrendo a base de dado da PubChem. As tabelas abaixo apresentam os resultados dos perfis cromatográficos da composição química das sementes de MO.

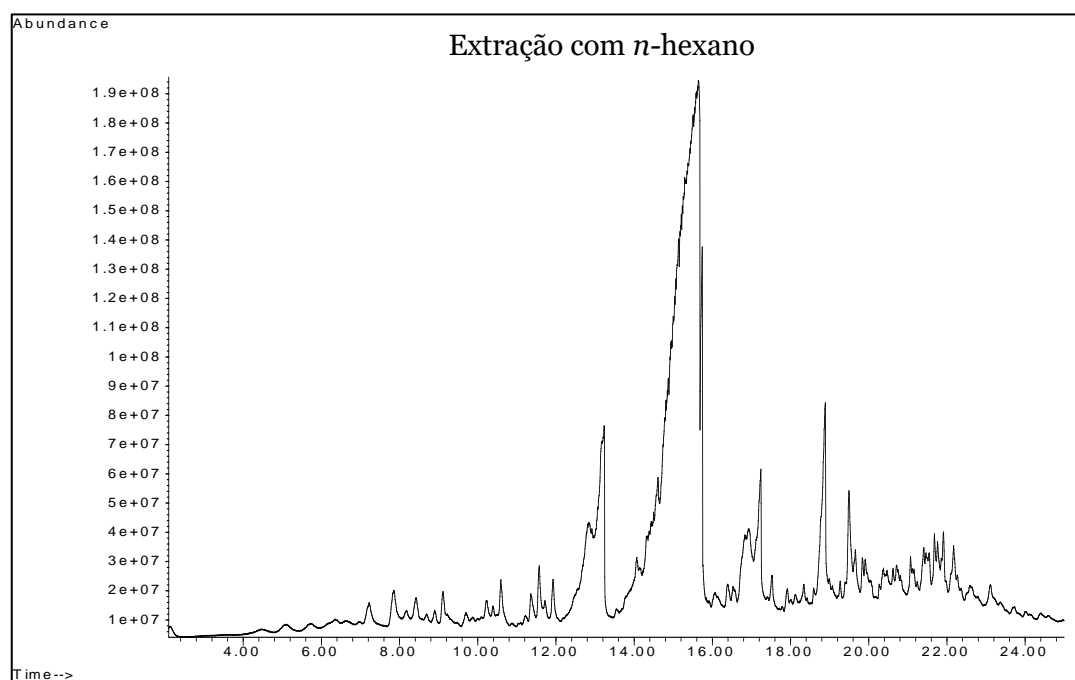
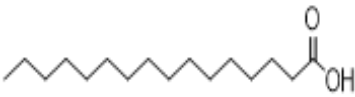
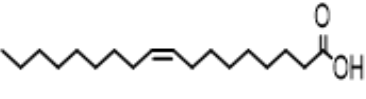
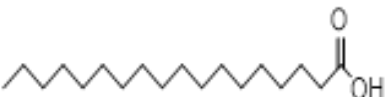
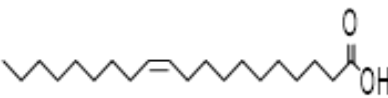
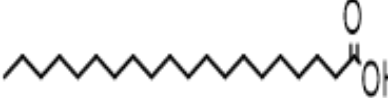
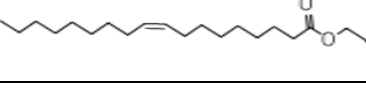
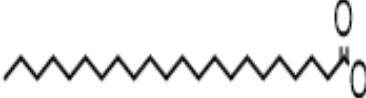
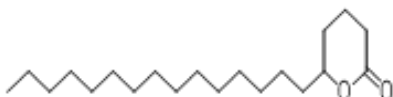

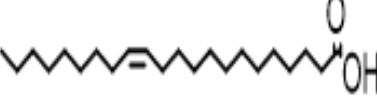
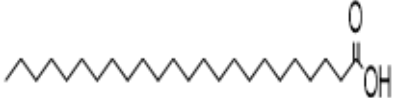


Figura 21: Perfil cromatográfico de sementes de MO (extração com hexano)

Os compostos presentes em sementes de MO do extrato de *n*-hexano estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Perfil cromatográfico e compostos presentes em sementes de MO (extração com hexano)

Nome	Estrutura química	Área do pico	% área	% prob.
Ác. n-hexadecanóico		$2,0 \times 10^{10}$	8,7	25-76
Ácido oleico		$9,1 \times 10^{10}$	49	12-29
Ác. octadecanóico		$4,8 \times 10^9$	2,6	78
Ác. cis-11-eicosenóico		$5,4 \times 10^9$	2,9	28,7
Ácido eicosanóico		$6,0 \times 10^9$	3,2	85-86
Oleato de glicidil		$1,6 \times 10^9$	0,86	30-31
Ác. docosanóico metil ester		$4,6 \times 10^8$	0,25	56,2
Meadoulactona		$5,3 \times 10^8$	0,29	49,8
Ácido docosanóico		$7,6 \times 10^9$	4,1	57-88
Ácido erúico		$2,8 \times 10^9$	1,5	14-22
Ác. tetracosanóico		$1,5 \times 10^9$	0,83	72,1

Vitamina E		$6,4 \times 10^8$	0,35	50,4
1,2-Dipalmitato de glicerilo		$2,5 \times 10^9$	1,3	10-40
Campesterol		$9,8 \times 10^8$	0,53	34,4
Estigmasterol		$1,5 \times 10^9$	0,8	77
$\beta$ -Sitosterol		$2,2 \times 10^9$	1,2	44-49
Ácido ascórbico		$6,2 \times 10^8$	0,33	13,7
7H-Dibenzo[c,h]fenotiazina		$1,2 \times 10^8$	0,07	30,7

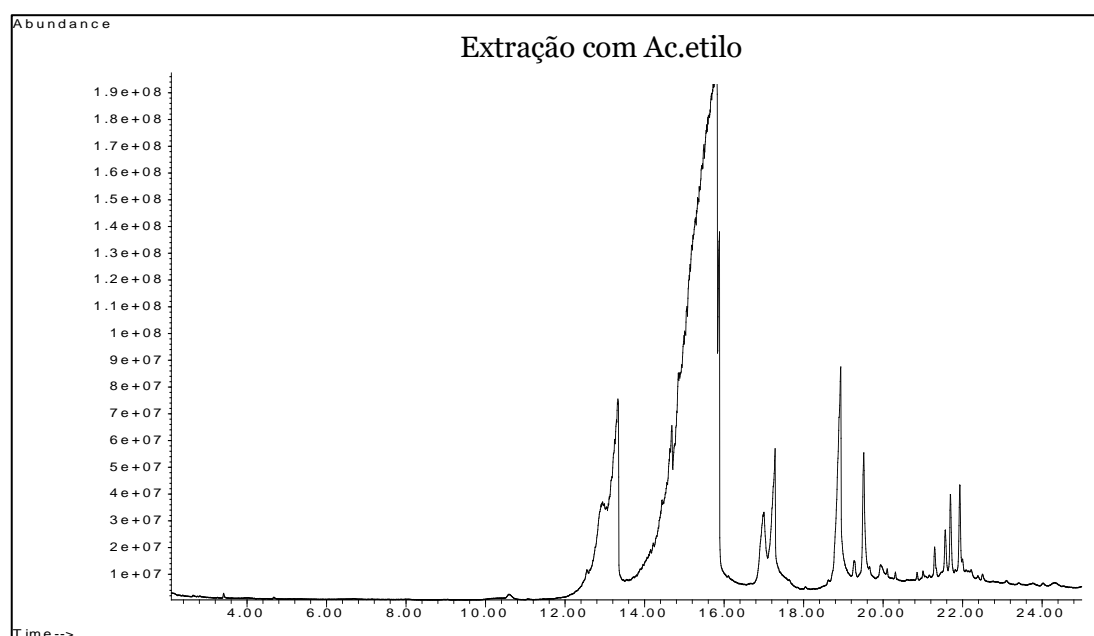
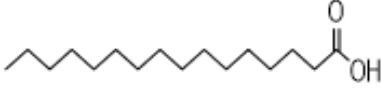
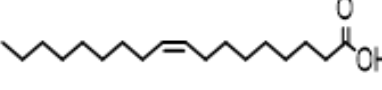
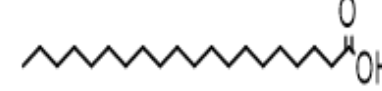

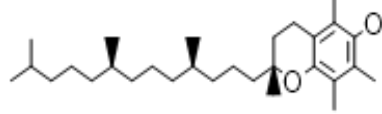
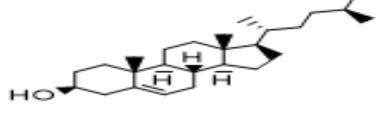
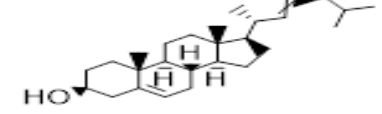
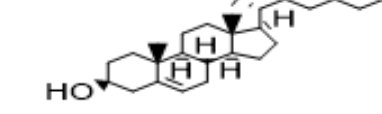


Figura 22: perfil cromatográfico de sementes de MO (extração com acetato de etilo)

Os compostos presentes em sementes de MO do extrato de acetato de etilo estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Perfil cromatográfico e compostos presentes em sementes de MO (extração com acetato de etilo)

Nome	Estrutura química	Área do pico	% área	% prob.
Ácido <i>n</i> -hexadecanóico		1,6x10 <sup>10</sup>	13	80,1
Ácido oleico		9,7x10 <sup>10</sup>	75	23,7
Ácido eicosanóico		3,1x 10 <sup>9</sup>	2,4	86,9
Ácido docosanóico		5,2x 10 <sup>9</sup>	4	91
Vitamina E		3,7x 10 <sup>8</sup>	0,28	34,5
Campesterol		4,7x 10 <sup>8</sup>	0,36	43,1
Estigmasterol		8,2x10 <sup>8</sup>	0,63	83,2
γ-Sitosterol		1,2x 10 <sup>9</sup>	0,95	69,1

