



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE
MORINGA SOB PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN*
*VITRO***

INESSA STEFFANY TORRES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Área de
Concentração: Produção Animal,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Dourados - MS
Dezembro de 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE
MORINGA SOB PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN*
*VITRO***

INESSA STEFFANY TORRES DE OLIVEIRA
Bióloga

Orientador: Prof^o Dr. Fernando Miranda de Vargas Junior

Coorientadora: Prof^a Dra. Tatiane Fernandes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Área de
Concentração: Produção Animal,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Dourados - MS
Dezembro de 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O48e Oliveira, Inessa Steffany Torres De

Extratos aquosos de folhas secas e frescas de moringa sob parâmetros de fermentação ruminal in vitro [recurso eletrônico] / Inessa Steffany Torres De Oliveira. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Fernando Miranda de Vargas Junior .

Coorientador: Tatiane Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

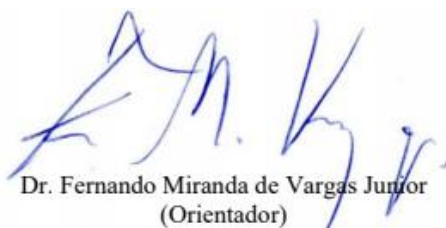
1. aditivo. 2. animal. 3. metabólicos. 4. Moringaceae. I. Vargas Junior, Fernando Miranda De .
II. Fernandes, Tatiane. III. Título.

**EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE MORINGA SOB
PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO***

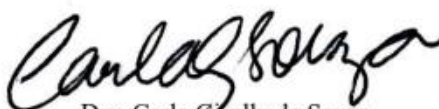
INESSA STEFFANY TORRES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ZOOTECNIA

Aprovado em: 17/12/2020



Dr. Fernando Miranda de Vargas Junior
(Orientador)
Programa de Pós-graduação em Zootecnia
Universidade Federal da Grande Dourados



Dra. Carla Giselly de Souza
Membro Titular
Pós-Doutoranda Universidade Federal da Grande Dourados



Dra. Marciana Retore
Membro Externo Titular
Pesquisadora EMBRAPA Agropecuária Oeste

DEDICATÓRIA

A minha família, pelos conselhos, ajuda e apoio

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A minha família, pela motivação e acreditarem em mim quando nem eu acreditei.

Ao meu orientador Professor Dr. Fernando Miranda de Vargas Junior, por conceder a oportunidade de aprendizado em sua área de atuação, conselhos e apoio no que precisei.

A minha coorientadora doutora Tatiane Fernandes pelo carinho, paciência, ensinamentos, e concretização do experimento.

Aos funcionários da UFGD, entre terceirizados e técnicos de laboratório, pela ajuda nas dúvidas das análises laboratoriais, especialmente a técnica Adriana pela motivação.

Aos colegas de mestrado e do grupo de Ovinotecnia pela ajuda nas análises de laboratório e disciplinas.

Aos professores do Programa de Mestrado em Zootecnia, pela oportunidade de aprendizado tanto da vida profissional quanto pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que ajudaram diretamente ou indiretamente durante o mestrado.

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract.....	9
Considerações iniciais.....	10
CAPÍTULO I - Moringa (<i>Moringa oleifera</i>) como aditivo vegetal modulador da fermentação ruminal.....	1
Introdução.....	3
A espécie <i>Moringa.oleifera</i>	4
Moringa como suplemento.....	5
Os compostos metabólicos - fitoquímicos.....	6
Compostos presentes na moringa e ações em ruminantes.....	7
Compostos fenólicos.....	7
Flavonoides.....	7
Terpenoides.....	8
Saponinas.....	9
Taninos.....	10
Alcaloides.....	12
Extratos aquosos.....	14
Experimentos <i>in vitro</i>	17
Estudos sobre a fermentação ruminal.....	19
Considerações finais.....	23
Referências bibliográficas.....	24
CAPÍTULO II -. Avaliação de extratos aquosos da folha de <i>Moringa oleifera</i> na fermentação ruminal <i>in vitro</i>.....	27
Introdução.....	32
Materiais e métodos.....	33
Extratos.	33
Coleta moringa.....	34
Extrato aquoso.....	35
Análises qualitativas.....	36
Análises quantitativas.....	36
Experimento <i>in vitro</i>	36
Incubação.....	37
Ácidos graxos.....	37
Resultados.....	39
Compostos bioativos e antioxidantes dos extratos	39
Incubação <i>in vitro</i>	40
Ácidos graxos.....	49
Discussão.....	51
Conclusão.....	55
Referências bibliográficas	55
Considerações finais.....	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Experimentos com extratos aquosos da folha de *Moringa oleifera* em ruminantes.....16

CAPÍTULO II

Tabela 1. Análise da composição do substrato (feno de alfafa) utilizado para fermentação *in vitro*.....42

Tabela 2. Compostos bioativos e atividade antioxidante nos extratos em função do método de extração.....53

Tabela 3. Ácidos graxos voláteis com 24 h de incubação.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Radicais azino-bis (ácido etil-benzotiazolina-6-sulfonico)

AGI- Ácidos graxos insaturados

AGS – Ácidos graxos saturados

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados

AGV – Ácidos graxos voláteis

Aw – Atividade de água

CC – Concentrado comercial

CLA - Isômeros do ácido linoleico

CH₄ – Metano

CO₂- Gás carbônico

CT – Carboidratos totais

DPPH- Radical 1,1-difenil-1-picril-hidrazil

DF – Extrato obtido pela decocção da folha fresca

DS- Extrato obtido pela decocção da folha seca

DP – Desvio padrão

EPM – Erro padrão da média

EST – Extrato seco total

FDA – Fibra em detergente ácido

FDAi – Fibra em detergente ácido indigestível

FDN – Fibra em detergente neutro

GO – Grão de oleaginosa

GP – Gordura protegida

IF- Extrato obtido pela infusão da folha fresca

IS – Extrato obtido pela infusão da folha seca

MF - Extrato obtido pela maceração da folha fresca

MM – Matéria mineral

MO – Matéria orgânica

MS - Matéria seca

N – Número

ND – Não detectável

NDT – Nutrientes digestíveis totais

PB – Proteína bruta

PC – Peso corporal

PNP - Produtos naturais de plantas

ST – Sólidos totais

TNT – Tecido não

RESUMO

OLIVEIRA; I.; S., T. de Extratos aquosos de folhas secas e frescas de moringa sob parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*. 2021. 72p. Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Faculdade de Ciências Agrárias – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2021.

Os objetivos dessa dissertação foram I) abordar sobre a utilização da *Moringa oleifera* como aditivo modulador da fermentação ruminal, os principais compostos presentes na planta e seus possíveis efeitos na produção animal (Capítulo I); II) avaliar o efeito das extrações aquosas por maceração, decocção e infusão de folhas frescas ou secas de *Moringa oleifera* na digestibilidade *in vitro* e parâmetros fermentativos ruminais, bem como analisar a composição fitoquímica dos extratos de moringa (Capítulo II). Capítulo I: a literatura demonstra resultados promissores para que os compostos bioativos da moringa possam ser utilizados como aditivo vegetal na alimentação de ruminantes. Estes compostos, em determinadas concentrações, alteram as populações de microrganismos ruminais e melhoraram parâmetros fermentativos como degradabilidade, digestibilidade, ácidos graxos, produção de gases, nitrogênio amoniacal. Capítulo II: para o estudo foram pesados 5 g de substrato (feno de alfafa) em cada erlenmeyer de 125 mL, aos quais foram adicionados 10 mL de fluido ruminal e 40 mL de solução tampão mineral. Os tratamentos foram: controle, extrato obtido por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decocção da folha fresca (DF) e seca (DS); e infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), totalizando 7 tratamentos, com 3 repetições. Nos erlenmeyers foi adicionado 0,4 mL de extratos referente a cada tratamento, com exceção dos correspondentes aos controles. Os erlenmeyers foram saturados com CO₂, selados, e colocados em uma incubadora a 39 °C, durante 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas dos compostos bioativos presentes nos extratos das folhas de moringa. As folhas frescas apresentaram teores mais elevados de saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides (P<0,05). Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante. Os extratos de moringa não influenciaram na digestibilidade da matéria seca *in vitro*, da fibra em detergente neutro, na concentração de amônia ruminal, na população de protozoários, no pH e nos ácidos graxos (P>0,05). A extração dos compostos bioativos foi mais eficiente utilizando folhas frescas de *M. oleifera*, e somente os teores de flavonoides foram afetados pelos métodos de extração aquosa. Em relação à incubação, os parâmetros fermentativos não foram afetados pelos extratos.

Palavras-chave: aditivo, animal, metabólicos, Moringaceae.

ABSTRACT

OLIVEIRA; I.; S., T. de Aqueous extracts of dry and fresh moringa leaves under *in vitro* ruminal fermentation parameters. 2021. 72p. Dissertação - Mestrado em Zootecnia - Faculdade de Ciências Agrárias – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2021.

