



# Efecto del extracto acuoso de *Moringa oleifera* sobre el índice mitótico y la frecuencia de micronucleos en *Allium cepa*

Effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* on the mitotic index and the frequency of micronuclei in *Allium cepa*

Florencia Vergara Quispe y Carlos Quijano-Jara

Laboratorio de Genética de Poblaciones. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú

## RESUMEN

*Moringa oleifera* es usada alrededor del mundo debido a que se le atribuye diversas propiedades medicinales; sin embargo, poco se sabe sobre sus efectos adversos sobre el material genético. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* sobre el índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos utilizando el test *Allium*. Se expusieron las raíces de *Allium cepa* a 0.05, 0.1, 0.5 y 1g/L de extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* durante 8 horas y se analizaron las raicillas a las 0, 48 y 72 horas de recuperación. A partir de las 48 horas se evidenció daño citotóxico con disminución del índice mitótico en todas las raíces expuestas al extracto con respecto al tratamiento 0 g/L y sin alterar el índice de cada fase mitótica. No se observaron diferencias significativas en las frecuencias de micronúcleos entre los tratamientos. Las alteraciones del IM pueden deberse a la presencia de sustancias desconocidas o poco estudiadas, que se encuentran presentes en *M. oleifera*, tales como glucosinolatos, isotiocianatos, etc.

**Palabras clave:** Extracto acuoso, *Moringa*, Índice Mitótico, Micro núcleos

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* is used around the world because it is attributed various medicinal properties; however, little is known about their adverse effects on the genetic material. The objective of this study was to evaluate the effect of the aqueous extract of *M. oleifera* seeds on the mitotic index and the frequency of micronuclei using the *Allium* test. The roots of *Allium cepa* were exposed to 0.05, 0.1, 0.5 and 1g / L of aqueous extract of seeds of *M. oleifera* during 8 hours and rootlets were analyzed at 0, 48 and 72 hours of recovery. After 48 hours, cytotoxic damage was observed with mitotic index decrease in all the roots exposed to the extract with respect to the treatment 0 g / L and without altering the index of each mitotic phase. No significant differences were observed in the micronucleus frequencies between the treatments. The alterations of the IM can be due to the presence of unknown or little studied substances, which are present in *M. oleifera*, such as glucosinolates, isothiocyanates, etc.

**Keywords:** Aqueous extract, *Moringa*, Mitotic Index, Micronuclei

## INTRODUCCIÓN

A través de la historia el hombre ha usado las plantas para satisfacer sus necesidades con propósitos medicinales y todos estos conocimientos han transmitido por tradición a través de las generaciones<sup>1,2</sup>. Se estima que la frecuencia de uso es mayor en los países en vía de desarrollo, debido a la inaccesibilidad de los tratamientos<sup>3,4</sup>.

*Moringa oleifera* “moringa” fue introducida oficialmente al Perú en 1999<sup>5</sup>, es la especie más conocida del género *Moringa* y pertenece a la familia Moringaceae, siendo el único género encontrado<sup>6</sup>. Es oriunda del noroeste de la India, se encuentra ampliamente distribuido por toda la India, Asia occidental, península Arábiga, África del Este y del Oeste, Caribe, Florida, Centroamérica y América del Sur<sup>6,7</sup>. Presenta un alto contenido de carbohidratos, proteínas, vitaminas, flavonoides, ácidos grasos poliinsaturados, alcaloides, isotiocianatos, saponinas, oxalatos, minerales, entre otros nutrientes<sup>8,9</sup> y se cree que sus propiedades pueden aliviar más de 300 enfermedades<sup>10</sup>.

Entre los beneficios que se le puede atribuir está la capacidad analgésica<sup>11</sup> propiedades antiinflamatorias<sup>12</sup>, antidiabética, restaurador de tejidos<sup>13</sup>, para tratar la gastritis<sup>14</sup>, la hipertensión<sup>15</sup>, como antioxidantes y anticancerígenas<sup>16</sup>.