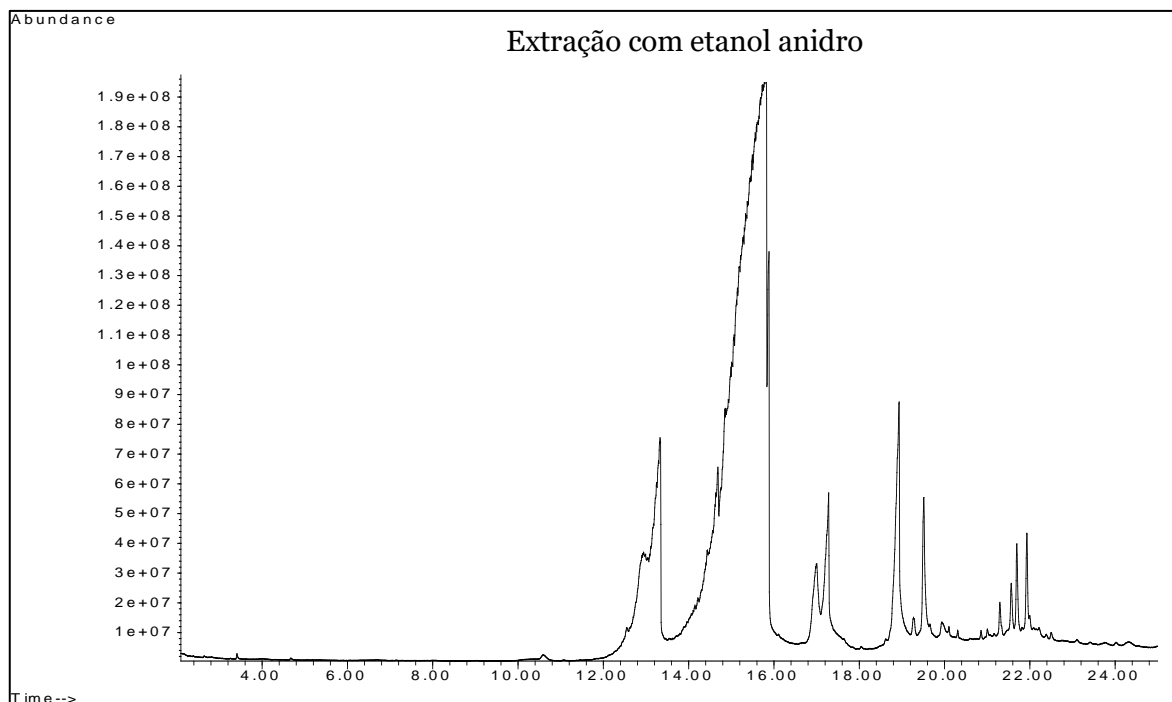
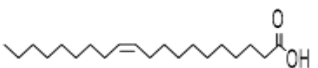
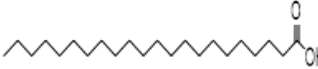
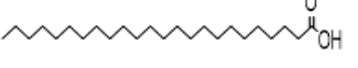
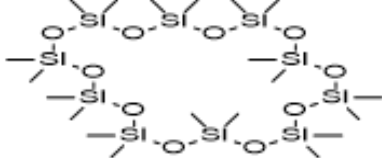
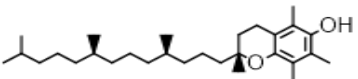
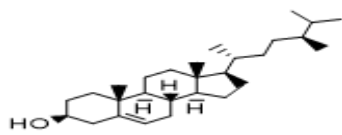
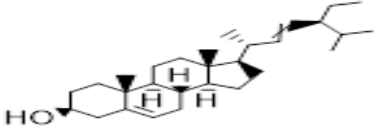
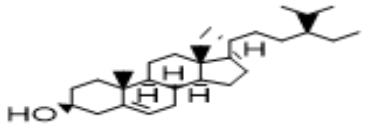


Figura 23: Perfil cromatográfico de sementes de MO (extração com etanol anidro)

Os compostos presentes em sementes de MO do extrato de etanol anidro estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Perfil cromatográfico e compostos presentes em sementes de MO (extração com etanol anidro)

Nome	Estrutura química	Área do pico	% área	% prob.
Decenal-2	<chem>CCCCCCCC=CC=O</chem>	3,6x 10 <sup>7</sup>	0,03	40,5
Undecenal-2	<chem>CCCCCCCCC=CC=O</chem>	2,3x 10 <sup>7</sup>	0,02	30,9
Ácido hexanóico	<chem>CCCCCC(=O)O</chem>	1,7x 10 <sup>8</sup>	0,13	26,3
Ácido n-hexadecanóico	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>	1,4x10 <sup>10</sup>	11	41-86
Ácido oleico	<chem>CCCCCCC=CCCCCCCC(=O)O</chem>	9,9x 10 <sup>10</sup>	78	17 - 24

Ácido cis-11-eicosenóico		$2,5 \times 10^9$	2	27,7
Ácido docosanóico		$5,9 \times 10^9$	4,6	87,9
Ác. tetracosanóico		$3,1 \times 10^8$	0,24	58,5
Ciclodecasíloxano de eicosametil		$1,0 \times 10^8$	0,08	33-38
Vitamina E		$4,0 \times 10^8$	0,32	37-43
Campesterol		$4,5 \times 10^8$	0,36	51,5
Estigmasterol		$4,5 \times 10^8$	0,63	79,7
$\gamma$ -Sitosterol		$8,2 \times 10^8$	0,65	75,5

### 3.2. Perfil espectral (FTIR) de sementes de MO e extratos orgânicos

A espectrofotometria no Infravermelho (FTIR) é uma técnica amplamente utilizada para a identificação e análise funcional de compostos orgânicos. Com vista a obter o perfil desta região espectral das sementes de MO, registaram-se os espectros FTIR do pó das sementes de MO e dos extratos obtidos com hexano, acetato de etilo e etanol anidro (Figura 24).

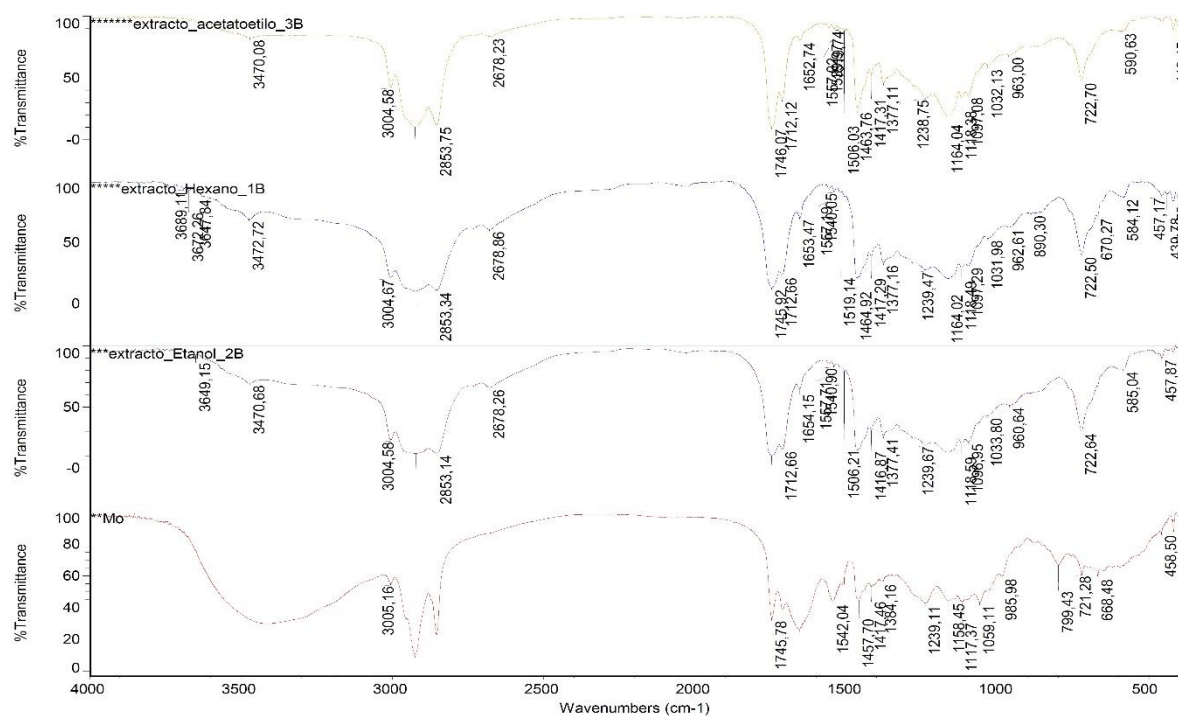


Figura 24: Perfil espectral (FTIR) de sementes de MO e extratos orgânicos

Os espectros revelam a esperada presença de compostos orgânicos com absorções intensas na região entre 2600 cm<sup>-1</sup> e 3100 cm<sup>-1</sup>, típica das vibrações das ligações C-H de cadeias alquílicas. As absorções que ocorrem a cerca de 3500 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de grupos O-H e as absorções intensas entre 1650 cm<sup>-1</sup> e 1750 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de grupos carbonilo. A presença conjunta destas absorções corrobora a presença de ácidos carboxílicos evidenciados na análise por GC-MS.

### 3.3. Perfil espectral (UV-Vis) de extratos orgânicos e aquoso de sementes de MO

A espectrofotometria no UV-Vis é uma técnica amplamente utilizada para análise quantitativa de compostos contendo grupos cromóforos, mas permite também fazer uma análise qualitativa na identificação de alguns grupos funcionais na molécula, através de adição de solventes de deslocamento, como é o caso de grupos OH fenólicos.

Com vista a obter o perfil nesta região espectral, registaram-se os espectros no UV-Vis dos extratos obtidos com *n*-hexano (figura 25), acetato de etilo (figura 26), etanol anidro (figura 27) e água (figura 28).

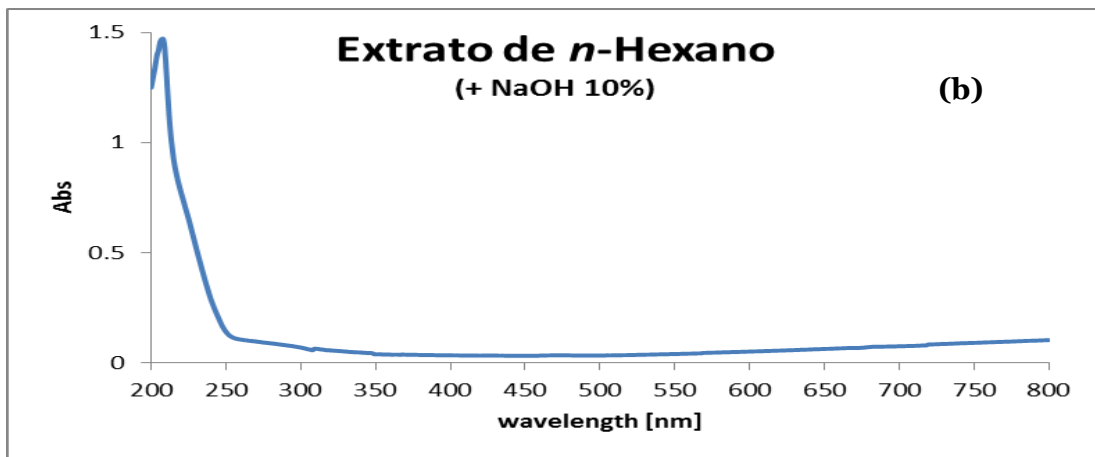
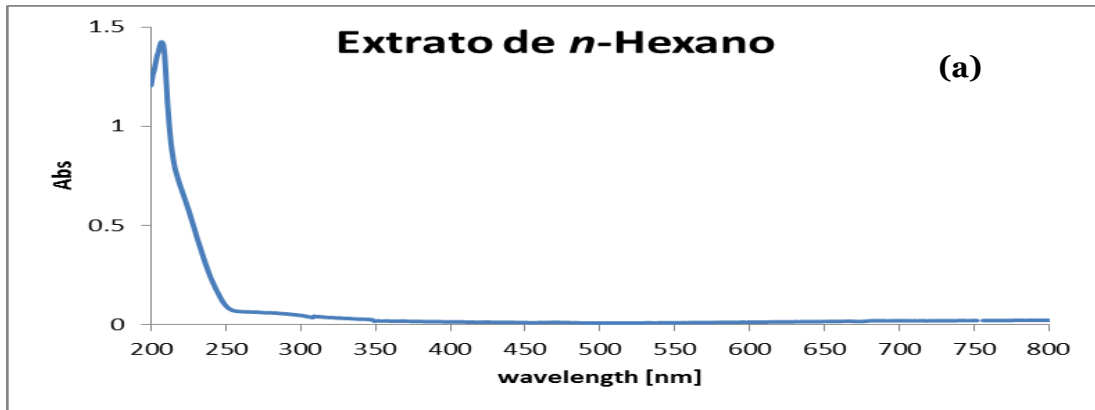


Figura 25: Perfil espectral (UV-Vis) de extracto de *n*-hexano (a) e *n*-hexano + NaOH 10%(b)