The objectives of this dissertation were: I) addressing the use of *Moringa oleifera* as a modulating additive for ruminal fermentation, the main compounds present in the plant and their possible effects on animal production (Chapter I); II) to evaluate the effect of aqueous extractions by maceration, decoction and infusion of fresh or dried leaves of *Moringa oleifera* on *in vitro* digestibility and ruminal fermentative parameters, as well as to analyze the phytochemical composition of the extracts of moringa (Chapter II). Chapter I: the literature shows promising results so that the bioactive compounds of moringa can be used as a vegetable additive in the feeding of ruminants. These compounds, in certain concentrations, alter the populations of ruminal microorganisms and improve fermentative parameters such as degradability, digestibility, fatty acids, gas production, ammoniacal nitrogen. Chapter II: for the study, 5 g of substrate (alfalfa hay) was weighed in each 125 ml conical flask, to which 10 ml of ruminal fluid and 40 ml of mineral buffer solution were added. The treatments were: control, extract obtained by maceration of fresh leaf (MF) and dry (MS); decoction of fresh (DF) and dry (DS) leaves; and infusion of fresh (IF) and dry (IS) leaves, totaling 7 treatments, with 3 repetitions. Erlenmeyers were added 0.4 mL of extracts for each treatment, with the exception of those corresponding to controls. The elermeyers were saturated with CO₂, sealed, and placed in an incubator at 39 ° C for 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Qualitative and quantitative analyzes of the bioactive compounds present in the extracts of the moringa leaves were carried out. Fresh leaves showed higher levels of saponins, flavonoids, tannins and alkaloids (P <0.05). All extracts showed antioxidant activity. Moringa extracts did not influence the *in vitro* dry matter digestibility, neutral detergent fiber, rumen ammonia concentration, protozoa population, pH and fatty acids (P > 0.05). The extraction of bioactive compounds was more efficient using fresh leaves of *M. oleifera*, and only the levels of flavonoids were affected by aqueous extraction methods. Regarding the incubation, the fermentative parameters were not affected by the extracts.

Keywords: additive, animal, metabolic, Moringaceae

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os compostos bioativos presentes nas plantas podem ser utilizados como aditivos modulares de fermentação ruminal. A *Moringa oleifera* tem se destacado como aditivo para a produção animal, por conta tanto de suas propriedades nutricionais como medicinais. As propriedades medicinais da moringa são decorrentes da presença dos compostos, como compostos fenólicos, alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, saponinas, entre outros.

Por conta dos compostos bioativos a moringa possui potencial de aumentar a digestibilidade dos nutrientes e melhorar a fermentação ruminal podendo afetar positivamente inclusive no desempenho animal, com a melhora na composição e produção de leite, e/ou ganho de peso. No entanto deve ser considerado a forma de fornecimento da moringa para ruminantes, entre esses o extrato aquoso. A utilização do extrato possibilita utilizar melhor as atividades biológicas e potencializar o efeito de compostos ativos.

Dessa forma, as hipóteses analisadas neste estudo foram: a) que os métodos de extração assim como a utilização de folhas frescas ou secas influenciam na composição fitoquímica dos extratos aquosos; b) a adição dos extratos de moringa afeta os parâmetros fermentativos *in vitro*.

O objetivo desta pesquisa foi analisar a presença e quantificar os compostos bioativos presentes em cada extrato proveniente dos métodos de extração maceração, infusão e decocção de folhas de moringa de extração aquosa, a utilização de folhas frescas e secas de *M. oleifera* e avaliar os extratos sobre determinados parâmetros fermentativos *in vitro*.

Para a realização desta dissertação a pesquisa foi dividida em dois capítulos. No capítulo I para ser publicado como capítulo de livro a pesquisa foi realizada no formato de revisão de literatura, sobre assuntos que darão fundamentação ao artigo do Capítulo II, onde foi estudado os compostos bioativos da moringa e os principais resultados em ruminantes O Capítulo II foi abordado a parte experimental para publicação em periódico científico.

CAPÍTULO I

MORINGA (*Moringa oleifera*) COMO ADITIVO VEGETAL MODULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi abordar sobre a utilização da *Moringa oleifera* como aditivo modulador da fermentação ruminal, os principais compostos presentes na planta e seus possíveis efeitos na produção animal. Os compostos bioativos presentes na moringa possuem grande potencial como aditivo vegetal na alimentação de ruminantes, devido, principalmente, pela presença de compostos metabólicos atóxicos que, quando utilizados em baixas e moderadas concentrações, na maioria das vezes, são capazes de atuar como modificadores da fermentação ruminal. As alterações em populações de microrganismos ruminais melhoram alguns parâmetros fermentativos como degradabilidade, digestibilidade, ácidos graxos, produção de gases, nitrogênio amoniacal, podendo ocasionar melhoras significativas no desempenho animal. Neste sentido, é fundamental verificar quais os compostos ativos estão presentes na moringa, as concentrações benéficas destes e sua quantificação nas diferentes formas de inclusão da moringa, por exemplo nos extratos, para a padronização de sua aplicabilidade favorável à produção animal. Dentre os compostos descritos na moringa que afetam os microrganismos ruminais destacam-se os flavonoides, terpenoides, saponinas, taninos e alcaloides. De modo geral, todos os tecidos da moringa têm demonstrado grande potencial como aditivo para ruminantes. É necessário ressaltar que determinados fatores influenciam na presença dos compostos bioativos e sua atividade também pode ser afetada pela dieta e pelos animais. Apesar da identificação dos compostos bioativos da *M. oleifera*, já ser conhecida é importante o desenvolvimento de mais pesquisas específicas sobre o modo de ação de cada composto da planta e seus efeitos no rúmen, visto que alguns podem ainda estar melhorando a saúde animal, devido às atividades medicinais.

Palavras-chave: Compostos bioativos, ruminantes, extratos.

ABSTRACT

The objective of this work was to address the use of *Moringa oleifera* as a modulating additive of ruminal fermentation, as well as the main compounds present in the plant and their possible effects on activity in animal production. The compounds present in moringa have great potential as a plant additive in ruminants, mainly because of the presence of non-toxic metabolic compounds and when used in low and moderate concentrations are most often able to act as ruminal fermentation modifiers. Changes in populations of ruminal microorganisms improve some fermentative parameters such as degradability, digestibility, fatty acids, gas production, ammonia nitrogen and may cause significant improvements in animal performance. In this sense it is essential to verify which active compounds and their beneficial concentrations, and their quantification in the different forms of inclusion of moringa, for example in the extracts, for the standardization of its favorable applicability to animal production. Among the compounds described in the moringa that affect ruminal microorganisms are flavonoids, terpenoids, saponins, tannins and alkaloids. In general all moringa tissues have shown great potential as an additive for ruminants. It should be noted that certain factors influence the presence of bioactive compounds, and their activity may also be affected by diet and experimental animals. Despite the identification of bioactive compounds of *M. oleifera*, it is interesting to conduct further specific research on the mode of action of each plant compound and its effects on the rumen, as some may still be improving animal health due to activities medicinal.

Keywords: Bioactive compounds, ruminants, extracts.

INTRODUÇÃO

Considerando a preocupação do consumidor com os resíduos de antibióticos nos produtos de origem animal (Matloup et al., 2017), várias pesquisas têm buscado alternativas para a substituição ou diminuição destes medicamentos, visando obter o produto final livre de resíduos que possam ser tóxicos (Flores et al., 2013; Kholif et al., 2018). Uma destas alternativas é a utilização de compostos bioativos de plantas, como extratos vegetais (Flores et al., 2013).

Dentre as plantas com potencial para serem utilizadas na produção animal destaca-se a *Moringa oleifera*. A moringa possui enorme potencial medicinal, derivado da presença de metabólitos secundários, como ácidos fenólicos, alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, saponinas, cumarinas, quinonas glicosinolatos e isotiocianatos e resinas (Anway et al., 2007; Brunelli et al., 2010). Geralmente, os efeitos desses compostos ocorrem diretamente nas populações de protozoários, fungos e bactérias, os quais alteram a formação de produtos finais da fermentação, tais como amônia e ácidos graxos voláteis (AGV) em ruminantes (Bodas et al., 2012), que podem ser benéficas aos animais.

Os compostos bioativos da moringa podem oferecer soluções para o problema de bactérias resistentes a antibióticos (Wang et al., 2016). Tais metabólitos secundários, ou compostos bioativos, fazem parte de um amplo grupo de compostos biológicos presentes nas plantas e conferem distintos potenciais bioquímicos necessários para a sobrevivência das plantas (Patra; Saxena, 2010).

Desta forma, os compostos bioativos da moringa possuem potencial de aumentar a digestibilidade dos nutrientes e melhorar a fermentação ruminal (Soltan et al., 2018), podendo influenciar positivamente no desempenho animal (Ugbogu et al., 2019). De acordo com Bodas et al. (2012), as atividades antimicrobianas dos compostos bioativos são diferentes entre os compostos, ainda que em sua concentração inibitória mínima para os microrganismos ruminais, e na sensibilidade à ação fitoquímica entre as espécies microbianas. Assim, é preciso considerar quais compostos afetam a fermentação ruminal e sua dosagem ideal para animais ruminantes.

Enfatiza-se que a bioatividade dos metabólitos presentes nas plantas pode ser influenciada por diversos fatores, seja a localização geográfica, condição climática, o tempo/período de coleta, e até o método usado para processá-los ou armazená-los (Bodas et al., 2008). Portanto, é importante estudar as diferenças na composição dos compostos presentes em cada parte morfológica da moringa, de acordo com seu fornecimento ao animal, como os extratos e seus efeitos.

O potencial dos extratos de plantas no melhoramento do valor nutritivo dos alimentos para ruminantes é dependente da dosagem, e suas implicações devem-se à presença de metabólitos (Benchaar et al., 2008; Cedillo et al., 2014; Elghandour et al., 2018). Por isso, vários estudos são realizados quanto aos efeitos dos extratos de moringa sob parâmetros de fermentação ruminal. Principalmente sobressaindo os experimentos *in vitro* pela sua simplicidade, rapidez (Meale et al., 2011), repetibilidade, redução do número de animais e economia (Getachew et al., 2005; Aderinboye et al., 2016).