El uso de productos naturales con fines medicinales, aumentan cada día más, sin embargo, se han encontrado evidencias de que plantas, consideradas como medicinales, presentan alta concentración de sustancias como los alcaloides y los glúcidos cianogénicos, que producen toxicidad a nivel celular<sup>17,18</sup>. En el caso de *M. oleifera* L existen diversas investigaciones donde se observa toxicidad debido a su forma de empleo; tal como, Canett, et al.<sup>19</sup> que llegaron a la conclusión de que las partes potencialmente tóxicas vendrían a ser la raíz, la corteza y las semillas debido a que presentan sustancias tóxicas para el organismo, como moringina, moringinina, spirochin y bencil isocianato. Algunos autores encontraron moringa puede ocasionar daño hepático y renal<sup>20</sup>, citotoxicidad<sup>21</sup> y genotoxicidad<sup>22</sup>.

Existen diversos ensayos para determinar la genotoxicidad y citotoxicidad de ciertas sustancias, entre los cuales encontramos ensayos *in vitro* como son los cultivos de ciertas líneas celulares de tejidos<sup>23</sup> y los ensayos *in vivo* en los que se utilizan organismos modelo como *Mus musculus*<sup>24</sup>, *Artemia salina*<sup>25</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>26</sup>, *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*<sup>27</sup>, *Vicia faba*<sup>28</sup>, *Allium cepa*<sup>29</sup>, entre otras especies.

El test *Allium* fue usado por primera vez por Levan<sup>30</sup> y desde entonces ha venido siendo usado por diferentes investigadores hasta la actualidad. Se ha empleado para observar alteraciones producidas por diferentes sustancias como químicos y pesticidas<sup>31</sup>, control ambiental<sup>32</sup> y extractos naturales<sup>33</sup>. Este test ha sido reconocido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, quienes bajo el Programa Gene-Tox, indicaron que el Test *Allium* es un test recomendado para mostrar el efecto mutagénico de ciertas sustancias, debido a su alto grado de sensibilidad<sup>34</sup>.

La inaccesibilidad de muchos fármacos sumado a nuestras costumbres ancestrales ha llevado a muchas personas en nuestro país a buscar remedios naturales para combatir diversas enfermedades. Las semillas de “moringa” han alcanzado un mayor impacto que las hojas y han comenzado a usarse de distintas formas y dosis; dejando de lado que el uso inadecuado de sustancias puede llegar a ser nocivo para la salud, ante lo cual es necesario llevar a cabo una serie de análisis que determinen su toxicidad a diferentes niveles, como por ejemplo a nivel del ciclo celular.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico.

Se compró semillas de *M. oleifera* “moringa” de la Asociación de Agricultores del valle encantado el Progreso – Patapo, Chiclayo, junto con material vegetal necesario para realizar la identificación, la cual se hizo en el “*Herbarium Truxillense*”.

### Obtención de extractos de *Moringa oleifera*.

Las semillas fueron lavadas, secadas y peladas, eliminando la cascara que los cubría, se procedió a pulverizar las semillas y se hizo una solución madre (SM), que se obtuvo diluyendo un gramo de semilla de *Moringa oleifera* en un litro de agua destilada (1g/L). Esta mezcla se colocó por 30 minutos

en un homogenizador magnético y luego se filtró en papel filtro Watman N°1, para eliminar algunas partículas no disueltas<sup>35</sup>.

#### **Enraizamiento de bulbos de *Allium cepa* L.**

Se colocaron bulbos de *Allium cepa*, sin las raíces ni catafilas secas, en agua mineral embotellada en oscuridad con la finalidad de obtener raíces de 3 a 4 cm. El agua se renovó cada 24 horas durante tres días, para los tratamientos se utilizaron bulbos que se encontraban en buen estado y que presentaban como mínimo 10 raíces de tamaño homogéneo<sup>36</sup>.

#### **Diseño experimental.**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. A partir de la solución madre se diluyó con agua destilada para obtener concentraciones de 1, 0.5, 0.1 y 0.05 g/L, se consideró también un grupo control consistente en agua mineral (0 g/L). Se asignaron los tratamientos aleatoriamente y se dejaron los bulbos por un lapso de 8 horas, cumplido el tiempo se colectó la primera muestra de las raíces, la cual fue colocada en 5 mL con Carnoy; los bulbos fueron colocados en agua mineral donde inició el tiempo de recuperación y pasados las 48 y 72 horas se colectó muestras de raíces.