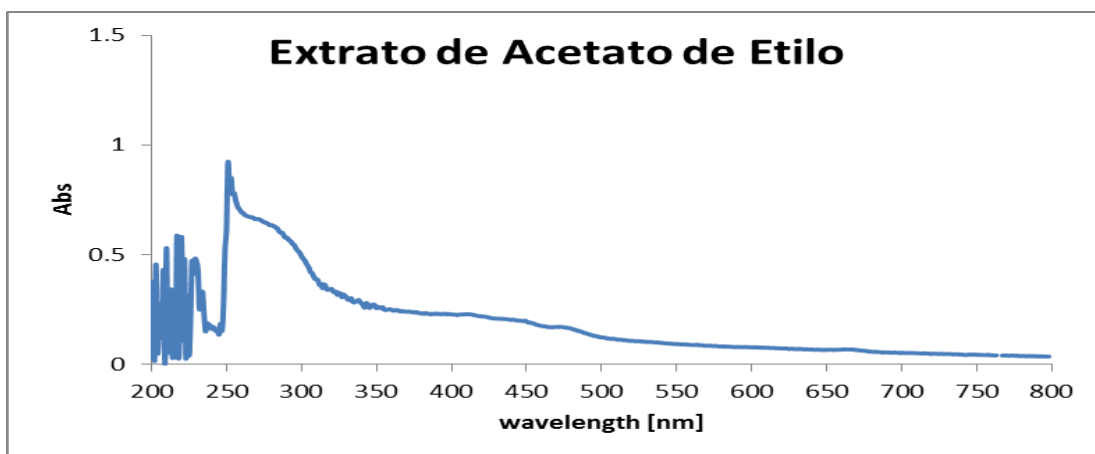


Figura 26: Perfil espectral (UV-Vis) de extracto de acetato de etilo



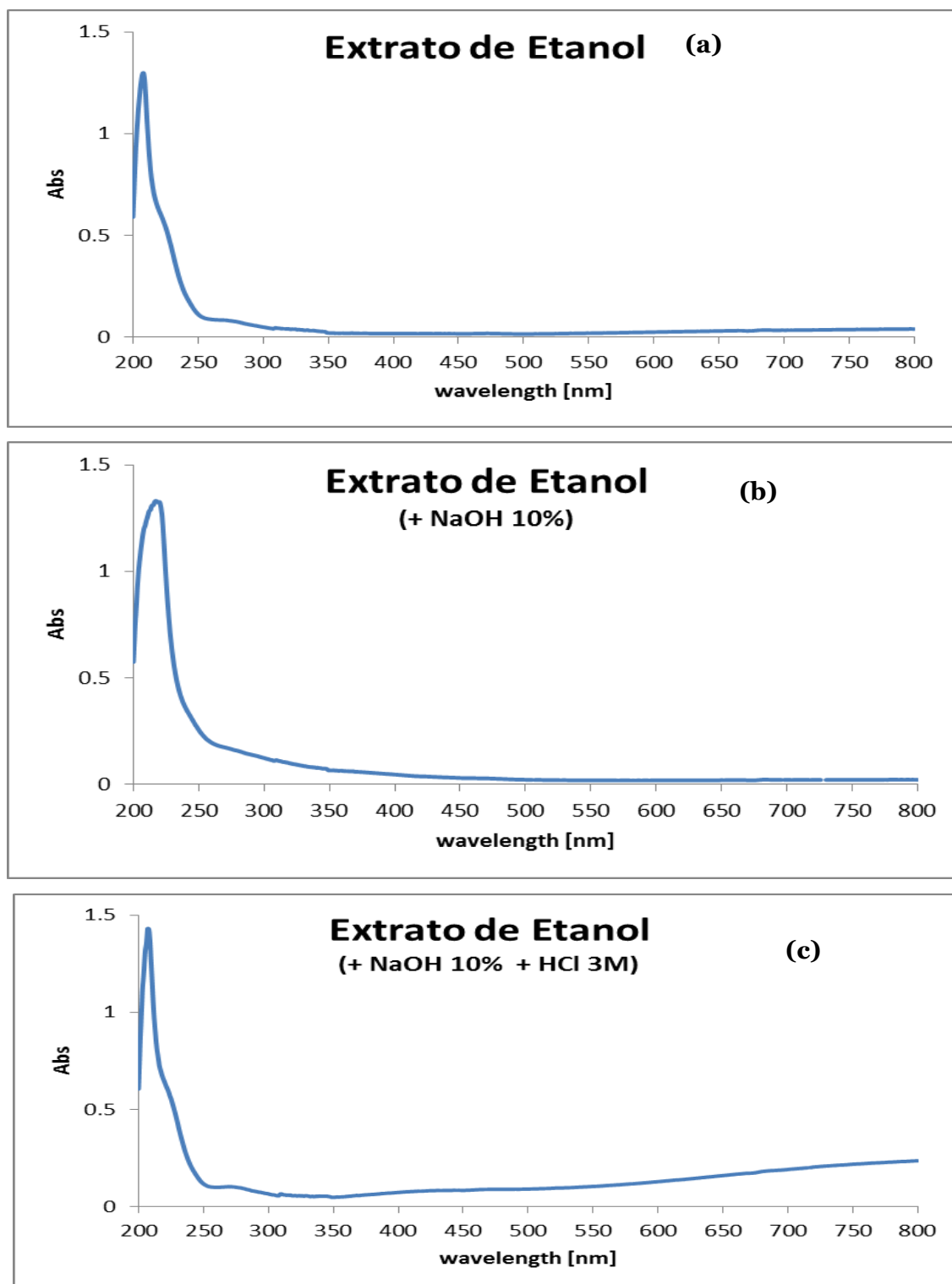


Figura 27: Perfil espectral (UV-Vis) de extracto de etanol anidro (a), etanol anidro + NaOH 10% (b) e etanol anidro + NaOH 10% + HCl 3M (c)

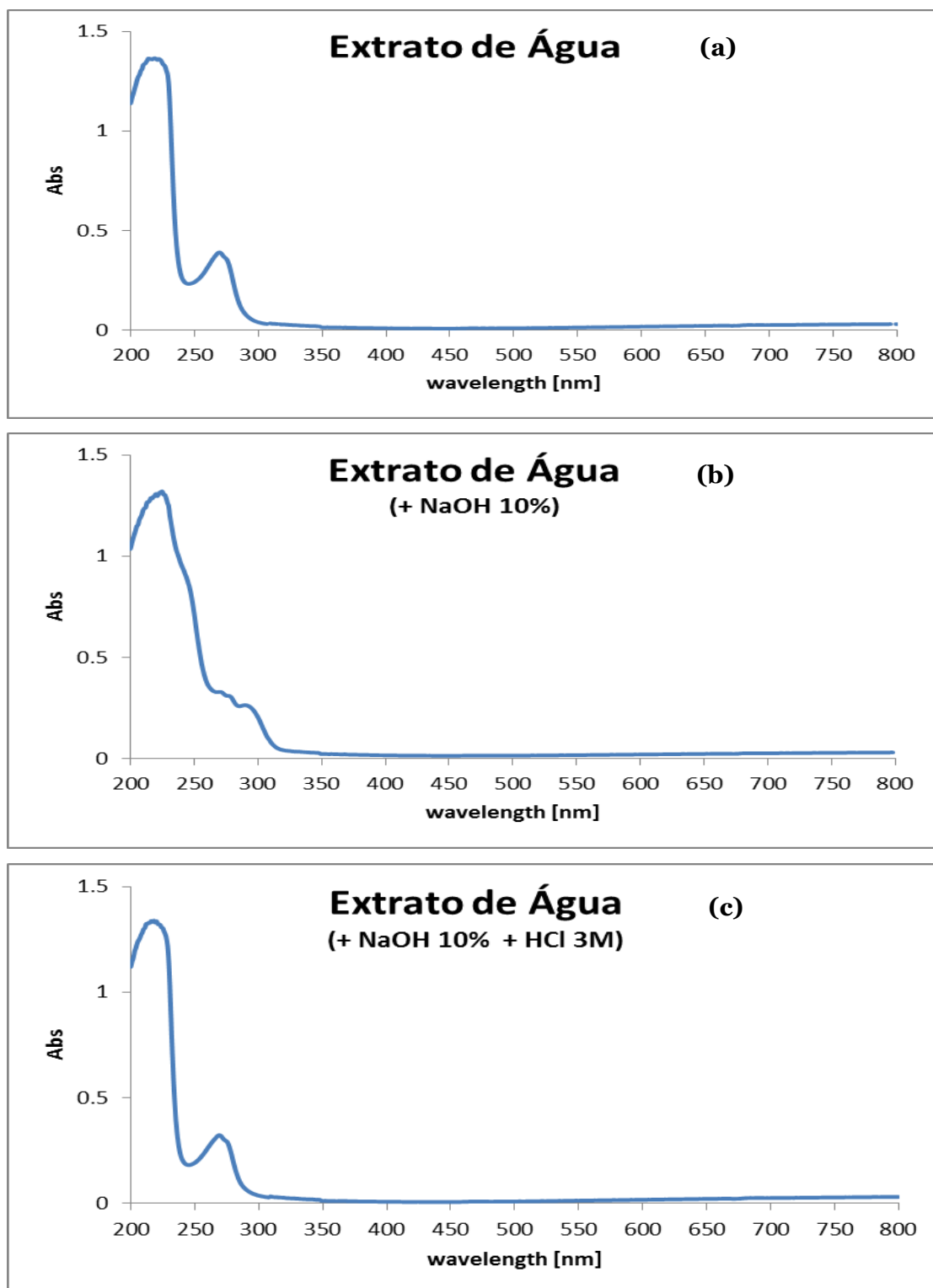


Figura 28: Perfil espectral (UV-vis) de extrato aquoso (a), água + NaOH 10% (b) e água + NaOH 10% + HCl 3M (c)

Os espectros revelam a presença, no extracto de *n*-hexano de compostos orgânicos com grupos cromóforos, no entanto, após a adição do reagente de deslocamento NaOH a 10% (m/v), o perfil espectral não sofreu qualquer efeito de deslocamento, indicando que neste extracto não estão presentes compostos com grupos OH fenólicos, ou, a existir, estão em baixa concentração. Esta informação corrobora a evidenciada na análise por GC-MS.

Em relação ao extracto de acetato de etilo, os valores de absorvência são muito baixos, denotando a pequena quantidade de compostos com grupos cromóforos presentes no extracto, não tendo, por isso sido realizado o estudo da influência dos reagentes de deslocamento. Esta informação corrobora a evidenciada na análise por GC-MS, onde claramente, o extracto é constituído maioritariamente por compostos alifáticos.

No extracto de etanol, verificamos a presença de compostos com grupos cromóforos, evidenciando-se uma banda de absorção intensa a cerca de 215 nm que, após a adição de NaOH 10% (m/v) sofre um desvio batocrómico para comprimentos de onda superiores, na zona dos 230 nm, e que após a adição de HCl a 3M retoma o perfil inicial. Esta evidência dá a indicação da presença de grupos funcionais capazes de reagir com NaOH 10% (m/v), como é o caso de fenóis, que tinham já sido detetados na análise de GC-MS e FTIR.

Finalmente, em relação ao extracto aquoso, a presença de cromóforos é evidenciada pelas duas bandas de absorção com máximos a cerca de 220 e 270 nm. Após a adição do reagente de deslocamento, verifica-se um efeito batocrómico equivalente ao que ocorreu no extracto de etanol, evidenciando a presença de grupos funcionais, provavelmente fenóis, uma vez que estes foram detectados nas outras análises efetuadas por GC-MS e FTIR.

### 3.4. Características físicas e mecânicas de pó e granulado das sementes de MO

#### 3.4.1. Características físicas e mecânicas do pó

##### a. Determinação da humidade

Para as condições de ensaio previamente definidas (105 °C, 15 minutos), leu-se diretamente na balança a percentagem de humidade do pó. O valor lido foi 7,41 %.

As condições iniciais do ensaio foram de 80 °C e 10 minutos, porém quando se obtiveram valores não desejáveis, optou-se por as definir para 105 °C e 15 minutos.