Portanto, é importante enfatizar que a utilização de extratos aquosos de moringa em animais não é considerada tóxica (Awodele et al., 2012) e não deixa resíduos nos produtos, como os antibióticos. Vários estudos comprovaram os efeitos positivos da inclusão do extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* na fermentação ruminal *in vitro* e na produção de gases (Soliva et al., 2005; Elghandour et al., 2018; Parra-Garcia et al., 2019; Pedraza-Hernández et al., 2019); ou extrato metanólico de folhas (Akanmu; Hassen; 2018; Faniy et al., 2019), sementes (Alexander et al., 2008), adição na ração como farinha, silagem, frescas ou secas (Soliva et al., 2005; Dey et al., 2014; Aderinboye et al., 2016; Elghandour et al., 2017). A moringa ainda pode melhorar o desempenho animal, com aumento da composição e produção de leite (Sarwatt et al., 2004; Khalel et al. 2014; Kholif et al., 2015; 2016, 2017).

Considerando os benefícios da moringa para ruminantes, em virtude dos compostos bioativos presentes na planta, é essencial obter mais informações quanto a esses compostos que possivelmente melhoram a fermentação ruminal. Diante do exposto, esta revisão objetiva abordar sobre a utilização da *Moringa oleifera* como aditivo modulador da fermentação ruminal, os principais compostos presentes na planta e seus possíveis efeitos no desempenho animal.

A espécie *Moringa oleifera*

A moringa é uma planta pertencente à família monogenérica Moringaceae, com origem em regiões Himalaia, e que pode alcançar até 12 m quando adulta (Leoni et al. 2015; Pollini et al., 2020). O cultivo da *M. oleifera* em vários países tropicais e subtropicais é bem estabelecido devido a suas características adaptáveis e resilientes, tais como, crescimento rápido, resistência em diversas condições climáticas e longevidade. Essa espécie possui distintos nomes tradicionais, que dependem da sua localização e utilidade, as quais incluem árvore de superalimento, coqueluche, árvore milagrosa, árvore da vida, rábano, árvore benzoil ou moringa (Falowo et al., 2018).

A planta produz elevada quantidade de biomassa, que varia entre 43 e 115 t/ha anualmente (Kholif et al., 2016), dependendo da variedade, tipo de solo, sistema de irrigação, fertilização e clima (Su; Chen, 2020). Já o rendimento de folhas frescas da espécie, cultivadas com espaçamento de 1 m × 1 m, é cerca de 1 a 5 kg/árvore no ano, equivalente à produção de 10.000 a 50.000 kg/ha anualmente (Sánchez et al., 2006).

Em muitos países, a planta é usada como alimento e produtos alimentares para humanos, por conta da sua composição nutricional, antioxidante e benefícios fitoquímicos. Dentre esses, destacam-se os antioxidantes naturais, tais como a vitamina C, carotenoides, tocoferóis, flavonoides e outros compostos fenólicos (Falowo et al., 2018), além de polifenóis e polissacarídeos (Shi et al., 2019).

As principais propriedades estudadas na moringa são os antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas, neuroprotetoras, cardioprotetoras e anti-inflamatórias. Por isso, a moringa é utilizada tradicionalmente para tratar diversas doenças, enfatizando sua ação contra a bronquite, infecções e febre. Em geral, essa planta é conhecida por modular o sistema imunológico (Madi et al., 2016). Este potencial medicinal da moringa também pode resultar em benefícios para os animais, levando ao aumento no desempenho.

Considerando seu amplo espectro antimicrobiano, baixa toxicidade como alimento e alta produção, devido ao rápido crescimento, a *Moringa oleifera* pode ser efetivamente utilizada na descoberta de novos agentes antimicrobianos. A planta é utilizada em tratamentos medicinais para controlar infecções por microrganismos (Wang et al., 2016).

Na agricultura, a moringa pode melhorar o controle de fungos fitopatogênicos que causam doenças e afetam a produção de culturas econômicas. Na aquicultura marinha, a utilização da moringa também mostra futuro promissor no controle de doenças infecciosas (Wang et al., 2016). Nos ruminantes pode atuar no controle de bactérias e fungos patógenos. No entanto, são necessários mais estudos neste campo sobre a moringa.

Moringa como suplemento

De acordo com Sun et al. (2017), a moringa é considerada adequada como suplemento alimentar animal, pois suas folhas são altamente nutritivas, apresentando excelente palatabilidade, digestibilidade e elevada composição de proteínas e minerais. Na moringa, o baixo teor de fibra bruta de suas folhas, que corresponde a cerca de 5,9% da matéria seca (Wu et al., 2013) justifica a boa palatabilidade para os animais. Além desses fatores, o interesse para ser utilizada como alimento deve-se ao baixo conteúdo de antinutrientes, (Su; Chen, 2020) como os compostos metabólicos.

Quanto aos lipídios, a moringa contém 7,09% (Teixeira et al., 2014), um valor alto comparado a outras espécies de forragens lenhosas. Em uma folha de *M. oleífera* grande parte, cerca de - 57% - dos ácidos graxos totais representam os ácidos graxos insaturados, sobressaindo em conteúdo - 44,57% - o ácido α -linolênico (Moyo et al., 2011). Os ácidos graxos insaturados são importantes na dieta humana pois podem decompor e esterificar o colesterol, estabilizar o nível de colesterol e, conseqüentemente, diminuir o risco de aterosclerose e outras doenças cerebrovasculares (Su; Chen, 2020).

A *M. oleífera* também se destaca como fonte de proteína para a nutrição de ruminantes, apresentando, em média, 28,7% de proteína nas folhas, além de ter em sua composição outros compostos como carotenoides (β -caroteno e luteína), vitaminas (A, B, C e E), minerais e vários compostos fenólicos, tais como alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides e saponinas (Anwar et al., 2007; Brunelli et al., 2010; Moyo et al., 2012, Teixeira et al., 2017).

Em relação ao conteúdo nutricional, nas folhas de *M. oleífera* foram descritas 3.378 proteínas, contendo especialmente proteínas com atividade hidrolítica e oxirredutase, as quais estão associadas ao metabolismo de carboidratos e proteínas (Shi et al., 2019). Essas características tornam a planta famosa tanto por suas propriedades nutricionais quanto medicinais (Anwar et al., 2007; Khalafalla et al., 2010; Leone et al., 2015). As características nutricionais da planta são importantes para a nutrição animal, pois aumentam a quantidade de nutrientes ingeridos, como aditivos suplementares, e podem proporcionar benefícios no desempenho.

Os compostos metabólicos – fitoquímicos

A moringa como diversas outras plantas vem sendo estudadas como potenciais aditivos para animais, proporcionando crescimento de produtos naturais nessa área. De acordo com Bodas et al. (2012), os produtos naturais de plantas (PNP) são metabólitos vegetais não nutritivos, os quais exercem funções vitais na planta, como proteção contra organismos herbívoros, patógenos, microrganismos e insetos.

As substâncias químicas produzidas pelas plantas, por meio do metabolismo primário ou secundário, são denominadas de fitoquímicos (Samanta et al., 2017; Lin et al., 2018). A espécie *M. oleífera* é composta por vários desses compostos metabólicos, que são considerados benéficos para a nutrição animal.

Os metabólitos referem-se a um amplo grupo de compostos biológicos que são residentes em plantas e atribui diversos potenciais bioquímicos essenciais para a

sobrevivência das plantas (Patra; Saxena, 2010). Quanto a função destes compostos destaca-se a proteção contra ameaças temporárias ou contínuas, além do crescimento e reprodução das plantas (Patra; Saxena, 2010; Bodas et al, 2012; Samanta et al., 2017).

Entre os compostos estudados sobressaem as saponinas, taninos, terpenoides, flavonoides, glicosídeos, alcaloides, fenóis e óleos essenciais. Entretanto, a bioatividade desses compostos é influenciada, em grande parte, pela localização geográfica, juntamente com fatores climáticos, o tempo/período de coleta, o método usado no processamento ou armazenamento (Bodas et al., 2008) e outros.

Os compostos secundários já estão presentes na dieta de animais que pastejam há muito tempo, e exercem funções significativas como agentes antibacterianos, antioxidantes, anticoccidianos e anti-helmínticos, com capacidade de modificar o padrão de fermentação ruminal (Salem et al. 2011). Portanto, esses compostos fitoterápicos já são muito empregados como agentes antimicrobianos agindo contra bactérias, protozoários e fungos (Bodas et al., 2012) no ambiente ruminal.

Desta forma, o grande potencial como aditivo vegetal da moringa em ruminantes é devido, principalmente, à presença de compostos metabólicos que, quando utilizados em baixas e moderadas concentrações, na maioria das vezes, são capazes de atuar como modificadores da fermentação ruminal (Salem et al., 2014; Pedraza-Hernández et al., 2019).

A importância desses compostos para a produção animal é o efeito direto sobre os microrganismos metanogênicos, por exemplo, os taninos condensados, ou protozoários, como as saponinas. Com relação ao modo de ação antimicrobiano, em geral, decorre sobretudo da capacidade de inserir-se na membrana celular bacteriana para desintegrar sua estrutura e provocar lesão (Bodas et al., 2012).