#### **Obtención de preparados citológicos.**

Las raíces fijadas fueron refrigeradas a 4 grados hasta el momento de su coloración y análisis. Se utilizó el protocolo de Tjio & Leván<sup>37</sup> modificado para la tinción, se agregó una proporción de 9 gotas de Orceína acética al 2% por 2 gota de HCl al 1.5N, dejándolo colorear por un tiempo de 1 hora, luego se utilizó la técnica de aplastamiento o “squash”.

#### **Determinación del Índice Mitótico e Índice de Fases.**

Para el análisis de índice mitótico se utilizó un microscopio compuesto con el objetivo 40X; se contó usando la técnica de barrido, aproximadamente 2000 células por unidad experimental. Una vez obtenida la cantidad de células en cada fase se usó la fórmula descrita por Berrocal, et al.<sup>38</sup>, para hallar el Índice Mitótico (IM) y el Índice de cada fase mitótica (IF):

$$IM = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número de células totales}} \times 100\%$$

$$IF = \frac{\text{Número de células por fase mitótica}}{\text{Número de células en división}} \times 100\%$$

#### **Determinación de micronúcleos.**

Para el análisis de micronúcleos se utilizó un microscopio compuesto con el objetivo 40x; se contó, usando la técnica de barrido, aproximadamente 2000 células por unidad experimental.

#### **Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos fueron organizados mediante tablas y gráficos; y se utilizó análisis de varianza para determinar diferencias significativas el índice mitótico y micronúcleos de los tratamientos, luego se hizo uso de prueba de contrastación de Tukey. Se utilizará el software InfoStat versión libre actualizada el 18-07-2017 para Windows.

## **RESULTADOS**

Se encontró que a las 0 horas el porcentaje de índice mitótico aumentó conforme aumenta la concentración de *M. oleífera*, entre 0,05 y 0,5 g/L, pero que cuando se utiliza 1 g/L disminuye (Tabla 1), que las 48 horas de tratamiento hay un súbito aumento en el porcentaje cuando se emplea 0.05 a 1.0 g/L y disminuye, luego, a mayores concentraciones del vegetal (Tabla 2). Por el contrario, a las 72 horas de tratamiento el porcentaje disminuye de cuando se usa 0.05 a 1.0 g/L y luego vuelve a disminuir (Tabla 3).

Cuando se analizó el porcentaje de micronúcleos por cada 2000 células se encontró que conforme aumenta el tiempo de exposición de 0 a 48 y luego a 72 horas, el porcentaje aumenta (Tabla 4, Figs. 1 y 2).

**Tabla 1** Índices mitóticos y de fases mitóticas ( $\bar{X} \pm SD$ ) a las 0 horas de recuperación en raíces de *Allium cepa* L. var. roja arequipeña, tratadas con extracto acuoso de semillas de *Moringa oleífera* L. a diferentes concentraciones

TRATAMIENTOS	INDICE MITÓTICO (%)	FASE MITÓTICA (%)			
		Profase	Metafase	Anafase	Telofase
0 g/L	11.36 ± 0.44a	54.69 ± 5.93a	9.02 ± 2.29a	10.31 ± 0.77a	26.75 ± 6.59a
0.05 g/L	11.87 ± 0.62a	57.69 ± 9.46a	9.51 ± 2.61a	7.62 ± 2.38ab	25.18 ± 4.90a
0.1 g/L	11.90 ± 0.83a	59.08 ± 5.44a	10.06 ± 1.37a	8.54 ± 1.29ab	22.32 ± 4.73a
0.5 g/L	11.94 ± 0.31a	57.50 ± 1.64a	11.89 ± 0.43a	8.10 ± 2.72ab	22.51 ± 3.91a
1 g/L	10.77 ± 0.26a	59.33 ± 6.48a	8.67 ± 1.73a	4.47 ± 1.61b	27.53 ± 6.13a

Valores con letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 2** Índices mitóticos y de fases mitóticas ( $\bar{X} \pm SD$ ) a las 48 horas de recuperación en raíces de *Allium cepa* L. var. roja arequipeña, tratadas con extracto acuoso de semillas de *Moringa oleífera* L. a diferentes concentraciones