Para além do teor de água que existe nos materiais vegetais, a presença de óleos provavelmente terá contribuído para valores elevados de percentagem de humidade do pó das sementes de MO. Isto dificultou a pulverização em almofarizes, pois era notório a oleosidade e a formação de grumos que aderiam à superfície do material.

Não foram encontrados estudos em que se determinou a percentagem de humidade do pó das sementes de Moringa, porém há trabalhos que descrevem técnicas usadas para a secagem das sementes. As técnicas de secagem descritas usam estufas a temperaturas entre 40 – 100 °C (124, 135, 136), mas também é feita a secagem a temperatura ambiente (137, 138).

##### b. Determinação do volume aparente

A diferença entre  $V_{500}$  e  $V_{1250}$  não excedeu os 2 mL, portanto, não se determinou o  $V_{2500}$ . Os resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Volumes aparentes

	$V_o$ (ml)	$V_{10}$ (ml)	$V_{500}$ (ml)	$V_{1250}$ (ml)
Ensaio 1	65,8	60,4	50,7	50,7
Ensaio 2	65,4	60,4	50,7	50,6
Ensaio 3	65,7	60,6	50,6	50,8
Média	65,6	60,5	50,7	50,7

## c. Determinação da massa volúmica aparente e índice de compressibilidade (IC)

Calculou-se a massa volúmica aparente inicial ( $\rho_0$ ) e final ( $\rho_f$ ) com base nos valores de volume aparente inicial ( $V_0$ ) e final ( $V_{1250}$ ). As massas volúmicas apresentam-se na tabela 14.

Tabela 14: Massas volúmicas aparentes

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média
$\rho_0$	0,46	0,46	0,46	0,46
$\rho_f$	0,59	0,59	0,59	0,59

Com as médias dos volumes inicial e final, foi possível calcular, também, o índice de compressibilidade. Este índice permite-nos avaliar indiretamente as propriedades de escoamento. O IC foi calculado usando os volumes aparentes da tabela 13 e os resultados estão na tabela 15.

Tabela 15: Índices de compressibilidade

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média
IC (%)	22,9	22,6	22,7	23

Considera-se que um pó tem boas características de escoamento se a este corresponder um IC < 15 %.

O resultado expresso em percentagem indica a “% de ar removida”. De acordo com a escala de escoamento de pós descrita na FP9, indica que IC entre 21 – 25% é classificado como possuindo fraca capacidade de escoamento (139). Assim, o pó de sementes de MO apresentou fraca capacidade de escoamento, pois, além do valor calculado, 23%, o que também se verificou pelo ensaio de escoamento.

No ensaio de escoamento, utilizou-se o método de funil, porém quando se verificou que o pó não escoou recorreu-se ao método automático, tendo se verificado também o mesmo comportamento do pó referido.

### 3.4.2. Características físicas e mecânicas do granulado

A preparação do granulado teve como objetivo melhorar as características mecânicas do pó de MO.

#### a. Determinação da humidade

O valor obtido, 2,23%, está conforme com os valores de referência de humidade (0,5 a 3%) para granulados que se destinam à preparação de comprimidos (140), já que nesta fase essa hipótese estava a ser considerada.

#### b. Determinação de massa volúmica aparente e IC

Os volumes obtidos após 10, 500 e 1250 pancadas estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Volumes aparentes e IC

Volumes (ml)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média
$V_0$	54	53	55	54
$V_{10}$	49	49	49	49
$V_{500}$	45	45	45	45
$V_{1250}$	45	44	44	44,3
IC (%)	17	17	20	18

A massa volúmica calculada foi de:  $m/V_0 = 30/54 = 0,56$  g/ml.

O IC do granulado é de 18 %. Pela análise dos resultados, verificou-se que a mistura do pó das sementes de MO com excipientes melhorou as características de escoamento. Ainda assim, à semelhança do pó, o granulado não escoou. Apesar disso, experimentou-se comprimir a mistura, mas não se conseguiu obter os comprimidos pretendidos devido a dureza muito baixa que apresentaram e aspeto húmido, optando-se por preparar cápsulas já que esta forma de dosagem poderá ser fácil de preparar em Moçambique.

### 3.5. Verificação das cápsulas

#### 3.5.1. Uniformidade de massa

Os resultados referentes às massas dos conteúdos das cápsulas preparadas manualmente conforme descrito em 2.7.1, estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Massa dos conteúdos

Cápsula	Massa da cápsula vazia (mg)	Massa da cápsula cheia (mg)	Massa de conteúdo (mg)
1	96,2	338,8	242,6
2	95,2	323,2	228
3	96,1	320,6	224,5
4	95,6	332,0	236,4
5	95,3	340,6	245,3
6	96,4	335,1	238,7
7	97,0	326,1	229,1
8	95,9	311,3	215,4
9	94,5	339,2	244,7
10	97,2	342,5	245,3
11	96,0	360,4	264,4
12	96,1	347,9	251,8
13	96,9	337,9	241
14	95,3	356,0	260,7
15	94,8	347,1	252,3
16	96,0	385,8	289,8
17	95,2	319,3	224,1
18	93,8	321,1	227,3
19	94,1	344,0	249,9
20	95,9	340,7	244,8

Na Farmacopeia Portuguesa 9, é considerado que existe uniformidade de massa nas cápsulas se não mais do que duas das 20 unidades ensaiadas diferirem  $\pm 10\%$  da massa média e nenhuma diferir do dobro dessa percentagem.

Os resultados obtidos no que diz respeito a uniformidade de massa das cápsulas encontram-se na tabela 18

Tabela 18: Uniformidade de massa das cápsulas

Parâmetros						
Cápsulas	Média (mg)	Desvio padrão	Desvio limite $\pm 10\%$		Acima do limite	Abaixo do limite
	242,8	16,8	24,3			
			+ 10%	- 10%		
			267,1	218,5		
				1	1	

Da análise dos resultados obtidos neste ensaio verifica-se que duas (215,4 mg; 289,8 mg) das 20 unidades de cápsulas do mesmo lote pesadas diferem da massa média encontrada em percentagem de  $\pm 10\%$ , porém nenhuma difere do dobro da percentagem. Provavelmente, essas duas unidades diferem da média  $\pm 10\%$  por um lado devido às más características de escoamento do pó, tornando o processo de enchimento mais difícil e por outro lado, também devido à baixa precisão do procedimento manual de enchimento usado.

Os resultados obtidos permitem afirmar que o lote está de acordo com os limites descritos na Farmacopeia Portuguesa 9 para o ensaio de uniformidade de massa. Contudo, o objetivo pretendido com esta forma doseada, o tratamento de águas superficiais, não necessita de um rigor de dosagem semelhante a um medicamento.

### 3.5.2. Desagregação

As cápsulas foram sujeitas ao ensaio de desagregação, tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 19.

Tabela 19: Ensaio de desagregação

Formulação	Tempo de desagregação
Cápsulas	4 min e 30 s

As cápsulas desagregaram totalmente em 4 minutos e 30 segundos, satisfazendo assim o ensaio.

Como as cápsulas destinam-se a tratar a água oriunda de fontes impróprias das comunidades rurais de Moçambique, o uso consistirá na abertura das mesmas sendo o conteúdo adicionado à água; porém em certos casos poderá não ser necessário abri-las, como em águas mornas onde a temperatura estiver próxima de 37 °C.



### 3.6. Ensaio de turvação

Todos os resultados dos ensaios de turvação estão apresentados nas tabelas 21 e 22 do anexo. O tratamento dos resultados é apresentado nas figuras 29, 30 e 31. As figuras mostram as doses de pó, granulado e extrato adicionadas à água com turvação inicial de 200 UTN, 300 UTN e 400 UTN, bem como a turvação final obtida após o tratamento.

Na figura 29 (a e b), verifica-se que filtrando com papel de filtro, a dose de 500 mg/l de pó demonstrou maior eficiência de redução da turvação de 97,8%, correspondendo a uma redução de 200 UTN para 4 UTN. Na figura 29 (a1 e b1), verifica-se que filtrando com pano de algodão grosso, a dose de 250 mg/l de extrato demonstrou maior eficiência de redução da turvação de 90,8 %, correspondendo a uma redução de 200 UTN para 18 UTN. Na figura 29 (a2 e b2), verifica-se que filtrando com pano de algodão fino, a dose de 250 mg/l do extrato foi também a que demonstrou maior eficiência de redução da turvação de 83,7%, que corresponde a uma redução de 200 UTN para 33 UTN.

Na figura 30 (a e b), verifica-se que filtrando com papel de filtro, a dose de 250 mg/l de pó demonstrou maior eficiência de redução da turvação de 98,5%, correspondendo a uma redução de 300 UTN para 5 UTN. Na figura 30 (a1 e b1), verifica-se que filtrando com pano de algodão grosso, a dose de 250 mg/l de pó continuou a demonstrar maior eficiência de redução da turvação de 79,4 %, correspondendo a uma redução de 300 UTN para 62 UTN. Na figura 30 (a2 e b2), verifica-se que filtrando com pano de algodão fino, a dose de 250 mg/l de pó é a que demonstrou de novo maior eficiência de redução da turvação de 76,7%, que corresponde a uma redução de 300 UTN para 67 UTN.

Na figura 31 (a e b), verifica-se que filtrando com papel de filtro, a dose de 250 mg/l de extrato demonstrou maior eficiência de redução da turvação de 98,1%, correspondendo a uma redução de 400 UTN para 8 UTN. Na figura 31 (a1 e b1), verifica-se que filtrando com pano de algodão grosso, a dose de 250 mg/l de extrato continuou a demonstrar maior eficiência de redução da turvação de 83,2 %, correspondendo a uma redução de 400 UTN para 67 UTN. Na figura 22 (a2 e b2), verifica-se que filtrando com pano de algodão fino, a dose de 250 mg/l de extrato é a que também demonstrou maior eficiência de redução da turvação de 82,9%, que corresponde a uma redução de 400 UTN para 68 UTN.