Entretanto, é importante observar que os efeitos na atividade dos microrganismos ruminais dependem não somente das espécies vegetais utilizadas e da composição química da planta (Bodas et al., 2012), mas ainda devem ser considerados que os efeitos desses compostos são modulados pelo pH ruminal, pela dieta na qual estão incluídos e pelos métodos de preparo e extração dos compostos (Patra; Saxena, 2009). No caso da utilização da moringa para ruminantes, torna-se necessário considerar esses parâmetros e os relacionar com as respostas produtivas dos animais.

Compostos presentes na moringa e ações em ruminantes

A *Moringa oleifera* possui diversos fitoquímicos presentes em distintas partes morfológicas da planta. Segundo Tiloke et al. (2018), os vários compostos bioativos são

responsáveis pelo seu efeito medicinal, e é nas folhas de moringa que são encontrados os maiores teores desses compostos.

Compostos Fenólicos

Em um estudo realizado com plantas cultivadas no Brasil foram descritos 24 compostos fenólicos em extratos de folhas da *M. oleifera*, destacando-se em quantidade os flavonoides glicosilados (Oldoni et al., 2019).

Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de compostos de difenil propano (C6-C3-C6). Eles possuem a estrutura geral de um esqueleto de 15 carbonos composto de dois anéis fenílicos (A e B), unidos através de um pirano eterocíclico ou anel de pirona (C) no meio (Lin et al., 2018). Na moringa, os flavonoides são encontrados nas folhas, raízes, flores e sementes (Onsare, Arora, 2015; Sankhalkar; Vernekar, 2016; Wang et al., 2017).

Entretanto, há diferenças nos teores de flavonoides, assim como de compostos fenólicos, mesmo quando comparadas amostras entre folhas de *M. oleifera*, devido ao ambiente de crescimento, variabilidade genética, método de amostragem, maturidade foliar, bem como o método e solução de extração. Por esse motivo, diferentes partes das plantas de *M. oleifera* apresentam diferentes perfis composição de flavonoides e ações farmacológicas (Lin et al., 2018).

Dos vários compostos flavonoides presentes na moringa destacam-se o kaempferol, quercetina, apigenina e isoramnetina. No caso das folhas, a maioria desses fitoquímicos existe na forma glicosilada. A diferença destes flavonoides na moringa reside na variação da sua extensão de glicosilação e alquilação, além do número e disposição dos grupos hidroxila (Makita et al., 2016).

Os efeitos de extratos vegetais contendo flavonoides sob a fermentação ruminal, estudados *in vivo* e *in vitro*, em novilhas que foram submetidas à acidose (Balcells et al., 2012), demonstraram reduções do pH ruminal, da proporção de propionato e degradação proteica (Broudiscou; Lassalas, 2000; Yaghoubi et al., 2007; Seradj et al., 2014). Segundo Seradj et al. (2014), esses compostos alteram os produtos da fermentação, a concentração e a composição de bactérias que utilizam lactato (*M. elsdenii*) e metanogênicos (Archaea). Também foram detectadas diferenças entre os flavonoides específicos contra a atividade microbiana.

Os resultados dos flavonoides no rúmen derivam de suas atividades antifúngica, antiviral e antibacteriana (Cushnie; Lamb, 2005). Contudo, os efeitos podem diferir devido à concentração de flavonoides, da dieta e dos animais. Patra e Saxena (2010) verificaram atividades diretas desses compostos sobre as bactérias metanogênicas, também a redução de protozoários relacionados à metanogênese ruminal. No entanto, Kim et al. (2015) constataram que os flavonoides não afetam o crescimento microbiano durante a incubação, porém reduzem a emissão de metano, apresentando potencial como regulador bioativo para ruminantes. Portanto, para que a ação dos flavonoides no rúmen seja benéfica ao animal, é preciso verificar as concentrações ideais destes compostos.

Terpenoides

Segundo Calsamiglia et al. (2007), os terpenoides ou isoprenoides compõem classes estruturais e funcionalmente diferentes. Estes compostos são sintetizados a partir de isopentenil difosfato (isopreno) e a sua classificação é baseada no número de unidades de isopreno. Sua atividade antibacteriana deriva de sua interação com a membrana celular. Essa interação provoca mudanças conformacionais na estrutura da membrana bacteriana causando fluidificação e expansão. A perda de estabilidade da membrana resulta no vazamento de íons através da membrana celular, o que causa uma diminuição no gradiente iônico transmembranar (Griffin et al., 1999; Calsamiglia et al., 2007).

Em geral, as bactérias podem compensar esses efeitos dos terpenoides através de bombas iônicas, evitando a morte celular. Porém, como há maior gasto de energia destinado para essa função, o crescimento bacteriano é reduzido (Griffin et al., 1999; Calsamiglia et al., 2007). Em ruminantes, a transformação nas taxas de crescimento bacteriano resulta em mudanças na proporção de populações bacterianas no rúmen, ocasionando alterações no perfil de fermentação (Calsamiglia et al., 2007), podendo melhorar o desempenho animal.

Saponinas

As saponinas são compostos glicosilados encontrados em uma variedade de plantas, e que podem ser divididos em três grupos, dependendo da estrutura da aglicona: triterpenóides, esteróides e glicoalcalóides. Saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, relacionados, principalmente, com o sistema de defesa. São encontradas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos, considerando-se parte do sistema da defesa das plantas e indicadas como “fitoprotetoras” (Souza et al., 2019).

A porção de açúcar é, na maioria das vezes, constituída por monossacarídeos comuns, como D-glucose, D-galactose, ácido D-glucurônico, D-xilose, L-ramnose e várias pentoses, as quais são ligadas glicosidicamente, como oligossacarídeos lineares ou ramificados à sapogenina. Podem ser classificadas com base na sua estrutura de sapogenina, como saponinas triterpenoides ou esteroides (Wina et al., 2005; Makker et al., 2007).

A palavra “saponina” é derivada do latim ‘sapo’, que significa sabão, e tradicionalmente plantas que continham saponinas eram usadas para limpeza (Souza et al., 2019). As saponinas são utilizadas na indústria farmacológica por conta da ação anti-inflamatória, antimicrobiana (Bodas et al., 2012), antiprotozoários (Calsamiglia et al., 2007), anti-carinogênicas e antioxidantes (Souza et al., 2019). Portanto as populações de microrganismos ruminais de fungos, protozoários, bactérias celulíticas e gram positivas são afetadas por estes compostos (Makkar et al., 2007; Calsamiglia et al., 2007). Em protozoários seu modo de ação está relacionado com sua capacidade de formar complexos irreversíveis com colesterol na membrana celular causando ruptura e lise celular (Francis et al., 2002; Wina et al., 2005).

As quantidades de saponinas na matéria seca em folhas de *M. oleifera* são de apenas 4,7 a 5 g/kg, valores que não causam efeitos negativos em ruminantes, e apesar de uma das características das saponinas ser o sabor amargo, o baixo teor não proporciona esse efeito (Moyo et al., 2011).

Diversos estudos demonstraram que as saponinas afetam a fermentação ruminal quando alteram a produção de massa microbiana e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em diferentes extensões. Também afetam a degradação de nutrientes e disponibilidade de proteína pós-ruminal (Makkar et al., 2007), de modo que seus efeitos incluem o aumento da eficiência na síntese de proteína microbiana e diminuição da degradabilidade proteica dos alimentos. Consequentemente, aumentam o suprimento de nitrogênio não amoniacal ao intestino delgado para fins de produção.

Segundo Molina-Botero et al. (2019), os resultados de seu trabalho indicam que a inclusão de saponinas, apesar de não ter influenciado na quantidade de microrganismos ruminais, devido à baixa concentração desse composto, pode ter afetado a permeabilidade da membrana, resultando em maior absorção de nutrientes, o que pode ocasionar benefícios para o hospedeiro (Patra; Saxena, 2009). Além disso, induzem a resultados nos poupadores de proteína em ruminantes e abrandam as emissões de metano e a excreção de nitrogênio para o meio ambiente. Com isso, reduzem a emissão de gases poluentes ambientais. Portanto, esses resultados ocasionam melhorias na produção de carne, leite e lã (Makkar et al., 2007).

Essas atividades sob produtos em metanogênicos (Archaea) tem destacado as saponinas na nutrição animal, enfatizando sua potencialidade para diminuir as emissões de gases de efeito estufa. Todavia há diferenças entre sua atividade nos níveis e proporção de AGCC, nível de amônia e degradabilidade proteica. Os resultados em animais dependem dos diferentes tipos e concentração de saponinas, bem como, a composição das dietas experimentais (Makkar et al., 2007).

Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos, encontrados naturalmente nas plantas (Singh et al., 2019). Seus múltiplos grupos hidroxilas fenólicas levam à formação de complexos principalmente com proteínas e íons, aminoácidos e polissacarídeos. Estes compostos bioativos possuem efeitos adversos e benéficos em ruminantes, dependendo da sua concentração e tipo, condensados ou não condensados, (Singh et al., 2019), bem como espécie, estado fisiológico e composição da dieta (Makkar et al., 2007).

Nas folhas de moringa, o teor de taninos totais varia de 12,0 a 20,6 mg g⁻¹ (Ferreira et al., 2008; Teixeira et al., 2014). O tanino é um composto que interage com a tripsina e amilase ou com os substratos dessas enzimas para formar complexos que não são facilmente digeríveis e, dependendo da quantidade, pode reduzir a palatabilidade e a ingestão de alimentos. No entanto, os métodos de secagem, fermentação e ensilagem podem reduzir os teores de taninos em 15 a 30% em comparação com material fresco (Vitti et al., 2005), resultando em melhorias na palatabilidade e ingestão.