TRATAMIENTOS	INDICE MITÓTICO (%)	FASE MITÓTICA (%)			
		Profase	Metafase	Anafase	Telofase
0 g/L	13.00 ± 0.38a	59.01 ± 5.02a	10.26 ± 0.33a	6.98 ± 1.93a	23.75 ± 2.78a
0.05 g/L	11.13 ± 0.53b	57.89 ± 10.14a	11.23 ± 3.14a	6.84 ± 3.40a	24.03 ± 4.19a
0.1 g/L	10.98 ± 0.70b	59.57 ± 4.83a	12.63 ± 3.00a	5.84 ± 3.42a	21.96 ± 0.77a
0.5 g/L	11.39 ± 0.53b	56.83 ± 2.93a	12.49 ± 1.43a	6.78 ± 0.88a	23.89 ± 3.03a
1 g/L	11.28 ± 0.16b	50.65 ± 3.77a	14.38 ± 1.95a	9.18 ± 3.65a	25.78 ± 4.22a

Valores con letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 3** Índices mitóticos y de fases mitóticas ( $\bar{X} \pm SD$ ) a las 72 horas de recuperación en raíces de *Allium cepa* L. var. roja arequipeña, tratadas con extracto acuoso de semillas de *Moringa oleífera* L. a diferentes concentraciones

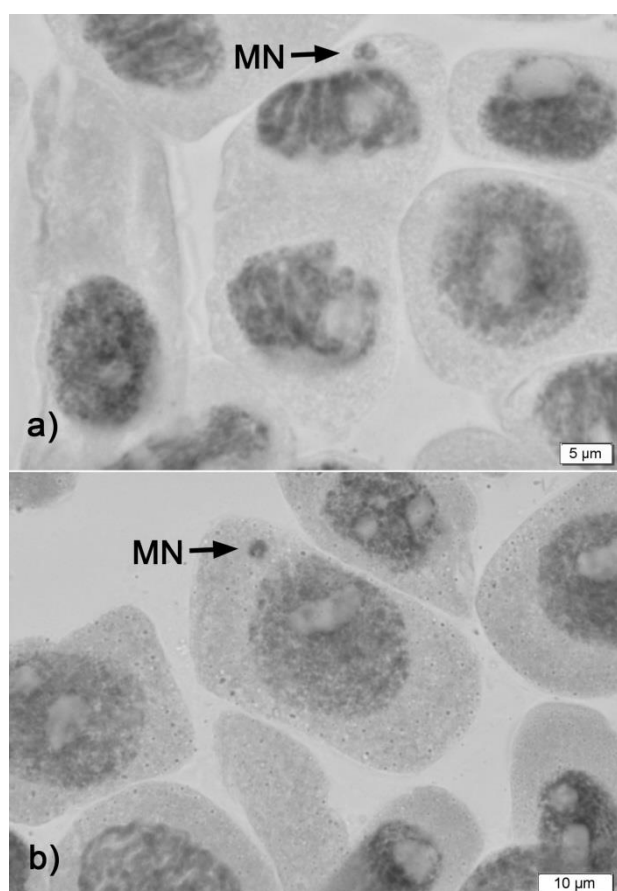
TRATAMIENTOS	INDICE MITÓTICO (%)	FASE MITÓTICA (%)			
		Profase	Metafase	Anafase	Telofase
0 g/L	14.12 ± 0.68a	52.97 ± 1.07a	12.01 ± 3.77a	8.38 ± 0.14a	27.86 ± 2.61a
0.05 g/L	10.76 ± 0.58b	54.28 ± 5.81a	11.33 ± 1.86a	7.02 ± 1.13a	27.37 ± 5.86a
0.1 g/L	10.52 ± 0.63b	53.73 ± 6.14a	12.67 ± 1.58a	7.25 ± 1.35a	26.36 ± 6.71a
0.5 g/L	10.67 ± 0.75b	54.22 ± 1.55a	11.41 ± 1.53a	10.12 ± 3.48a	24.25 ± 3.21a
1 g/L	12.00 ± 0.91b	60.81 ± 4.88a	9.79 ± 2.74a	8.10 ± 0.67a	21.30 ± 2.11a

Valores con letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 4.** Índice de células que presentaron micronúcleos ( $\bar{X} \pm SD$ ) encontrados en las raíces de *Allium cepa* L. var. roja arequipeña, tratada con extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera* L. a diferentes concentraciones