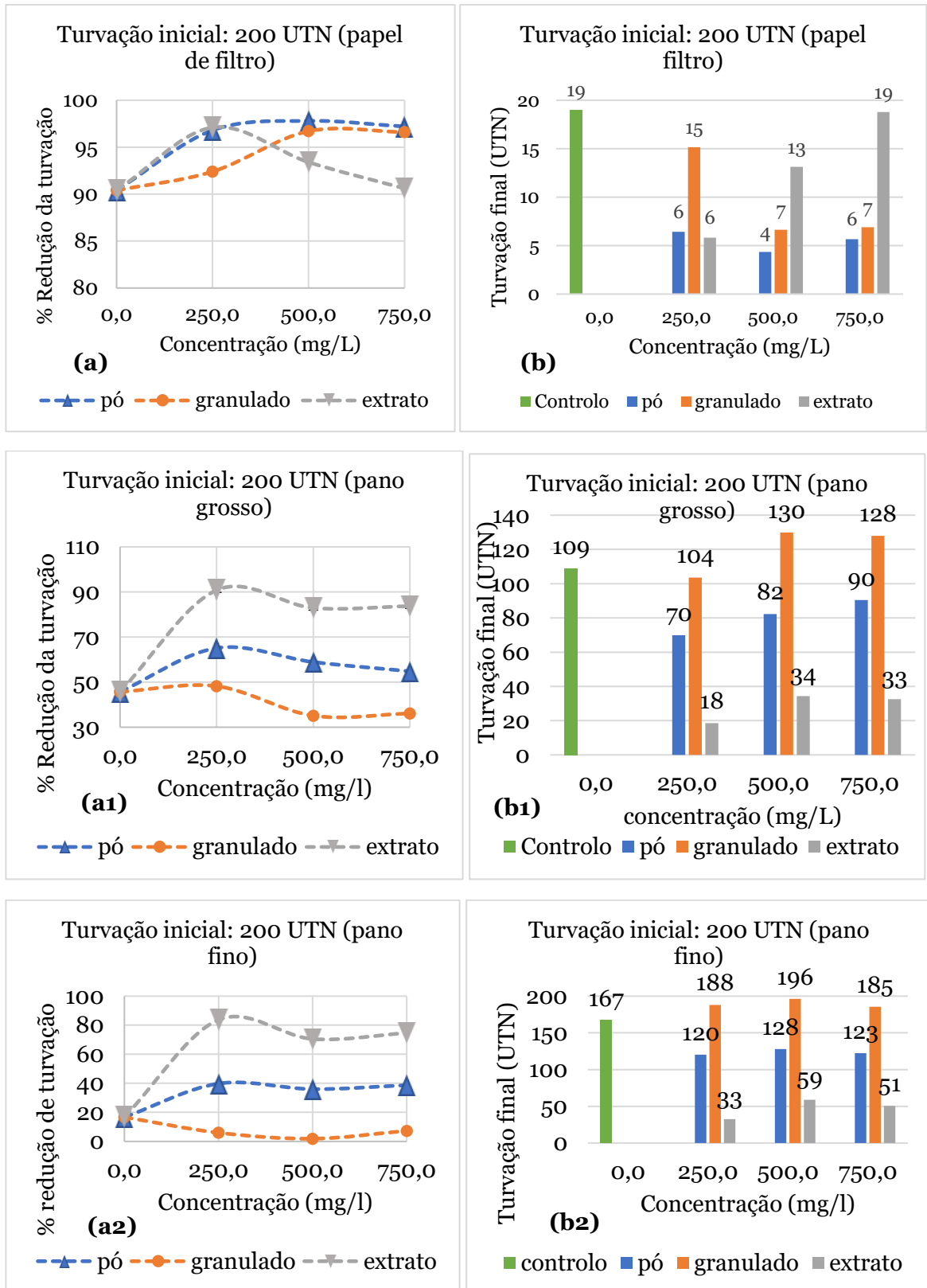


Figura 29: Percentagem de redução e turvação final atingida usando papel de filtro (a e b), pano grosso (a1 e b1) e pano fino (a2 e b2) a 200 UTN para diferentes doses de MO.

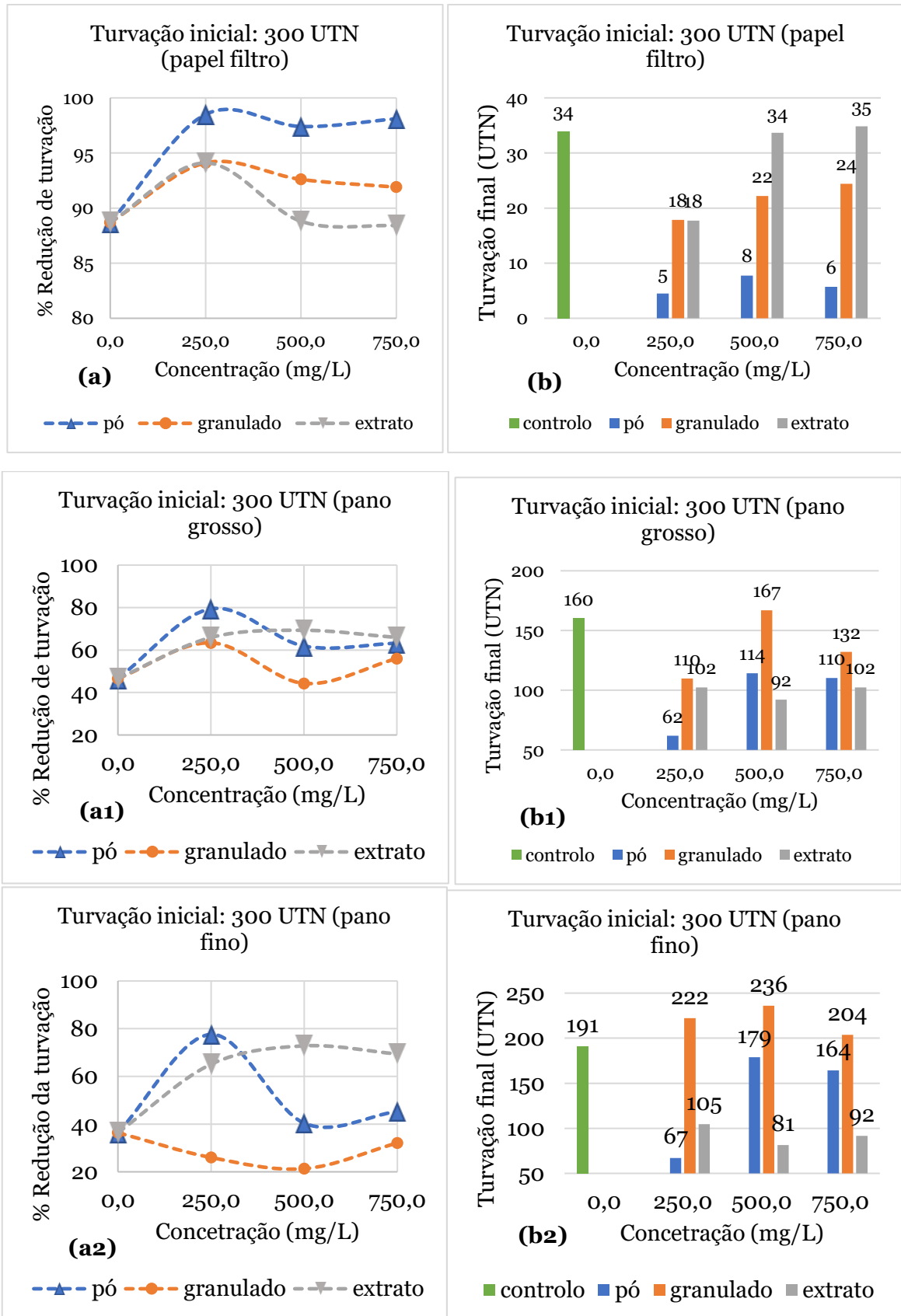


Figura 30: Percentagem de redução e turvação final atingida usando papel de filtro (a e b), pano grosso (a1 e b1) e pano fino (a2 e b2) a 300 UTN para diferentes doses de MO.

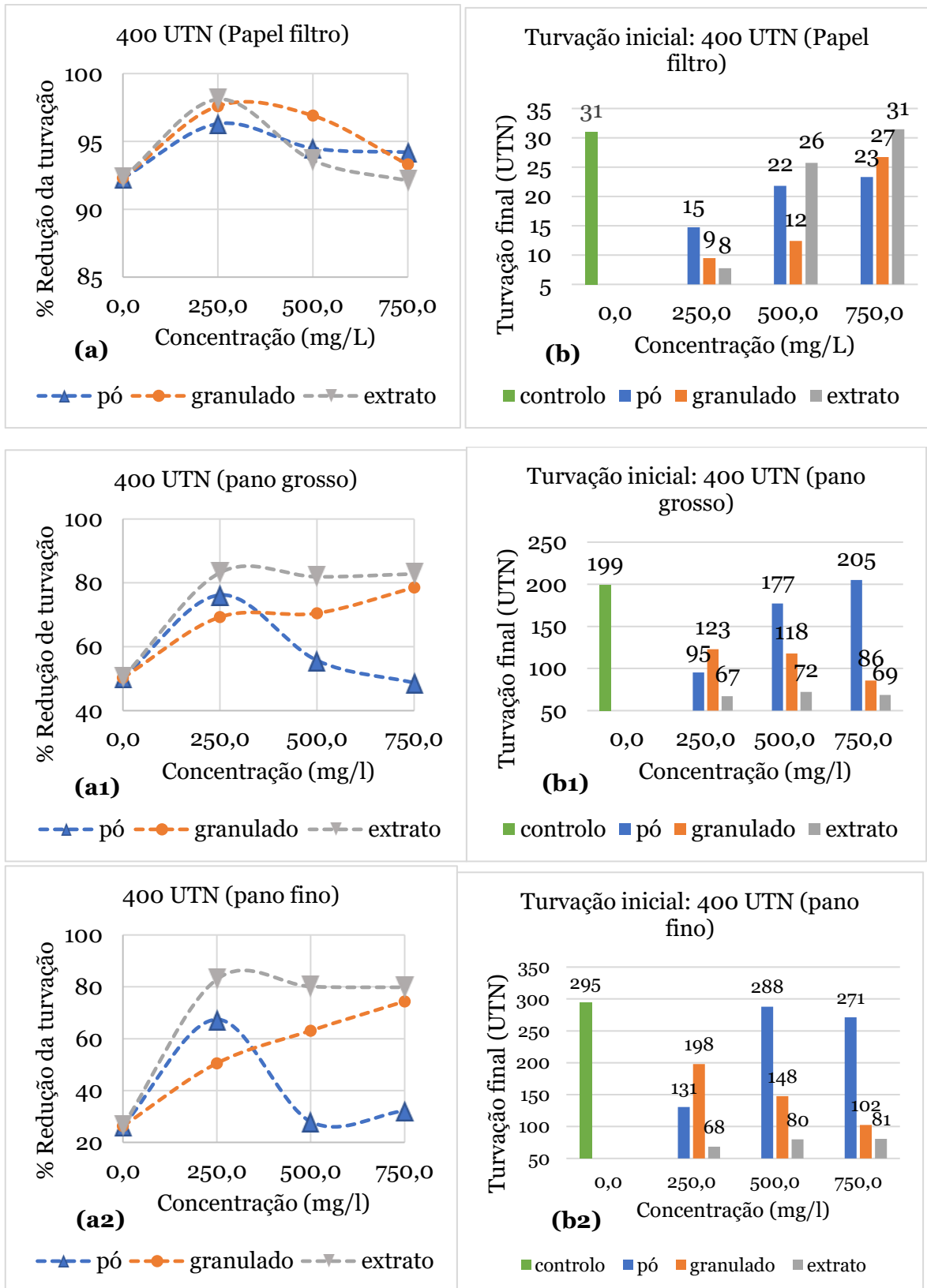


Figura 31: Percentagem de redução e turvação final atingida usando papel de filtro (a e b), pano grosso (a1 e b1) e pano fino (a2 e b2) a 400 UTN para diferentes doses de MO.

O ensaio de turvação é, geralmente, realizado recorrendo ao *Jar Test*. O teste é aplicado em escala piloto aos produtos químicos de tratamento de água usados numa estação de tratamento e simula o processo de coagulação/floculação. Ajuda aos operadores a determinar se estão usando a quantidade certa de produtos coagulantes/floculantes. Nesse teste são simultaneamente usados 4 – 6 recipientes (copos) contendo água que são submetidos a agitação rápida e lenta usando pás agitadoras. Ao fim do tempo de agitação, deixa-se em repouso 1 – 2 h. Recolhe-se o sobrenadante, filtra-se e efetua-se a leitura no turbidímetro (141).

Como não se dispunha do aparelho de *Jar Test*, utilizaram-se as placas de agitação magnética, uma vez que, o procedimento é semelhante. Provavelmente se teria melhores resultados, sobretudo com os panos, se o ensaio fosse realizado usando o *Jar Test*.

Durante os ensaios prévios verificou-se que ao aplicar o pó de MO em águas com turvação baixa na ordem de 10 – 80 UTN, não havia redução relevante deste parâmetro, pelo contrário, verificou-se um aumento. Isto constatou-se quando se usaram águas de um lago e de uma ETAR.

Analisando os resultados, à priori verifica-se que o papel de filtro seria o material ideal a usar para filtrar a água, porém na ausência deste, o material de pano de maior textura (malha mais apertada) é o mais indicado para o efeito e fácil de ser usado no meio rural. O pó e o extrato, demonstraram melhores resultados de eficiência de redução da turvação, ao passo que o granulado foi o menos eficaz, embora em alguns casos tenha uma eficácia superior ou semelhante, como com dose de 500 mg/l e 750 mg/l a 400 UTN usando papel de filtro, e com os outros meios de filtração os resultados tenham sido melhores do que com o pó. Não foram encontrados estudos semelhantes, nos quais se tenham comparado pó, granulado e extrato de MO.