Alguns dos efeitos benéficos dos taninos consistem no aumento da proteína não degradável no rúmen e a disponibilização de proteína alimentar pós-ruminal para fins de produção, aumento da eficiência da produção de proteína microbiana e diminuição do timpanismo em ruminantes. Alguns taninos também são conhecidos por terem fortes atividades anticarcinogênica e antioxidante (Perchellet et al., 1996; Riedl et al., 2002; Makkar et al., 2007). De acordo com Bodas et al. (2012), os taninos, assim como as saponinas, são particularmente capazes de inibir bactérias gram-positivas.

Alcaloides

Os alcaloides são compostos que contêm N e têm vários efeitos farmacológicos envolvendo atividades antimicrobianas e anticancerígenas (Thambidurai et al., 2017). Por conta disso, esses compostos podem afetar o ecossistema microbiano ruminal e desempenho geral dos animais (Sotan et al., 2018).

No caso de alcaloides piperidínicos, o mecanismo de ação em bactérias gram-positivas ocorre devido a sua alta citotoxicidade causada pelo bloqueio dos canais de cálcio na membrana celular, sobretudo por conta de suas propriedades anfotéricas, que lhes permitem melhor interagir com a membrana celular e inibir seus canais (Santos et al., 2013). Desta forma, estes metabólitos também atuam modulando os produtos da fermentação ruminal.

As atividades antimicrobianas dos fitoquímicos são diferentes entre os compostos, ainda em sua concentração inibitória mínima para os microrganismos ruminais, e na sensibilidade à ação fitoquímica entre as espécies microbianas. Em geral, os compostos de baixo peso molecular são mais ativos contra os microrganismos do rúmen, e diferem nos mecanismos moleculares ou celulares envolvidos na atividade antimicrobiana (Bodas et al., 2012). Segundo Salem et al. (2014), os microrganismos ruminais podem metabolizar e utilizar concentrações mais baixas de alcaloides, saponinas e compostos fenólicos como fonte de energia, sem deixar resíduos na produção de ruminantes.

Geralmente, os efeitos dos fitoterápicos em populações de protozoários, fungos e bactérias alteram a formação de produtos finais de fermentação, tais como amônia e AGV no rúmen (Bodas et al., 2012). Nos extratos vegetais, a concentração e atividades dos compostos metabólicos são afetadas pelo solvente utilizado e sua diluição, em conjunto com as condições de extração como tempo, temperatura e atmosfera. Enfatizando que os efeitos dos fitoquímicos na redução ou inibição da produção de metano, bem como na fermentação ruminal, dependem da concentração destes na planta e da dose fornecida ao animal.

Extratos aquosos

A utilização do extrato da planta justifica-se pelo fato deste possibilitar o aumento das atividades biológicas e potencializar o efeito de compostos ativos. Os extratos de plantas têm confirmado grande potencialidade na melhoria do valor nutritivo dos alimentos para animais de maneira dependente de sua dose e esses benefícios são conferidos à presença de metabólitos secundários (Benchaar et al., 2008; Cedillo et al., 2014; Elghandour et al., 2018).

Diversos benefícios provenientes de extratos vegetais constituem-se em uma ação aditiva ou sinérgica dos metabólitos secundários, que atuam em locais-alvo únicos ou múltiplos (Faniy et al., 2019), com potencial de alterar a fermentação ruminal (Salem et al., 2014; Elghandou et al., 2018). Entretanto, alguns fatores devem ser considerados quanto à escolha do método de extração das plantas como sua simplicidade, rapidez, economia (Rodríguez-Pérez et al., 2015) e, principalmente, eficiência.

Estudos à respeito da forma em que a planta é utilizada/fornecida são importantes, pois os compostos metabólitos podem ser afetados por diversos fatores, incluindo a forma de extração, que pode ser pelo método a frio (Dahiru et al., 2006; Souto et al., 2015; Vongsak et al., 2013) e a quente (Chumark et al., 2008; Adedapo et al., 2009; Vongsak et al., 2013; Kholif et al., 2018) em extratos aquosos, ou com a utilização de diferentes solventes como hidro etanol (Singh et al., 2013), etanol (Nascimento et al., 2013; Vongsak et al., 2013; Al-Owaisi et al., 2014; Rodriguez-Perez et al., 2015), e hidro metanol (Rodriguez; Perez et al., 2015). Nos extratos aquosos e metanólicos das folhas foram descritos como principais compostos: ácido clorogênico, quercetina e kaempferol (Verma et al., 2009; Vongsak et al., 2013).

Os extratos brutos de diferentes tecidos de *Moringa oleifera* apresentam diversas atividades antimicrobianas. Pesquisas demonstraram que os extratos, e alguns compostos identificados da moringa, exibem atividade antimicrobiana contra várias bactérias patogênicas, fungos, vírus e parasitas que afetam a saúde dos seres humanos, animais e plantas (Wang et al., 2016).

Neste contexto, os extratos aquosos derivados dessa planta possuem compostos bioativos cuja utilização pode influenciar a fermentação ruminal. Os benefícios, não apenas de extratos como também de outras formas de sua inclusão na dieta dos animais, foram demonstrados a partir de experimentos com a moringa.

Experimentos *in vitro*

Vários experimentos foram realizados para avaliar o efeito de aditivos vegetais na degradação dos alimentos, o qual é essencial para atender às demandas de nutrientes dos microrganismos anaeróbios e, em geral, para os ruminantes. Dentre os estudos, destacam-se os métodos *in vitro*, pela sua simplicidade e rapidez (Meale et al., 2011).

A ênfase na utilização de técnicas *in vitro* deve-se à sua facilidade de inclusão, repetibilidade, redução no uso de animais; assim como economia financeira (Getachew et al., 2005; Aderinboye et al., 2016). Segundo Meale et al. (2011), esses experimentos são considerados mais econômicos quando comparados a outros métodos, pois exigem menos infraestrutura e apresentam a possibilidade de analisar tanto o resíduo quanto os metabólitos da degradação microbiana.

A metodologia *in vitro* permite o controle de vários fatores que afetam a degradação da dieta, microrganismos e ambiente, e, por conseguinte, permite a uniformidade e caracterização de alimentos para degradação de MS e proteína (Meale et al., 2011).

Comparada com o método *in vivo*, a técnica *in vitro* é mais eficiente na manutenção do pH ruminal, por causa do controle dos fatores nutricionais e físico-químicos disponíveis (Mould et al., 2005). Ainda, de acordo com Mould et al. (2005), o método é fundamentado em manter as amostras de alimento em contato com o líquido ruminal, tamponados em um recipiente, no qual as condições existentes no rúmen são simuladas, como a presença dos microrganismos, anaerobiose, temperatura de 39° C e pH de 6,9.

Estudos sobre a fermentação ruminal

A modulação da fermentação ruminal visa melhorar a utilização de alimentos, digestibilidade de alimentos fibrosos e reduzir a degradabilidade de proteínas no rúmen (Salem et al., 2012; Ugbogu et al., 2019). Também objetiva inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (Arowolo e He, 2018) e aumentar o desempenho animal, diminuindo a perda de energia e reduzindo as emissões de CH₄ e CO₂ para uma produção animal mais ecológica (Ugbogu et al., 2019).

A maioria desses experimentos concentra-se em produtos derivados da folha de moringa, por exemplo, o extrato destas. Com base no trabalho de Awodele et al. (2012), em que foi avaliada a toxicidade do extrato aquoso da *M. oleifera* em ratos machos, o extrato aquoso é considerado segura para a utilização na produção animal, a depender de sua concentração e do vegetal utilizado.

Na Tabela 1 são apresentados os estudos realizados com extrato aquoso de moringa em ruminantes. Ambos os experimentos utilizaram a mesma forma de extração que foi inicialmente por infusão na proporção de 1 kg de matéria seca (MS) de folha para 8 L de água destilada, a 25-30 °C por 72h, seguida pelo método de decocção, onde os extratos resultantes foram aquecidos por 39 °C por 1 h e filtrados imediatamente com gaze, para então serem armazenados a 4 °C. Nas pesquisas de Kholif et al. (2018; 2019) foram analisados e quantificados os compostos bioativos: taninos totais (2,75 g/L) e compostos fenólicos totais (6 g/L) presentes no extrato de moringa.

Tabela 1. Experimentos com extratos aquosos da folha de *Moringa oleifera* em ruminantes.