TRATAMIENTOS	Micronúcleos (% para 2000 células)		
	0h	48h	72h
0 g/L	0 ± 0a	0.00 ± 0a	0.33 ± 0.58 <sup>a</sup>
0.05 g/L	0.33 ± 0.58a	0.33 ± 0.58a	2.00 ± 1.00ab
0.1 g/L	0.67 ± 0.58a	0.67 ± 0.58a	2.67 ± 1.15ab
0.5 g/L	0.67 ± 0.58a	1.00 ± .100a	1.00 ± 0.00ab
1 g/L	0.67 ± 0.58a	0.67 ± 0.58a	2.33 ± 0.58ab

Valores con letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Fig. 1.** Células que presentan Micronúcleos (MN) a) célula en telofase que presenta micronúcleo y b) célula en interfase con micronúcleo. Microfotografías obtenidas con el Microscopio Olympus Trinocular BX41 a 1000A.

## DISCUSIÓN

El test *Allium* presenta un alto grado de sensibilidad a sustancias tóxicas<sup>39</sup>, se suele usar como parámetro el índice mitótico (IM) cuya variación significativa sirve como evidencia de daño o inhibición de la división celular<sup>40</sup>.

En el presente estudio se encontró que a las 48 y 72 (Tabla 2 y 3) horas hubo disminución estadísticamente significativa de los índices mitóticos de los tratamientos concordando con lo

afirmado por Malakahmad, et al. <sup>41</sup> indicando que la disminución del índice mitótico se debe a la presencia de una sustancia citotóxica que va a inhibir las actividades del ciclo celular.

Existen diferentes formas por las cuales se puede modificar el ciclo celular, por ejemplo cuando el daño ocurre en las proteínas que regulan estos procesos, lleva a la célula a seguir una vía apoptótica intrínseca o bloquear el pase de un etapa a otra<sup>42</sup>; pero también puede deberse a un daño directo en el ADN, el cual lleva a detener el ciclo celular en la fase G2 o después de la mitosis, en la fase G1<sup>43</sup>; es por ello que no se observó diferencias significativas del IM a la 0 horas del tiempo de recuperación (Tabla 1), pero en el tiempo, el IM se vio afectado mostrando diferencias significativas en relación con el tratamiento 0g/L. Estudios demuestran que las sustancias tóxicas pueden afectar el IM acelerando o disminuyendo el tiempo en que la célula demora en cada fase mitótica<sup>44</sup>, pero en el presente estudio no ocurrió este tipo de alteración y se puede observar en la Tabla 1, 2 y 3 que las frecuencias de las fases no presentan diferencias significativas.

Elsayed, et al. <sup>45</sup> reportaron que la semillas de *Moringa oleifera* contenían aceites esenciales que eran citotóxicos para varios tipos de líneas celulares cancerígenas; pero es Adebayo, et al. <sup>46</sup> quienes compararon la citotoxicidad del extracto acuoso de *M. oleifera* en una línea celular cancerígena MCF7 y en una línea celular normal de mama MCF 10A y llegaron a la conclusión que producía un mayor efecto antiproliferativo en células normales que en células cancerosas. La presencia de diferencias significativas en los IM encontrados a las 48 y 72 horas, nos asegura una acción citotóxica, pero la ligera variación encontrada podría corroborarse con lo indicado por Maiyo, et al.<sup>47</sup> que afirman que podría haber cierta selectividad de la sustancias de *M. oleifera* para inducir a apoptosis.

Los micronúcleos son fragmentos (Figura 1) anormales de cromosomas que se encuentran en el citoplasma, estos son productos de ruptura del ADN y se usa para evaluar el daño y la citotoxicidad del ADN<sup>48</sup>. En la presente investigación se encontró baja frecuencia de células con micronúcleos (Tabla 4) y no observándose diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo es necesario contrastar estos resultados utilizando el test cometa<sup>49</sup>.