Em relação ao meio de filtração, estudo semelhante foi feito por Muthuraman *et al* (35), no qual usou papel de filtro para filtrar água tratada com extrato de MO, tendo obtido resultados eficazes de eficiência de redução da turvação. Entretanto, há autores que não usaram nenhum meio de filtração após aplicação de MO à água, como o Golestanbagh *et al* (142) e Fahmi *et al* (143), entre outros. Não foram encontrados estudos nos quais se tenham usado panos como meio de filtração após aplicação de MO à água.

A dose de 250 mg/l, foi a que demonstrou maior eficiência na redução da turvação, sobretudo para o extrato e pó. Estudo semelhante foi feito por Muthuraman *et al* (35), no qual aplicou a dose de 250 mg/l de extrato de sementes de MO à água com turvação inicial de 500 UTN, tendo obtido maior eficiência de redução de 96,7%. Os resultados deste trabalho complementam os do estudo feito por Nkurunziza *et al* (144), no qual a dose de 125 mg/l de extrato de sementes de MO foi a que verificou eficiência semelhante de redução da turvação de 99,4% (para água de 250 UTN), 99,7% (para água de 350 UTN) e 99,8 % (para água de 450 UTN). No mesmo estudo, a dose de 250 mg/l do extrato resultou numa eficiência de redução de turvação de 99,3% (à água de 250 e 350 UTN) e 99,7% à água de 450 UTN.

### 3.7. Análise microbiológica

Os resultados da análise microbiológica estão apresentados na tabela 20. Foram consideradas contagens entre 30 e 300 unidades formadoras de colónias (ufc) nas placas, cujos valores foram convertidos para ufc/ml em função do volume aplicado e do factor de diluição.

Tabela 20: Número de colónias

Amostra	Número de colónias observadas por diluição (ufc/ml)								
	Pó			Cápsulas					
				Tempo zero (0)			Após 15 dias		
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
<i>E. coli</i>	----	----	----	----	----	----	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	4,3 x 10 <sup>5</sup>
MO	----	----	----	3 x 10 <sup>3</sup>	1	0	4,2 x 10 <sup>3</sup>	1	0
<i>E. coli</i> + MO	----	----	----	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>9 x 10 <sup>5**</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	3,2 x 10 <sup>4</sup>	2
Caulino	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caulino + <i>E. coli</i>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>9 x 10 <sup>5**</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	2,68 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup>
Caulino + <i>E. coli</i> + MO	6,8 x 10 <sup>3</sup>	17	6	>3 x 10 <sup>6*</sup>	18	16	5 x 10 <sup>3</sup>	0	0
Terra	>9 x 10 <sup>5**</sup>	3,6 x 10 <sup>4</sup>	5	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	20	5	3	0
Terra + <i>E. coli</i>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>9 x 10 <sup>5**</sup>	3,7 x 10 <sup>5</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	>3 x 10 <sup>6*</sup>	7,6 x 10 <sup>5</sup>
Terra + <i>E. coli</i> + MO	>9 x 10 <sup>5**</sup>	4,4 x 10 <sup>4</sup>	4	1,66 x 10 <sup>4</sup>	14	2	11	3	0

\* >3 x 10<sup>6</sup> – contagem superior a 300 ufc na placa (incontável).

\*\* >9 x 10<sup>6</sup> – significa que a contagem estaria entre 30 e 300 ufc na placa, contudo havia zonas aglomeradas.

Analisando os resultados, verifica-se efectivamente que o pó das sementes de MO apresenta uma capacidade inibitória do crescimento bacteriano, propriedade útil sobretudo para tratar águas oriundas de fontes impróprias nas zonas rurais. Essa propriedade inibitória é mais realista na amostra do inóculo da *E. coli* com água turva de terra, pois, para o caulino é provável as suas propriedades adsorventes, tenham contribuído para inibição de crescimento bacteriano.

Também, se verifica que o pó de moringa apresenta crescimento de colónias de bactérias (não é estéril, como seria de esperar). Isto é observado tanto no pó bruto, quanto no pó das cápsulas.

Estudos semelhantes foram realizados por Virk *et al.* (8), nos quais foram usados saquetas contendo 30 mg de pó das sementes de MO e quando aplicadas à água contaminada por *E. coli*, verificou-se uma redução bacteriana significativa de  $3,06 \times 10^3 \pm 0$  UFC/ml para  $1,06 \times 10^3 \pm 0,282$  UFC/ml. Bukar *et al.* (103) avaliou a eficácia antibacteriana das sementes de MO usando extrato etanólico, tendo verificado inibição da *E. coli* na concentração de 50 mg/ml. Lar *et al.* (145), também avaliou a eficácia antibacteriana das sementes de MO usando extrato etanólico, tendo verificado inibição para a *E. coli* nas concentrações de 400, 200 e 100 mg/ml. Shailemo *et al.* (146), também avaliou no seu estudo a eficácia antibacteriana das sementes de MO usando extratos aquoso, etanólico e de *n*-hexano, tendo verificado a inibição da *E. coli* na concentração de 50 mg/ml.

#### a. Estabilidade das cápsulas

Com este ensaio de estabilidade pretendeu-se avaliar a variação das propriedades coagulantes e/ou antibacterianas do pó de sementes de MO contido nas cápsulas em condições normais de utilização para tratamento de água entre 15 a 90 dias. Por falta de tempo, optou-se pela avaliação da eficácia de remoção da *E. coli* em águas turvas pelo pó das cápsulas de MO antes da colocação na estufa à 30 °C, que se considerou o tempo zero e após 15 dias. De acordo com os resultados apresentados na tabela 20, no tempo zero, o pó das cápsulas demonstrou capacidade de remoção das bactérias, tendo mantido essa propriedade com muita eficácia após 15 dias. Estes resultados sugerem que as propriedades coagulantes das sementes de MO se mantiveram. Na literatura científica não foram encontrados estudos de estabilidade em que se tenha avaliado a variação das propriedades coagulantes e/ou antibacterianas de pó das sementes de MO.



#### 4. CONCLUSÃO

Com a obtenção de extractos pretendeu-se contribuir para caracterização da composição fitoquímica das sementes de MO. Desta forma, concluiu-se que as sementes desta planta são ricas em ácidos gordos, tendo se verificado também a presença de metabolitos secundários de muito interesse, como os fitoesteróis e polifenóis.

Em relação a eficácia para a redução da turvação, concluiu-se que as sementes efectivamente têm esse potencial quando utilizadas em águas bastante turvas, isto é, com turvação igual ou superior a 200 UTN. Das três formas usadas (pó, granulado e extracto), o pó e o extrato aquoso demonstraram maior eficiência de redução da turvação do que o granulado. Essa redução verificou-se nas doses de 250 e 500 mg/l de pó e filtrando-se com papel de filtro, tendo-se conseguido remover 97 – 98,5 %. Conseguiu-se atingir 4 UTN, valor inferior a 5 UTN, o recomendado pela OMS. Para pano de algodão grosso, a dose de 250 mg/l do extrato reduziu até 90,8 % da turvação inicial e com o pano de algodão fino, a mesma dose do extrato reduziu até 83,7%. O pano de algodão grosso permitiu obter melhores resultados do que o fino e seria interessante em estudos futuros, utilizar na filtração mais do que um pano pois, talvez se consiga obter melhores resultados.

As sementes demonstraram eficiência antibacteriana, que foi constatada ao diminuir consideravelmente o número de bactérias (*E. coli*) usando a dose de 250 mg/l.

As propriedades coagulantes e/ou antibacterianas do pó das sementes de MO, não se alteraram após 15 dias de armazenamento das cápsulas na estufa a 30 °C. Isto é útil, pois se confirmar a estabilidade durante 6 – 12 meses irá permitir o uso das cápsulas fora da época de abundância das sementes e para as zonas com escassez destas. Seria então possível fornecer as populações rurais de Moçambique um *kit* com as cápsulas contendo pó de sementes de MO, na dose adequada para tratamento de 1 l de água, e um ou mais panos de algodão adequados ao processo de filtração.

## 5. ANEXOS

Anexo 1 – Resultados de percentagem de redução da turvação

Tabela 21: Percentagem de redução da turvação

Turvação inicial (UTN)	Filtração	Concentração de MO (mg/l)									
		0,0	250			500			750		
			Pó	Gran.*	Extrato	Pó	Gran.*	Extrato	Pó	Gran.*	Extrato
200	Papel filtro	90,4	96,8	92,4	97,1	97,8	96,7	93,4	97,2	96,6	90,6
	Pano grosso	45,7	65,1	48,2	90,8	58,9	35,1	82,9	54,8	36,1	83,7
	Pano fino	16,7	39,8	6	83,7	36	1,9	70,5	38,7	7,3	74,6
300	Papel filtro	88,7	98,5	94,1	94,1	97,4	92,6	88,8	98,1	91,9	88,4
	Pano grosso	46,6	79,4	63,4	65,9	61,9	44,3	69,3	63,2	56	65,9
	Pano fino	36,4	77,6	26	65,1	40,4	21,3	72,8	45,3	32,1	69,4
400	Papel filtro	92,3	96,3	97,6	65,1	94,5	96,9	93,6	94,2	93,3	92,1
	Pano grosso	50,3	76,2	69,3	83,2	55,7	70,5	81,9	48,7	78,5	82,8
	Pano fino	26,3	67,4	50,5	82,9	28	63,1	80,1	32,2	74,4	79,8

\*Granulado

## Anexo 2 – Resultados de Turvação final atingida

Tabela 22: Turvação final

Turvação inicial (UTN)	Filtração	Concentração de MO (mg/l)									
		0,0	250			500			750		
			Pó	Gran.	Extrato	Pó	Gran.	Extrato	Pó	Gran.	Extrato
200	Papel filtro	19	6	15	6	4	7	13	6	7	19
	Pano grosso	109	70	104	18	82	130	34	90	128	33
	Pano fino	167	120	188	33	128	196	59	123	185	51
300	Papel filtro	34	5	18	18	8	22	34	6	24	35
	Pano grosso	160	62	110	102	114	167	92	110	132	102
	Pano fino	191	67	222	105	179	236	81	164	204	92
400	Papel filtro	31	15	9	8	22	12	26	23	27	31
	Pano grosso	199	95	123	67	177	118	72	205	86	69
	Pano fino	295	131	198	68	288	148	80	271	102	81

## 6. REFERÊNCIAS

1. Awad MW, Hongtao; Li, Fengting WEAKNESSES OF Moringa oleifera USE IN WATER TREATMENT. *International Journal of Current Research*. 2013;5(5):1165-7.
2. Pandit AB, Kumar JK. Clean Water for Developing Countries. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2015;6:217-46.
3. Arnoldsson EB, Maria Assessment of drinking water treatment using Moringa Oleifera natural coagulant: A Minor Field Study in Maputo, Mozambique [Master of Science Thesis in Water Resources Engineering Minor Field Study]. Sweden: Faculty of Engineering, Lund University; 2007.
4. WMO B. Special Issue on WATER. *The journal of the World Meteorological Organization*. 2018;67 (1).
5. WHO. Drinking-water: WHO; 2019 (disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>).
6. Arnal JM, García-Fayos B, Sancho M, Verdú G, Lora J. Design and installation of a decentralized drinking water system based on ultrafiltration in Mozambique. *Desalination*. 2010;250(2):613-7.
7. Arnal JM, García-Fayos B, Sancho M. Application of ultrafiltration for drinking water production in decentralised systems: 20 years of the AQUAPOT project. *Desalination and Water Treatment*. 2018;103:296-306.
8. Virk AK, Kumari C, Tripathi A, Kakade A, Li X, Kulshrestha S. Development and efficacy analysis of a Moringa oleifera based potable water purification kit. *Journal of Water Process Engineering*. 2019;27:37-46.
9. Moreti LOR, Coldebella PF, Camacho FP, Carvalho Bongiovani M, Pereira De Souza AH, Kirie Gohara A, et al. Removal of Anabaena flos-aquae in water treatment process using Moringa oleifera and assessment of fatty acid profile of generated sludge. *Environ Technol*. 2016;37(11):1408-17.
10. Landázuri-Rojas AC, Villarreal JS, Núñez ER, Pico MM, Lagos AS, Caviedes M. Experimental evaluation of crushed Moringa oleifera Lam. seeds and powder waste during coagulation-flocculation processes. *J Environ Chem Eng*. 2018;6(4):5443-51.
11. Nisha RR, Jegathambal P, Parameswari K, Kirupa K. Biocompatible water softening system using cationic protein from moringa oleifera extract. *Applied Water Science*. 2017;7(6):2933-41.
12. Kansal SK, Kumari A. Potential of M. oleifera for the treatment of water and wastewater. *Chemical reviews*. 2014;114(9):4993-5010.