Dieta experimental	Dosagem	Resultados	Informações do animal doador	Autores
Aveia, soja, cevada, trigo, melaço e milho	0, 0,6, 1,2 e 1,8 mL/g de MS da dieta	Menor produção de CH ₄ , maior/menor produção de dióxido de carbono em relação a dieta. Em menores concentrações de material fibrosos maior energia metabolizável, maiores concentrações de AGCC, maior produção de biomassa microbiana, pH e maior digestibilidade da M.O. A digestibilidade de MS não foi influenciada.	Dois novilhos da raça Holandesa, alimentados com feno de alfafa e concentrado.	Parra-Garcia et al., 2019
Mistura de aveia, soja, cevada, farelo de trigo, milho, melaço e pré-mistura vitamínica e mineral (controle); e diferentes níveis de concentração de cacto de pera espinosa juntamente com o controle	0, 0,6, 1,2 e 1,8 mL/g de MS da dieta	Diminuição na produção de metano e aumento na produção de CO ₂ ; não afetando os demais parâmetros fermentativos.	Líquido de dois novilhos da raça Holandesa, alimentados com feno de alfafa e concentrado.	Elghandour et al., 2018
75% de forragem e 25% de concentrado	0, 0,6 e 1,8 mL/g de MS da dieta	Melhoria do GP, não afetou significativamente os valores de pH e degradabilidade da MS ($P > 0,05$).	10 ovinos (Nubia × Criollo; aproximadamente 18 ± 3 kg de peso vivo) alimentados com a dieta controle de Elghandour et al. (2018)	Pedraza-Hernández et al., 2019
A dieta basal fornecida aos animais (kg/MS): 400 g de trevo-do-egípcio (<i>Trifolium alexandrinum</i>), 300 g de milho, 200 g de farelo de soja, 80 g de farelo de trigo 10 g de calcário, 5 g de mistura de minerais/vitaminas e 5 g de sal.	0, 10, 20 e 40 mL /ME40	Aumento na ingestão de nutrientes, na digestibilidade de MO/MS, carboidratos não estruturais, FDN, hemicelulose, celulose, não alterou o pH, aumentou os AGCC e de cadeia ramificada e ácido propiônico; diminuição da produção de CH ₄ .	16 cabras lactantes, com peso de 36,5 ± 0,6 kg de peso corporal (PC)	Kholif et al., 2018
A dieta basal fornecida aos animais (kg/MS): 400 g de trevo-do-egípcio (<i>Trifolium alexandrinum</i>), 300 g de milho amarelo triturado, 200 g de farelo de soja, 80 g de farelo de trigo 10 g de calcário, 5 g de mistura de minerais / vitaminas e 5 g de sal.	0, 10, 20 e 40 mL /ME40	Idem Kholif et al 2018; Melhora a produção e composição do leite, com diminuição de ácidos graxos saturados e aumento de CLA (isômeros do ácido linoleico) e ácidos graxos insaturados.	16 cabras lactantes, com peso de 36,5 ± 0,6 kg de PC	Kholif et al, 2019

No estudo de Parra-Garcia et al. (2019), a inclusão do extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* afetou positivamente a fermentação ruminal *in vitro*, com o aumento da produção de biomassa microbiana, energia metabolizável e concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), com baixas concentrações de material fibroso.

Neste experimento, o extrato derivado de folhas de moringa reduziu a produção de metano com a dieta de maior nível de substituição de grãos de milho por casca de soja. Com exceção do pH, que aumentou com o nível mais alto de adição do extrato. A interação do tipo de substrato e dos níveis de extrato demonstrou ter um efeito positivo em todos os parâmetros de fermentação (Parra-Garcia et al., 2019).

Segundo Parra-Garcia et al. (2019), o aumento da produção de biogás assintótico na presença do extrato de *M. oleifera* indica que o extrato teve efeito mais significativo em concentrações mais baixas de carboidratos fibrosos. Esse aumento na produção de biogás é um indicativo de maior degradabilidade e fermentabilidade dos substratos (Parra-Garcia et al., 2019). Apesar dos autores mencionarem os metabólitos como responsáveis pelo efeito, não foram identificados os compostos bioativos presentes no extrato.

Em outro experimento *in vitro*, a adição do extrato aquoso fresco de folhas de *M. oleifera* às dietas resultou em diminuição na produção de metano e aumento na produção de CO₂ sem afetar os demais parâmetros fermentativos (Elghandour et al., 2018). Os pesquisadores também atribuem aos metabólitos secundários os efeitos na produção de metano e defendem que haja mais algum componente ativo presente no extrato que ainda não foi mencionado. O fato de não alterar os outros parâmetros de fermentação deve-se às diferenças nas condições experimentais, na natureza do extrato, no nível de inclusão, na dieta experimental usada e nos doadores de líquido ruminal. Contudo, a inclusão do extrato fresco na dieta de ruminantes pode ser uma estratégia eficaz para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (Elghandour et al., 2018).

As folhas da moringa também podem ser extraídas com outros solventes, como o metanol, cujos testes *in vitro* também apresentaram benefícios para ruminantes. O extrato metanólico de folhas de *M. oleifera* reduziu significativamente CH₄ com aumento de ácidos graxos voláteis e digestibilidade da matéria orgânica em um experimento *in vitro* (Akanmu; Hassen, 2018). Ainda, as sementes também podem ser utilizadas como extratos adicionados à dieta dos animais. Na pesquisa de Alexander et al. (2008), o extrato metanol aquoso de semente da *M. oleifera*, em determinadas doses, favoreceu a partição dos produtos finais da fermentação ruminal em células microbianas, às custas da produção de gás e/ou ácidos graxos

voláteis em dietas à base de forragem. Os autores verificaram a presença e quantificaram os fenóis totais, fenóis não taninos, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, total de taninos e saponinas esteroides, cujas concentrações foram de 13,5; 2,4; 11,1; 0,0; 11,1 e 40,9 g/kg de matéria seca do extrato de metanol aquoso de moringa.

Em outro experimento *in vitro*, os resultados mostraram que a adição do extrato metanol aquoso de moringa aumentou o volume e a pressão do gás produzido e reduziu a emissão de biogás. O volume de biogás é um parâmetro que está relacionado com a digestibilidade, fermentação, AGCC e síntese de proteínas microbianas no sistema *in vitro*. A extensão da fermentação e digestibilidade da ração é refletida pelo gás produzido. Os resultados indicaram que em doses adequadas o extrato tem potencial de modular a eficiência da fermentação ruminal positivamente, podendo ser utilizado na mitigação da produção de gases de efeito estufa (Faniyi et al., 2019).

As folhas podem ser utilizadas como suplemento na dieta dos animais, resultando, do mesmo modo, em benefícios. Soliva et al. (2005) comprovaram a redução na produção de CH₄ com a presença de folhas de moringa (etanol/acetona). Ainda houve aumento da degradabilidade ruminal *in vitro* comparado ao farelo de soja e farelo de colza. Dey et al. (2014) demonstraram que a presença de folhas da moringa resulta em maior degradação do substrato e síntese de proteína microbiana, aumento da AGV e redução de CH₄. Ambos os autores sugerem que as atividades da moringa resultam da presença de fitoquímicos nas folhas.

No entanto, dependendo de como a moringa for administrada, não há diferença quanto à fonte do inóculo. De acordo com Aderinboye et al. (2016), as folhas e caules secos de *M. oleifera* aumentaram a degradação da matéria seca e a taxa de fermentação ruminal, com aumento da produção de gás *in vitro*, independentemente da fonte de fluido ruminal (bovinos, cabras e ovinos).

A maioria dos experimentos *in vitro* são realizados com inóculos de grandes ruminantes, como bovinos e búfalos. No entanto, também foram testados os efeitos de extratos de moringa a partir de líquidos ruminais de pequenos ruminantes, por exemplo, de cabras. Segundo Pedraza-Hernández et al. (2019), o extrato derivado das folhas frescas de *M. oleifera* melhorou a produção de gás assintótico. Como consequência, aumentou a fermentação, ocasionando maior disponibilidade de nutrientes para os animais. Desta forma, o extrato de folhas frescas fornece nutrientes necessários para a microbiota ruminal, conseqüentemente, há melhor degradabilidade e fermentação dos alimentos. Neste estudo *in*

in vitro o extrato diminuiu as emissões de CH₄ e de CO₂ em inóculos de cabras, podendo ser utilizado na suplementação alimentar de ruminantes.

Entre os animais, os resultados na utilização da moringa podem variar de acordo com a espécie estudada. Por isso, a importância de verificar a resposta do mesmo produto em diferentes espécies. Elghandour et al. (2017) observaram diferenças entre os resultados na substituição do farelo de soja pelo farelo de folhas de moringa em inóculos fornecidos por cabras e novilhos. No inóculo proveniente de cabra os resultados induziram à maior fermentação e atraso na adaptação dos microrganismos ruminais às dietas do que o inóculo de boi. Esse resultado pode ser devido às diferenças na população microbiana ruminal e na capacidade de digestão das duas espécies de ruminantes. No entanto, houve redução na produção de CH₄ em ambos os ruminantes, 8% e 10% em cabras e novilhos, respectivamente, alimentados com dietas contendo folhas de moringa em comparação à dieta controle de soja.

Do mesmo modo que outras pesquisas, os autores afirmam que o declínio na produção de CH₄ pode ser atribuído aos metabólitos secundários, que possuem ação antimicrobiana e antiprotozoária, como os taninos (Bodas et al., 2012; Elghandour et al., 2017). Elghandour et al. (2017) consideram o efeito dos metabólitos secundários nas bactérias celulolíticas, que ocasiona diminuição na formação de CO₂ e H₂, indispensáveis para a metanogênese. Como consequência, há redução da produção de AGCC, principalmente do acetato, causando uma redução na produção de CH₄.

Diversos resultados da adição de folhas da moringa incluem o aumento no desempenho animal como consequência dos benefícios da melhora na fermentação ruminal. Os autores Kholif et al. (2015) relataram que a inclusão de farinha das folhas de moringa na alimentação de cabras resultou no aumento da produção de leite, principalmente por causa do aumento da ingestão de ração, da digestibilidade dos nutrientes e da fermentação ruminal.

De acordo com Sarwatt et al. (2004), o aumento da produção de leite observado em vacas alimentadas com folhas de moringa foi decorrente da atividade positiva no ambiente ruminal e na fermentação, com melhora na quantidade de biomassa microbiana e de proteínas não degradadas do alimento alcançando o abomaso. Segundo Khalel et al. (2014) também houve um aumento significativo na composição e produção diária de leite em vacas alimentadas com moringa como suplemento proteico.