El tiempo de exposición usado fue relativamente corto en comparación a estudios que se realizaron con ratones, mostraron citotoxicidad al exponerlos por un tiempo prolongado al extracto etanólico de semillas de “moringa”, donde concluyeron que esta sustancia podría causar daño necrosis en el hígado y reducción del pH del semen en los individuos machos, que podría llevar a una posible infertilidad <sup>50</sup>. Kim, et al. <sup>51</sup> también encontraron toxicidad al cebar por 14 días a ratas, con un extracto etanólico suplementado con un isotiocianato de *M.oleifera*, que ocasionó la muerte en su más alta dosis y en las dosis intermedias, necrosis en órganos reproductores y distensión gastrointestinal.

Aunque no se conoce cuál es el compuesto exacto que causa tales daños, se le podría atribuir a la presencia de dos tipos desconocidos de glucosinolatos o la presencia de isotiocianatos<sup>52</sup>, que pueden ocasionar diversas respuestas en los individuos y en ciertas ocasiones llegar a ocasionar daño genotóxico<sup>53</sup>.

Se recomienda hacer un estudio fitoquímico de las sustancias presentes en el extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* y a la vez estudiar la genotoxicidad de ellas mediante cariotipos para buscar mayores evidencias de aneuploidía y test cometa para observación de rupturas de ADN. En conclusión, las concentraciones del extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera* disminuye el índice mitótico a las 48 y 72 horas de recuperación con diferencias significativas con respecto a un tratamiento control (0 g/L) y sin diferencias significativas en las fases. No se observan diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de micronúcleos de los tratamientos utilizados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salaverry O, Cabrera J. Florística de algunas plantas medicinales. Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública, 2014; 31(1):165-168.
2. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013; 1830(6), 3670-3695. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008
3. Oblitas G, Hernández-Córdova G, Chiclla M, Antich-Barrientos M, Ccorihuamán-Cusitito L, Romani F. Empleo de plantas medicinales en usuarios de dos hospitales referenciales del Cusco, Perú. Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública, 2013; 30(1):64-68.
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2014-2023. China: Hong Kong SAR, 2013. Disponible en [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf)

5. Fretel A. *Moringa*, el árbol de la vida. 2014. Disponible en <http://diariocorreo.pe/ciudad/moringa-el-arbol-de-la-vida-551177/>
6. Bonal RR, Rivera ORM, Bolívar CME. *Moringa oleifera*: una opción saludable para el bienestar. MEDISAN, 2012; 16(10):1596-1599.
7. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan PK. Drumstick (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Indian Vegetable. Economic Botany, 1980; 34: 276-283. doi:10.1007/BF02858648
8. 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):12791-12835. doi: 10.3390/ijms160612791
9. Nweze NO, Nwafor FI. Phytochemical, proximate and mineral composition of leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. from Nsukka, South-Eastern Nigeria. IOSR J Pharmacy and Biol Sci. 2014; 9(1):99-103.
10. Sujatha BK, Patel P. *Moringa oleifera*–Nature’s Gold. Imperial J Interdisciplinary Res. 2017; 3(5):1175-1179.
11. Bhattachary A, Agrawal D, Sahu PK, Kumar S, Mishra SS, Patnaik S. Analgesic effect of ethanolic leaf extract of *Moringa oleifera* on albino mice. Indian J Pain, 2014; 28:89-94. doi: 10.4103/0970-5333.132846
12. Minaiyan M, Asghari G, Taheri D, Saeidi M, NasrEsfahani S. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. AJP, 2014; 4(2):18-24.
13. Al-Malkil AL, El Rabey HA. The Antidiabetic Effect of Low Doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on Streptozotocin Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Male Rats. BioMed Res Internat. 2015:1-13. doi: 10.1155/2015/381040
14. Ofem OE, Ikip EE, Archibong AN, Chukwu JA. *Moringa oleifera* Lam extract attenuates gastric ulcerations in high salt loaded rats. European Journal of Biological Research, 2017; 7(1):59-67. doi: 10.5281/zenodo.290641
15. Osameyan TA. Comparative evaluation of the hypotensive effects of the seed and leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) in laboratory animals. [Tesis Doctoral] Ahmadu Bello University, Zaria, Nigueria, 2015.
16. Charoensin S. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. J Medicinal Plants Res. 2014; 8(7):318-325. doi: 10.5897/JMPR2013.5353
17. Jaramillo CJ, Espinoza AJ, D’Armas H, Troccoli L, de Astudillo LR. Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. Rev Biol Trop. 2016; 64(3):1171-1184.
18. Soria N, Ramos P. Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. Mem Inst Investig Ciencias de la Salud, 2015; 13(2):08-17. doi: 10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013(02)08-017
19. Canett-Romero R, Arvayo-Mata KL, Ruvalcaba-Garfias NV. Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleifera* y sus posibles daños. Biotecnia, 2014; 16(2):36-43.
20. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Azeez IO, Abiola JO, Adedokun RA, Nottidge HO. Toxicological evaluations of methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves in liver and kidney of male Wistar rats. J Basic and Clin Physiol and Pharmacol, 2013; 24(4):307-312. doi: 10.1515/jbcpp-2012-0061
21. Ajibade TO, Arowolo R, Olayemi FO. Phytochemical screening and toxicity studies on the methanol extract of the seeds of *Moringa oleifera*. J Complementary and Integrative Medicine, 2013; 10(1): 11-16. doi: 10.1515/jcim-2012-0015
22. Asare GA, Gyan B, Bugyei K, Adjei S, Mahama R, Addo P. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. J Ethnopharmacol, 2012; 139(1):265-272. doi: 10.1016/j.jep. 2011.11.009
23. Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW, Collins N, Haining WN, et al. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. J Exp Med. 2017; jem-20160801. doi: 10.1084/jem.20160801
24. Matsuyama R, Kitamoto S, Tomigahara Y. Lack of genotoxic potential of permethrin in mice evaluated by the comet assay and micronucleus test. Toxicological & Environmental Chemistry, 2018; 100(1), 92-102. doi: 10.1080/02772248.2017.1401627
25. Yan C, Yang F, Wang Z, Wang Q, Seitz F, Luo Z. Changes in arsenate bioaccumulation, subcellular distribution, depuration, and toxicity in *Artemia salina nauplii* in the presence of titanium dioxide nanoparticles. Environm Sci: Nano, 2017; 4(6), 1365-1376. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.03.009
26. Ng C T, Yong LQ, Hande MP, Ong CN, Yu LE, Bay BH, Baeg GH. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. Intern J Nanomedicine, 2017; 12:1621-1637. doi: 10.2147/IJN.S124403
27. Khan AH, Libby M, Winnick D, Palmer J, Sumarah M, Ray MB, Macfie S. M. Uptake and phytotoxic effect of benzalkonium chlorides in *Lepidium sativum* and *Lactuca sativa*. J Environm Management, 2018; 206:490-497. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.10.077