13. Liew AG, Noor MJMM, Muyibi SA, Fugara AMS, Muhammed TA, Iyuke SE. Surface water clarification using *M. oleifera* seeds. *International Journal of Environmental Studies*. 2006;63(2):211-9.
14. Brilhante RSN, Sales JA, Pereira VS, Castelo-Branco D, Cordeiro RA, de Souza Sampaio CM, et al. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2017;10(7):621-30.
15. Saucedo-Pompa S, Torres-Castillo JA, Castro-Lopez C, Rojas R, Sanchez-Alejo EJ, Ngangyo-Heya M, et al. *Moringa* plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food research international (Ottawa, Ont)*. 2018;111:438-50.
16. Kpan WB, Kone MW, Bonfoh B, Kamanzi K. Evaluation of eighteen west african plants for water purification, potential use for rural water treatment. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2017;39(5):310-6.
17. INE. IV Recenseamento Geral da População e Habitação 2017 (disponível em: [www.ine.gov.mz](http://www.ine.gov.mz)).
18. OMS U. OMS e UNICEF preocupadas com consumo de água imprópria em Moçambique 2012 (disponível em: <https://www.dw.com/pt-002/oms-e-unicef-preocupadas-com-consumo-de-%C3%A1gua-impr%C3%B3pria-em-mo%C3%A7ambique/a-16057693>).
19. Wheeler J, Agha S. Use of Certeza point-of-use water treatment product in Mozambique. *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development*. 2013;3(3):341-8.
20. Gray NF. DRINKING WATER QUALITY: Problems and Solutions. 2nd ed 2008. 245-68 p.
21. DeZuane J. Handbook of Drinking Water Quality. 2nd Edition ed1997. 592 p.
22. Mendes BO, J. F. Santos. Qualidade da água para consumo humano. LIDEL ed. Lisboa 2004. 145-67; 559-99 p.
23. RIBEIRO ATA. APLICAÇÃO DA MORINGA OLEIFERA NO TRATAMENTO DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: Remoção de poluentes por coagulação-floculação: Universidade do Porto; 2010.
24. WATER H. Water Treatment Processes 2019 (disponível em: <https://www.hunterwater.com.au/Water-and-Sewer/Water-Supply/Water-Treatment-Processes.aspx>).
25. CDC. Drinking Water 2019 (disponível em: [https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water\\_treatment.html](https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_treatment.html)).
26. LENNTECH. Coagulation-Flocculation 2020 (disponível em: <https://www.lenntech.com/library/coagulation-flocculation/coagulation-flocculation.htm>).

27. Renault F, Sancey B, Badot PM, Crini G. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*. 2009;45(5):1337-48.
28. Matsinhe N. Challenges and Opportunities For Safe Water Supply in Mozambique. Lund: Lund University; 2008.
29. Ndabigengesere A, Subba Narasiah K. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*. 1997;32(3):781-91.
30. Ndabigengesere A, Narasiah KS. Use of *moringa oleifera* seeds as a primary coagulant in wastewater treatment. *Environ Technol*. 1998;19(8):789-800.
31. Arnoldsson EB, Maria; Matsinhe, Nelson; Persson, Kenneth M. . Assessment of drinking water treatment using *Moringa oleifera* natural coagulant. *VATTEN*. 2008;64:137–50.
32. WHO. Guidelines for Drinking-water Quality. 4th edition ed2017.
33. WHO. Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Al Dufour; Snozzi Mea, editor. London, UK: IWA; 2003.
34. WATER QUALITY AND HEALTH - REVIEW OF TURBIDITY: Information for regulators and water suppliers, (2017).
35. Muthuraman G, Sasikala S. Removal of turbidity from drinking water using natural coagulants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2014;20(4):1727-31.
36. Salaheldeen M, Aroua MK, Mariod AA, Cheng SF, Abdelrahman MA, Atabani AE. Physicochemical characterization and thermal behavior of biodiesel and biodiesel-diesel blends derived from crude *Moringa peregrina* seed oil. *Energy Conversion and Management*. 2015;92:535-42.
37. Stohs SJ, Hartman MJ. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*. 2015;29(6):796-804.
38. Souto PCJ, S.G.S.M. . Origem, botânica e morfologia da *moringa*. *Potencialidades da Moringa oleifera Lam*. IV. p. 15-28.
39. Swati, Virk AK, Kumari C, Ali A, Garg P, Thakur P, et al. *Moringa oleifera*-a never die tree: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(12):57-65.
40. Abd El-Hack M, Alagawany M, Elrys A, Desoky E-S, Tolba H, Elnahal A, et al. Effect of Forage *Moringa oleifera* L. (*moringa*) on Animal Health and Nutrition and Its Beneficial Applications in Soil, Plants and Water Purification. *Agriculture*. 2018;8(9):145.
41. Kumssa DB, Joy EJ, Young SD, Odee DW, Ander EL, Broadley MR. Variation in the mineral element concentration of *Moringa oleifera* Lam. and *M. stenopetala* (Bak. f.) Cuf.: Role in human nutrition. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175503.
42. Heuzé VT, G.; Hassoun, P.; Bastianelli, D.; Lebas, F. . *Moringa* (*Moringa oleifera*) 2019 (disponível em: <https://www.feedipedia.org/node/124>).

43. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(6):12791-835.
44. Rani NZA, Husain K, Kumolosasi E. *Moringa* genus: A review of phytochemistry and pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(FEB).
45. Dadamouny MA, Unterseher M, König P, Schnittler M. Population performance of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori (Moringaceae) at Sinai Peninsula, Egypt in the last decades: Consequences for its conservation. *Journal for Nature Conservation*. 2016;34:65-74.
46. Mahklouf MH. A new record *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in the Flora of Libya. *Journal of Wildlife and Biodiversity* 2019;3 (1):52-7
47. Prabu SL, Umamaheswari A, Puratchikody A. Phytopharmacological potential of the natural gift *Moringa oleifera* Lam and its therapeutic application: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2019;12(11):485-98.
48. Tshabalala T, Ncube B, Madala NE, Nyakudya TT, Moyo HP, Sibanda M, et al. Scribbling the Cat: A Case of the "Miracle" Plant, *Moringa oleifera*. *Plants-Basel*. 2019;8(11).
49. Saini RK, Sivanesan I, Keum YS. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech*. 2016;6(2):203.
50. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
51. Ma ZF, Ahmad J, Zhang H, Khan I, Muhammad S. Evaluation of phytochemical and medicinal properties of *Moringa* (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. *South African Journal of Botany*. 2019.
52. PubChem. Glucomoringin 2020 (disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102222710>).
53. Galuppo M, Nicola GR, Iori R, Dell'utri P, Bramanti P, Mazzon E. Antibacterial activity of glucomoringin bioactivated with myrosinase against two important pathogens affecting the health of long-term patients in hospitals. *Molecules*. 2013;18(11):14340-8.
54. Al-Anizi AA, Hellyer MT, Zhang DY. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. *Water Research*. 2014;56:77-87.
55. Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJ. Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63(7):813-20.
56. Gopalakrishnan L, Doriya K, Kumar DS. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*. 2016;5(2):49-56.

57. Martins MAR, Silva LP, Ferreira O, Schröder B, Coutinho JAP, Pinho SP. Terpenes solubility in water and their environmental distribution. *Journal of Molecular Liquids*. 2017;241:996-1002.
58. Guimaraes AG, Serafini MR, Quintans-Junior LJ. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24(3):243-65.
59. Souza MTdSea. Structure–Activity Relationship of Terpenes with Anti-Inflammatory Profile – A Systematic Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2014;115: 244–56.
60. Gueyrard DB, J.; Iori, R.; Palmierib, S.; Rollina, P. First synthesis of an O-glycosylated glucosinolate isolated from *Moringa oleifera*. *Tetrahedron Letters*. 2000;41:8307–9.
61. Waterman C, Cheng DM, Rojas-Silva P, Poulev A, Dreifus J, Lila MA, et al. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. *Phytochemistry*. 2014;103:114-22.
62. Tetteh ONA, Ulrichs C, Huyskens-Keil S, Mewis I, Amaglo NK, Oduro IN, et al. Effects of harvest techniques and drying methods on the stability of glucosinolates in *Moringa oleifera* leaves during post-harvest. *Scientia Horticulturae*. 2019;246:998-1004.
63. Mithen R. Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*. 2001;34(1):91-103.
64. Fahey JW, Olson ME, Stephenson KK, Wade KL, Chodur GM, Odee D, et al. The Diversity of Chemoprotective Glucosinolates in Moringaceae (*Moringa* spp.). *Sci Rep*. 2018;8(1):7994.
65. Chen R, Wang XJ, Zhang YY, Xing Y, Yang L, Ni H, et al. Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds. *Food Chemistry*. 2019;300.
66. Makita C, Chimuka L, Steenkamp P, Cukrowska E, Madala E. Comparative analyses of flavonoid content in *Moringa oleifera* and *Moringa ovalifolia* with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting. *South African Journal of Botany*. 2016;105:116-22.
67. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. 2012;3:222.
68. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:162750.
69. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*. 2002;5(3):218-23.
70. Ono E, Homma Y, Horikawa M, Kunikane-Doi S, Imai H, Takahashi S, et al. Functional differentiation of the glycosyltransferases that contribute to the chemical



diversity of bioactive flavonol glycosides in grapevines (*Vitis vinifera*). *Plant Cell*. 2010;22(8):2856-71.

71. Lin M, Zhang J, Chen X. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*. 2018;47:469-79.

72. MADHUKITH TI, MARTA; SHAHIDI, FERREIDON Antioxidant Properties of Pearled Barley Fractions. *J Agric Food Chem*. 2006;54:3283-9.

73. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2019;24:e00370.

74. Rodríguez-Pérez C, Quirantes-Piné R, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*. 2015;66:246-54.

75. Govardhan Singh RS, Negi PS, Radha C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(4):1883-91.

76. Vyas S, Kachhwaha S, Kothari SL. Comparative analysis of phenolic contents and total antioxidant capacity of *Moringa oleifera* Lam. *Pharmacognosy Journal*. 2014;7(1):44-51.

77. ROBBINS RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem* 2003; 51:2866-87.

78. Maldini M, Maksoud SA, Natella F, Montoro P, Petretto GL, Foddai M, et al. *Moringa oleifera*: Study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2014;49(9):900-10.

79. Kuramoto MA, Hirokazu; Uemura, Daisuke Bioactive Alkaloids from the Sea: A Review. *Marine Drugs*. 2004;2:39-54.

80. de Sousa Falcao H, Leite JA, Barbosa-Filho JM, de Athayde-Filho PF, de Oliveira Chaves MC, Moura MD, et al. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review. *Molecules*. 2008;13(12):3198-223.