No experimento de Kholif et al. (2015), as concentrações de ácido propiônico aumentaram com a presença de farinha das folhas de moringa. Devido ao propionato ser precursor da gliconeogênese e da síntese de lactose, o seu aumento favorece a produção de leite. A melhora no desempenho animal com a suplementação de *M. oleifera*, portanto, é

devido às modificações na fermentação ruminal, decorrente de alterações benéficas nas populações microbianas (Kholif et al., 2015).

A presença do caule juntamente com as folhas de moringa, do mesmo modo, demonstrou aumento no desempenho de cabras. Segundo Kholif et al. (2017), a substituição do BC O QUE EP BC (*Trifolium alexandrinum*) pela biomassa de moringa (folhas e caules frescos) nas dietas de cabras em lactação resultou no aumento do consumo de ração, da digestibilidade, da fermentação ruminal e da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite. As pesquisas demonstram que todos os tecidos da *M. oleifera* podem ser utilizados seguramente na produção animal.

Assim, os resultados positivos do uso da moringa em ruminantes, observados nos experimentos *in vitro*, também são comprovados *in vivo*. Conforme demonstrado por Kholif et al. (2018), o extrato aquoso de folhas frescas da moringa administrado oralmente em cabras teve efeitos positivos na digestão de nutrientes com níveis crescentes. Isso porque os níveis de taninos, fenóis e outros metabólitos secundários do extrato não prejudicaram o ambiente ruminal e a atividade microbiana. Ressalta-se que os microrganismos ruminais podem degradar e utilizar metabólitos secundários em níveis baixos, como fontes de energia sem efeitos negativos na fermentação ruminal (Salem et al., 2014; Kholif et al., 2018).

Os resultados de cromatografia identificaram 30 compostos e, destes, três principais compostos antimicrobianos, representando 65,6% do total de compostos identificados: ácido hexadecanóico, 9, ácido 12,15-octadecatrienóico e ácido 9,12-octadecadienoico (Kholif et al., 2017; Kholif et al., 2018). É essencial a identificação de quais compostos estão presentes nos extratos, para inferir quais podem ser responsáveis pelos efeitos observados.

No experimento de Kholif et al. (2018), o pH não foi alterado, assim como a concentração de amônia-N ruminal, evidenciando que os níveis de extrato utilizados foram adequados para a fermentação ruminal. Foi constatado a diminuição da produção de CH₄, aumento dos ácidos graxos totais de cadeia curta e de cadeia ramificada e ácido propiônico. Todas as doses de extrato utilizadas tiveram efeitos positivos na fermentação ruminal. O fornecimento oral do extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* ao leite materno de cabras aumentou a ingestão de alimentos e melhorou a digestibilidade dos nutrientes, decorrentes da melhora na fermentação ruminal (Kholif et al., 2018). De acordo com o estudo de Shi et al. (2019), as características nutritivas do extrato de moringa, combinadas com a estabilidade de pH e temperatura, podem auxiliar a melhorar a qualidade de queijo. Uma maior digestibilidade dos carboidratos não estruturais poderia ser a principal razão para maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o propionato. Além disso, a

inclusão do extrato de *M. oleifera* aumentou a proporção de propionato ruminal, considerado benéfico na produção leiteira (Kholif et al., 2016).

A suplementação com plantas de *M. oleifera* melhorou a digestibilidade dos nutrientes e aumentou a concentração de AGCC no rúmen de cabras, o que resultou no crescimento de espécies bacterianas produtoras de propionato e na inibição de bactérias produtoras de CH₄ (Wallace et al., 2002).

Segundo Dong et al. (2019), a inclusão de *M. oleifera* melhorou o teor de gordura do leite e alterou a composição e a diversidade de metanogênicos. Este estudo indica que metabólitos secundários da planta podem regular as condições de fermentação e associações entre alguns metanogênicos e outros microrganismos.

Produtos bioativos, como saponinas (80 g/kg) e taninos (12 g/kg) nas folhas de moringa, têm uma função antimicrobiana e desempenham a função importante de melhoria da digestibilidade dos nutrientes e da eficiência da fermentação (Ferreira et al., 2008; Teixeira et al., 2014). Por isso, presume-se que a grande quantidade de saponinas ingerida (144 g/dia de inclusão na dieta de 9% de *M. oleifera*) altera a composição e distribuição de bactérias metanogênicas no trato gastrointestinal, inibindo emissões de CH₄ (Dong et al., 2019).

Trabalhos sobre a inclusão de folhas de *M. oleifera* nas dietas de ruminantes demonstraram melhorias quantitativas e qualitativas no desempenho animal (Mendieta-Araica et al., 2011; Kholif et al., 2016). Além disso, Azzaz et al. (2016) evidenciaram que dietas suplementadas com folhas secas de moringa afetaram positivamente a digestibilidade dos nutrientes, produção de leite, composição do leite e perfil de ácidos graxos do leite em ovelhas. No estudo de Mendieta-Araica et al. (2011) houve aumento na digestibilidade da matéria seca - MS e da proteína bruta PB, com a inclusão de folhagem fresca de *M. oleifera* na dieta de vacas leiteiras.

A raiz de moringa também tem sido estudada quanto aos parâmetros de fermentação ruminal. Sotan et al. (2018) confirmaram que a adição do pó da raiz de moringa diminuiu a produção de metano *in vitro* em comparação com o controle e com monensina, demonstrando que partes diferentes da planta podem ser usadas como aditivo alimentar natural para modificar o perfil de fermentação ruminal e promover a digestibilidade de nutrientes e fibras.

O extrato de semente de *M. oleifera* também tem evidenciado melhoras na fermentação ruminal. Em relação à degradação de proteínas, o experimento *in vitro* de Hoffmann et al. (2003), com o extrato aquoso de sementes de moringa, demonstrou seu potencial semelhante ou até mesmo melhor do que outros aditivos usados na alimentação animal.

Outro trabalho utilizando o óleo de semente de moringa como aditivo alimentar avaliou seu potencial em manipular a fermentação ruminal e o desempenho produtivo em ovelhas lactantes. O estudo *in vitro* demonstrou que o óleo de semente de moringa não afetou a degradabilidade da matéria seca, mas houve efeito na produção total de gases. De acordo com os resultados *in vitro* para padrão de fermentação, o nível apropriado para suplementação de óleo de semente de moringa foi de 1%, sendo avaliado posteriormente nesta concentração em experimento *in vivo*. Os resultados revelaram que a suplementação com moringa aumentou a produção de leite e a concentração de gordura. Assim, o óleo pode ser empregado como suplemento natural de gordura para atender às necessidades energéticas de ovinos em lactação. Os efeitos positivos foram atribuídos aos antioxidantes e outros compostos bioativos do óleo, que podem modular a fermentação ruminal (Ebeid et al., 2019).

A semente da moringa também foi avaliada *in vitro* sendo fornecida como bolo para substituir o farelo de soja em relação a parâmetros fermentativos. O fornecimento do bolo afetou de forma positiva a produção total de gás, inclusive de metano. Segundo os autores, ao nível de 5%, o bolo de sementes da moringa foi o mais adequado para a fermentação ruminal (Hansen et al., 2020).

Os resultados experimentais evidenciam vários benefícios aos animais com o uso da moringa. Os pesquisadores atribuem tais respostas aos compostos bioativos da planta. No entanto, vários fatores podem influenciar a presença e a quantidade de seus compostos metabólicos. É interessante identificar quais compostos estão presentes na planta e em seus derivados, assim como sua concentração, seja para futura aplicação, discussão dos compostos que promoveram tais resultados ou conhecimento da variação destes em diferentes locais e métodos de fornecimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os tecidos de moringa têm demonstrado grande potencial como aditivo para ruminantes. Os metabólitos secundários presentes nas plantas podem desempenhar atividades importantes nos animais, isto quando utilizados em dosagens adequadas. Neste sentido, é fundamental verificar quais os compostos ativos e as concentrações benéficas destes, e sua quantificação nas diferentes formas de inclusão da moringa.

É necessário ressaltar que determinados fatores influenciam a presença dos compostos bioativos, e sua atividade também pode ser afetada pela dieta e pelos animais experimentais. As alterações em populações de microrganismos ruminais melhoram alguns parâmetros

fermentativos como degradabilidade, digestibilidade, ácidos graxos, produção de gases e nitrogênio amoniacal, podendo ocasionar melhoras significativas no desempenho animal.