28. Hu Y, Tan L, Zhang SH, Zuo YT, Han X, Liu N, et al. Detection of genotoxic effects of drinking water disinfection by-products using *Vicia faba* bioassay. *Environm Sci and Pollution Res*, 2017; 24(2):1509-1517. doi: 10.1007/s11356-016-7873-9
29. Datta S, Singh J, Singh J, Singh S, Singh S. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environ Res*, 2018. doi: 10.1016/j.serj.2018.01.005
30. Levan A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 1938 24(9):471-486. doi: 10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x
31. Fatma F, Verma S, Kamal A, Srivastava A. Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. *Physiol and Mol Biol of Plants*, 2018; 24(1):115-123. doi: 10.1007/s12298-017-0490-3
32. Rahman MM, Rahman MF, Nasirujjaman K. A study on genotoxicity of textile dyeing industry effluents from Rajshahi, Bangladesh, by the *Allium cepa* test. *Chem and Ecol*, 2017; 33(5):434-446. doi: 10.1080/02757540.2017.1316491
33. Ciappina AL, Ferreira FA, Pereira IR, Sousa TR, Matos FS, Reis PRM, et al. Toxicity of *Jatropha curcas* L. latex in *Allium cepa* test. *Bioscience J*, 2017; 33(5):1295-1304. doi: 10.14393/BJ-v33n5a2017-33835
34. Grant WF. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999; 426(2):107-112. doi: 10.1016/S0027-5107(99)00050-0
35. Ndabigengesere A, Narasiah KS, Talbot BG. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Res*, 1995; 29(2):703-710. doi: 10.1016/0043-1354(94)00161-Y
36. Mustafa Y, Suna AE. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*, 2008; 61(1):45-52. doi: 10.1080/00087114.2008.10589608
37. Tjio JH, Levan A. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anal. Estac. Expl. Aula Dei.*, 1950; 2:21-64. Disponible en <https://digital.csic.es/handle/10261/33645>
38. Berrocal AM, Blas RH, Flores J, Siles MA. Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2013; 15(1):17-27
39. Ragazzo P, Feretti D, Monarca S, Dominici L, Ceretti E, Viola G, et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. *Water research*, 2017; 116:44-52. doi: 10.1016/j.watres.2017.03.016
40. Kumar G, Pandey A. Ethyl methane sulphonate induced changes in cyto-morphological and biochemical aspects of *Coriandrum sativum* L. *J of the Saudi Society of Agricultural Sci*, 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658077X17303673>
41. Malakahmad A, Manan TSBA, Sivapalan S, Khan T. Genotoxicity assessment of raw and treated water samples using *Allium cepa* assay: evidence from Perak River, Malaysia. *Environ Sci and Pollution Res*, 2017; 25(6):421-5436. doi: 10.1007/s11356-017-0721-8
42. Bortolotto LFB, Barbosa FR, Silva G, Bitencourt TA, Belebony RO, Baek SJ, et al. Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomed & Pharmacother*, 2016; 85:425-433. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.047
43. Barr AR, Cooper S, Heldt FS, Butera F, Stoy H, Mansfeld J, et al. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nature communications*, 2017; 8: 14728. doi: 10.1038/ncomms14728
44. Hannah C, Priya EJS, Mammen A. Duration dependent mutagenic study of Cola drinks on *Allium cepa* L. *Biosciences Biotech Res Asia*, 2010; 7(2):807-812.
45. Elsayed EA, Sharaf-Eldin MA, Wadaan M. In vitro evaluation of cytotoxic activities of essential oil from *Moringa oleifera* seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines. *Asian Pacific J Cancer Prevention*, 2015; 16(11):4671-4675. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.11.4671
46. Adebayo IA, Arsad H, Samian MR. Antiproliferative effect on breast cancer (Mcf7) of *Moringa oleifera* seed extracts. *African J Traditional, Complementary, and Alternative Med*, 2017; 14(2):282 -287. doi: 10.21010/ajtcam.v14i2.30
47. Maiyo FC, Moodley R, Singh M. Cytotoxicity, antioxidant and apoptosis studies of quercetin-3-O glucoside and 4-(β-D-glucopyranosyl-1→ 4-α-L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2016; 16(5):648-656. doi: 10.2174/1871520615666151002110424
48. Alimba CG, Aladeyelu AM, Nwabisi IA, Bakare AA. Micronucleus cytome assay in the differential assessment of cytotoxicity and genotoxicity of cadmium and lead in *Amietophrynus regularis*. *EXCLI Journal*, 2018; 17: 89-101. doi: 10.17179/excli2017-887