81. Jaiswal HS, Om Ji; Chauhan, Ankit; Sahu, Maneesh Kumar; Surya Prakash DV. A review on tannins. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2018;6(3):16-7.

82. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1998;38(6):421-64.

83. Hassanpour SM-S, Naser; Eshratkhah, Behrad; Mehmandar, Farhad Baghbani Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion*. 2011;1(1):47-53.

84. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev*. 2010;9(3):425-74.

85. Weng A, Thakur, Melzig, Fuchs. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy*. 2011;19.
86. Guclu-Ustundag O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2007;47(3):231-58.
87. WINA EM, STEFAN; BECKER, KLAUS The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Productions: A Review. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8093-105.
88. Talreja TG, Asha Phytosterols production in *Moringa oleifera* in vitro cultures. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2016;4(9):66-9.
89. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res*. 2002;41(6):457-500.
90. Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP, Trautwein EA. Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Prog Lipid Res*. 2008;47(1):37-49.
91. Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernandez-Mijares A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(36):4061-75.
92. de Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(7):362-9.
93. Bichi MH. A Review of the Applications of *Moringa oleifera* Seeds Extract in Water Treatment. *Civil and Environmental Research*. 2013;3.
94. Ajav EA, Fakayode OA. Physical Properties of *Moringa oleifera* Seeds in relation to an Oil Expeller Design. *Agrosearch*. 2013;13(1):115.
95. Bhutada PR, Jadhav AJ, Pinjari DV, Nemade PR, Jain RD. Solvent assisted extraction of oil from *Moringa oleifera* Lam. seeds. *Industrial Crops and Products*. 2016;82:74-80.
96. Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K, Maoka T, et al. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation research*. 1999;440(2):181-8.
97. Saleem M, Bachmann RT. A contemporary review on plant-based coagulants for applications in water treatment. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2019;72:281-97.
98. Chelliah R, Ramakrishnan S, Antony U. Nutritional quality of *Moringa oleifera* for its bioactivity and antibacterial properties. *International Food Research Journal*. 2017;24(2):825-33.

99. Rahman MMS, M. Mominul Islam; Sharmin, Shamima Akhtar; Islam, M. Soriful; et al. Antibacterial Activity of Leaf Juice and Extracts of *Moringa oleifera* Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. *CMU J Nat Sci.* 2009;8(219-228).
100. Viera GH, Mourao JA, Angelo AM, Costa RA, Vieira RH. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010;52(3):129-32.
101. Hussain SM, Farnaz; Mahmood, Sidra An exposition of medicinal preponderance of *Moringa oleifera* (Lank.): review. *Pak J Pharm Sci.* 2014;27(2):397-403.
102. Nikkon FS, Z. A.; Rahman, M. H.; et al. *In vitro* Antimicrobial Activity of the Compound Isolated from Chloroform Extract of *Moringa oleifera* Lam. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2003;6(22):1888-90.
103. Bukar AU, A.; Oyeyi, T.I. ANTIMICROBIAL PROFILE OF MORINGA OLEIFERA LAM. EXTRACTS AGAINST SOME FOOD – BORNE MICROORGANISMS. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences.* 2010;3(1):43 - 8.
104. Caceres A, Cabrera O, Morales O, Mollinedo P, Mendia P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 1991;33(3):213-6.
105. Peixoto JR, Silva GC, Costa RA, de Sousa Fontenelle JR, Vieira GH, Filho AA, et al. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pacific journal of tropical medicine.* 2011;4(3):201-4.
106. Suarez ME, J. M.; et al. Expression of a Plant-Derived Peptide Harboring Water-Cleaning and Antimicrobial Activities. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING.* 2003;81(1).
107. Eilert U, Wolters B, Nahrstedt A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. *Planta Med.* 1981;42(1):55-61.
108. Sharma A, Patel VK, Ramteke P. Identification of vibriocidal compounds from medicinal plants using chromatographic fingerprinting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2008;25(1):19-25.
109. Bhattacharya A, Tiwari P, Sahu PK, Kumar S. A Review of the Phytochemical and Pharmacological Characteristics of *Moringa oleifera*. *Journal of pharmacy & bioallied sciences.* 2018;10(4):181-91.
110. PATEL PP, NIVEDITA; PATEL, DHARA; et al. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF MORINGA OLEIFERA. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2014;6(5):144-7.
111. Jha N, Mohanka R, Azad R. Antifungal Investigation of the Constituents of *Moringa oleifera* lamk. Root Bark Extract. *Asian Journal of Chemistry.* 2009;21(9):7437-9.

112. Marrufo T, Nazzaro F, Mancini E, Fratianni F, Coppola R, De Martino L, et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Mozambique. *Molecules*. 2013;18(9):10989-1000.
113. Gamez LLS, Luna-delRisco M, Cano RES. Comparative study between *M-oleifera* and aluminum sulfate for water treatment: case study Colombia. *Environmental monitoring and assessment*. 2015;187(10).
114. Madsen M, Schlundt J, Omer EFE. Effect of water coagulation by seeds of *Moringa oleifera* on bacterial concentrations. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;90(3):101-9.
115. Okuda T, Baes AU, Nishijima W, Okada M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*. 1999;33(15):3373-8.
116. Muniz GL, Duarte FV, de Oliveira SB. Use of *Moringa oleifera* seeds for the removal of turbidity of water supply. *Rev Ambiente Agua*. 2015;10(2):454-63.
117. Katayon S, Noor MJ, Asma M, Ghani LA, Thamer AM, Azni I, et al. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. *Bioresource technology*. 2006;97(13):1455-60.
118. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res*. 2007;21(1):17-25.
119. Sajidu SMIH, E. M. T.; Persson, I.; Masamba, W. R. L.; Kayambazinthu, D. pH dependence of sorption of  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Cr^{3+}$  on crude water and sodium chloride extracts of *Moringa stenopetala* and *Moringa oleifera*. *African Journal of Biotechnology* 2006;5(23):2397-401.
120. Nkurunziza T, Nduwayezu JB, Banadda EN, Nhapi I. The effect of turbidity levels and *Moringa oleifera* concentration on the effectiveness of coagulation in water treatment. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 2009;59(8):1551-8.
121. Camacho FP, Sousa VS, Bergamasco R, Ribau Teixeira M. The use of *Moringa oleifera* as a natural coagulant in surface water treatment. *Chemical Engineering Journal*. 2017;313:226-37.
122. Ghebremichael KA, Gunaratna KR, Dalhammar G. Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006;70(5):526-32.
123. Zaid AQ, Ghazali SB, Mutamim NSA, Olalere OA. Experimental optimization of *Moringa oleifera* seed powder as bio-coagulants in water treatment process. *Sn Applied Sciences*. 2019;1(5).

124. Arantes CC, Paterniani JES, Rodrigues DS, Hatori PS, Pires MSG. Different forms of application of *Moringa oleifera* seeds in water treatment. *Rev Bras Eng Agric Ambient.* 2015;19(3):266-72.
125. Ndabigengesere A, Narasiah KS, Talbot BG. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Research.* 1995;29(2):703-10.
126. Ghebremichael KA, Gunaratna KR, Henriksson H, Brumer H, Dalhammar G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water research.* 2005;39(11):2338-44.
127. Marobhe NJR, Gunno; Jacks, Gunnar The Study of Water Supply and Traditional Water Purification Knowledge in Selected Rural Villages in Tanzania: Indigenous Knowledge Systems and Sustainable Development: Relevance for Africa. *Tribes and Tribals.* 2007;1:111-20
128. Ali NM, N.; Badri, A. WOMEN AND THE ENVIRONMENT IN THE SUDAN. In: Baxter D, editor. ENVIRONMENTAL RESEARCH PAPER SERIES. Institute of Environmental Studies, University of Khartoum, 1981. p. 42-58.
129. Moulin M, Mossou E, Signor L, Kieffer-Jaquinod S, Kwaambwa HM, Nermark F, et al. Towards a molecular understanding of the water purification properties of *Moringa* seed proteins. *Journal of colloid and interface science.* 2019;554:296-304.
130. Vunain E, Masoamphambe EF, Mpeketula PMG, Monjerezi M, Etale A. Evaluation of coagulating efficiency and water borne pathogens reduction capacity of *Moringa oleifera* seed powder for treatment of domestic wastewater from Zomba, Malawi. *Journal of Environmental Chemical Engineering.* 2019;7(3).
131. Broin M, Santaella C, Cuine S, Kokou K, Peltier G, Joet T. Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. *Applied microbiology and biotechnology.* 2002;60(1-2):114-9.
132. Abd Wahid MA, Megat Mohd Noor MJ, Goto M, Sugiura N, Othman N, Zakaria Z, et al. Recombinant protein expression of *Moringa oleifera* lectin in methylotrophic yeast as active coagulant for sustainable high turbid water treatment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 2017;81(8):1642-9.
133. Rowe RCS, Paul J.; Quinn, Marian E. Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth edition ed: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.
134. Ndabigengesere A, Narasiah KS. Influence of operating parameters on turbidity removal by coagulation with *moringa oleifera* seeds. *Environmental Technology (United Kingdom).* 1996;17(10):1103-12.
135. Aziz NAA, Jayasuriya N, Fan L, Iop. Adsorption Study on *Moringa Oleifera* Seeds and *Musa Cavendish* as Natural Water Purification Agents for Removal of Lead, Nickel and

- Cadmium from Drinking Water. Soft Soil Engineering International Conference 2015. IOP Conference Series-Materials Science and Engineering. 1362016.
136. Valverde KC, Coldebella PF, Silva MF, Nishi L, Bongiovani MC, Bergamasco R. Moringa oleifera Lam. and Its Potential Association with Aluminium Sulphate in the Process of Coagulation/Flocculation and Sedimentation of Surface Water. International Journal of Chemical Engineering. 2018.
137. Santos AFS, Matos M, Sousa A, Costa C, Nogueira R, Teixeira JA, et al. Removal of tetracycline from contaminated water by Moringa oleifera seed preparations. Environ Technol. 2016;37(6):744-51.
138. Sengupta ME, Keraita B, Olsen A, Boateng OK, Thamsborg SM, Palsdottir GR, et al. Use of Moringa oleifera seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. Water research. 2012;46(11):3646-56.
139. Farmacopeia P. Métodos de farmacotecnia. INFARMED; 2008. p. 312-5.
140. Prista LNA, A.C.; Morgado, R.; Lobo, J.S. Tecnologia Farmacêutica. 8a Edição ed2011. 770 p.
141. Satterfield Z. Jar Testing. Tech Brief. 2005;5(1).
142. Golestanbagh M, Ahamad IS, Idris A, Yunus R. Effect of storage of shelled Moringa oleifera seeds from reaping time on turbidity removal. Journal of water and health. 2011;9(3):597-602.
143. Fahmi MR, Najib NWAZ, Ping PC, Hamidin N. Mechanism of turbidity and hardness removal in hard water sources by using Moringa oleifera. Journal of Applied Sciences. 2011;11(16):2947-53.
144. Nkurunziza T, Nduwayezu JB, Banadda EN, Nhapi I. The effect of turbidity levels and Moringa oleifera concentration on the effectiveness of coagulation in water treatment. Water Science and Technology 2009. p. 1551-8.
145. Lar PMO, E. E; Dashe, E.; Oluoma J. N. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MORINGA OLEIFERA SEED EXTRACTS ON SOME GRAM NEGATIVE BACTERIAL ISOLATES African Journal of Natural Sciences. 2011;14:57-62.
146. Shailemo DHP, Kwaambwa HM, Kandawa-Schulz M, Msagati TAM. Antibacterial Activity of <i>Moringa ovalifolia</i> and <i>Moringa oleifera</i> Methanol, N-Hexane and Water Seeds and Bark Extracts against Pathogens That Are Implicated in Water Borne Diseases. Green and Sustainable Chemistry. 2016;06(02):71-7.