49. Kasamoto S, Masumori S, Tanaka J, Ueda M, Fukumuro M, Nagai M, et al. Reference control data obtained from an in vivo comet-micronucleus combination assay using Sprague Dawley rats. *Exp and Toxicol Pathol*, 2017; 69(4):187-191. doi: 10.1016/j.etp.2017.01.002
50. Njan AA, Atolani O, Olorundare OE, Afolabi SO, Ejimkonye BC, Crucifix PG, et al. Chronic toxicological evaluation and reversibility studies of *Moringa oleifera* ethanolic seed extract in Wistar rats. *Trop J Health Sci*, 2018; 25(1). Disponible en <https://www.ajol.info/index.php/tjhc/article/view/166445>
51. Kim Y, Jaja-Chimedza A, Merrill D, Mendes O, Raskin I. A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from *Moringa oleifera* Lam. seeds in rats. *Toxicol Reports*, 2018; 5:418-426. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.02.012
52. Fahey JW, Olson ME, Stephenson KK, Wade KL, Chodur GM, Odee D, et al. The Diversity of Chemoprotective Glucosinolates in Moringaceae (*Moringa* spp.). *Scientific reports*, 2018; 8(1):7994. doi: 10.1038/s41598-018-26058-4
53. Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi JI, Nakamura Y, et al. Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol*, 2017; 37(4):485-494. doi: 10.1002/jat.3384

Correspondencia: <a href="mailto:cquijano@unitru.edu.pe">cquijano@unitru.edu.pe</a>
---