Mesmo com a identificação dos compostos bioativos da moringa em alguns estudos, é interessante realizar mais pesquisas específicas sobre o modo de ação de cada composto da *Moringa oleifera* e seus efeitos no rúmen, visto que alguns podem estar melhorando a saúde animal, devido às atividades medicinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRAO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C. SILVA-HUGHES, A. C. Characterization of fungi from the ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Curr Microbiol*, v. 69, p. 649-659, 2014.
- AL-OWAISI, M.; AL-HADIWI, N.; KHAN, S. A. GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, p. 964-970, 2014.
- ADEDAPO, A.; MOGBOJURI, O. M.; EMIKPE, B. O. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. *J. Med. Plant*, v. 3, p. 586-591, 2009.
- ADERINBOYE, Y.; AKINLOLU, A. O.; ADELEKE, M. A.; NAJEEM, G. O.; OJO, V. O. A.; ISAH, O. A.; SLOVAK, O. J. B. In vitro gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocular. *J. Anim. Sci.*, v. 49, n. 1, p. 32- 43, 2016.
- ALEXANDER, G.; SINGH, B.; SAHOO, A.; BHAT, T. K. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, v. 145, p. 229-244, 2008. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.036.
- AKANMU, A. M.; HASSEN, A. The use of certain medicinal plant extracts reduced in vitro methane production while improving in vitro organic matter digestibility. *Animal Production Science*, v. 58, n. 5, p. 900, 2018. doi:10.1071/an16291.
- ANWAR, F.; LATIF, S., ASHRAF, M.; GILANI, A., *Moringa oleifera*: uma planta alimentícia com múltiplos usos medicinais. *Phyther Res*, v. 21, p. 17-25, 2007.
- AROWOLO, M. A.; HE, J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: a review. *Anim. Nutr.*, v. 4, p. 3, p. 241-249, 2018. doi:10.1016/j.aninu.2018.04.010
- AWODELE, O.; OREAGBA, A.; S., ODOMA, J.; SILVA, A.T.DA; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 330-336, 2012.
- AZZAZ, H. H.; FARAHAT, E. S. A.; MORSY, T. A.; AZIZ, H. A.; HADHOUD F.I.; ABD-ALLA, M. S. *Moringa oleifera* and *Echinacea purpurea* as supplements for rhamani lactating Ewe's diets and their effect on rumen characteristics, nutrients digestibility, blood parameters,

milk production, composition and its fatty acid profile. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, v.11, p. 684-692, 2016.

BALCELLS, J.; ARIS, A.; SERRANO, A.; SERADJ, A. R.; CRESPO, J.; DEVANT, M. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, v. 90, p. 4975-4984, 2012.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, v. 145, n. 1-4, p. 209-228, 2008.

BROUDISCOU, L. P.; LASSALAS, B. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 40, p. 431-440, 2000.

BRUNELLI, M.; TAVECCHIO, C.; FALCIONI, R.; FRAPOLLI, E.; ERBA, R.; IORI, M.; D'INCALC, I. The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF-kB and reduces myeloma growth in nude mice *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, p. 1141-1148, 2010.

BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; CARCIA-GONZÁLEZ, R. ; RODRÍGUEZ, A. B.; WALLACE, R. J.; GONZÁLEZ, J. S. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 145, p. 245-258, 2008.

BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plants secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, v. 176, p. 78-93, 2012.

CALSAMIGLIA, S.; M. BUSQUET, P.W. CARDOZA, L. CASTILLEJOS, A. Ferret Invited review. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 2580-2595, 2007. doi:10.3168/jds.2006-644

CEDILLO, J.; VÁZQUEZ-ARMIJO, J. F.; GONZÁLEZ-REYNA, A.; SALEM, A. Z.; KHOLIF, A.E.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. C.; JIMÉNEZ, R. M. D.; RIVERO, O. N.; LÓPEZ, D. Effects of different doses of *Salix babylonica* extract on growth performance and diet in vitro gas production in Pelibuey growing lambs. *Italian J. Anim. Sci.*, v.13, n. 3, p. 609-6013, 2014.

CHOUDHURY, P. K.; SALEM, A. Z. M.; JENA, R.; KUMAR, S.; SINGH, R.; PUNIYA, A. K. Rumen microbiology: an overview. In: PUNIYA, K.A. SINGH, R. KAMRA N.D. Rumen microbiology: from evolution to revolution, Springer, New Delhi, p. 3-16, 2015.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P. S.; ANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWATF, S.; PONGRAPEEPORNET, K.U. The in vitro and ex-vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *J Ethnopharmacol*, p. 439-446, 2008.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, v. 26, p. 343-356, 2005.

- DAHIRU, D.; OBNUBIYI, J. A.; UMARU, H. A. Phytochemical screening and antiulcerogenic effect of *Moringa*. *African Journal of Traditional, Complimentary and Alternatives Medicines*. v. 3, p. 70-75, 2006.
- DEHORITY, F. B. A. *Rumen microbiology* Nottingham University Press, Nottingham. Roma, 2003.
- DEY, A.; PAUL S. S, PANDEY, P.; RATHORE, R. Potential of *Moringa oleifera* leaves in modulating in vitro methanogenesis and fermentation of wheat straw in buffalo. *Indian J Anim Sci*, v. 84, p. 533-538, 2014.
- DONG, L.; ZHANG, T.; DIAO, Q. Effect of Dietary Supplementation of *Moringa oleifera* on the Production Performance and Fecal Methanogenic Community of Lactating Dairy Cows. *Animals*, v. 9, n. 5, p. 262, 2019.10.3390/ani9050262
- ELGHANDOUR, M. M. Y.; VALLEJO, L. H.; SALEM, A. Z. M.; MELLADO, M.; CAMACHO, L. M.; M. CIPRIANO, OLAFADAHAN, O. A.; OLIVARES, J.; ROJAS, S. *Moringa oleifera* leaf meal as an environmental friendly protein source for ruminants: biomethane and carbon dioxide production, and fermentation characteristics. *J. Clean. Prod.*, v. 165, p. 1229-1238, 2017. doi:10.1016/j.jclepro.2017.07.151
- ELGHANDOUR, M. M. Y.; RODRÍGUEZ-OCAMPO, I.; PARRA-GARCIA, A.; SALEM, A. Z. M.; GREINER, R.; MÁRQUEZ-MOLINA, O.; BARROS-RODRÍGUEZ, M.; BARBABOSA-PILEGO, A. Biogas production from prickly pear cactus containing diets supplemented with *Moringa oleifera* leaf extract for a cleaner environmental livestock production. *J. Clean. Prod.*, v. 185, p. 547-553, 2018. doi:10.1016/j.jclepro.2018.03.019.
- EBEID, H.M.; SHAABAN, M.M.; GAWAD, R.M.A.; SALEH, ABOAMER, H.M.; EGYPTIAN. A.A. Effect of mor. *Food Research International* inga oleifera seed oil as natural feed supplement on the productive performance of lactating ewes. *J. Nutrition and Feeds* ,v. 22, n.2, p. 273-282, 2019.
- FALOWO, A. B.; MUKUMBO, F. E.; IDAMOKORO, E. M.; LORENZO, J. M.; AFOLAYAN, A. J.; MUCHENJE, V. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. In nutrition and animal food products: A review, *Animals*, v. 106, p. 317-334, 2018.
- FANIYI, T. O.; PRATES, Ê. R.; ADEGBEYE, M. J.; ADEWUMI, M. K.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; SALEM, A. Z. M.; JACK, A. A. Prediction of biogas and pressure from rumen fermentation using plant extracts to enhance biodigestibility and mitigate biogases. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 42, p. 125-136, 2019. doi:10.1007/s11356-019-05585-1.
- FANNING, J. P.; HYND, P. I.; COCKCROFT, P. D. The relative roles of the ruminal fluid and epithelium in the aetiology of ruminal acidosis. *Small Ruminant Research*, v. 162, p. 57-62, 2018.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, A. J. T.; CARVALHO, F. A. *Moringa oleifera*: Bioactive compounds and nutritional potential. *Rev. Nutr., Campinas*, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.
- FLORES, A. J.; GARCIARENA, A. D.; HERNÁNDEZ, J. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D. Effects of specific essential oil compounds on the ruminal environment, milk production and milk composition of lactating dairy cows at pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 186, p. 20-26, 2013.

- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* v. 88, p. 587–605, 2002.
doi:10.1079/BJN2002725
- GETACHEW, G.; DEPETERS, E. J.; ROBINSON, P. H.; FADEL, J. G. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*, v. 547, p. 123-124, 2005.
- GRASSMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam. Horm.*, v. 72, p. 505-535, 2005.
- GRIFFIN, S. G.; WYLLIE, S. G.; MARKHAM, J. L.; LEACH, D. N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.*, v. 14, p. 322-332, 1999.
- HANSEN, H. H.; EBEID, M. H., EL-BORDENY, N. E.; HASSAN, F U. In Vitro Evaluation of Moringa Whole Seed Cake as a Feed Ingredient to Abate Methane Emission from Ruminants. *International journal of agriculture & biology*, p. 1814–9596, 2020.
doi:10.17957/IJAB/15.1380
- HOFFMANN, I.; GERLING, D.; KYIOGWOM, U. B.; MANÉBIELFELDT A. Farmers management strategies to maintain soil fertility in a remote area in northwest Nigeria. *Agric., Ecosys. Environ.* v. 86, n. 263-275, 2001.
- JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 160, p.1-22, 2010.
- KHALAFALLA, M, M., E., ABDELLATEF, H.M., DAFALLA, A.A., NASSRALLAH, K.M., ABOUL-ENEIN, D. A. Lightfoot, Active principle of *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and one hepatocarcinoma. *African. Journal of Biotechnology*, v. 9, p. 8467 - 8471, 2010.
- KHALEL, M. S.; SHWERAB, A. M.; A.A.; HASSAN, YACOUT, M.; EL-BADAWI, A. Y.; ZAKI, M. S. Nutritional evaluation of *Moringa oleifera* fodder in comparison with *Trifolium alexandrinum* (berseem) and impact of feeding on lactation performance of cows. *Life Sci. J.*, v. 11, p. 1040-1054, 2014.
- KHOLIF, A. E.; GOUDA, G. A.; MORSY, T. A.; SALEM, A. Z. M; LOPEZ, S.; KHOLIF, A. M. *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. *Small Rumin. Res.*, v. 129, p. 129-137, 2015.
- KHOLIF, A. E.; MORSY, T. A.; GOUDA, G. A.; ANELE, U. Y.; GALYEAN, M. L. Effect of feeding diets with processed *Moringa oleifera* meal as protein source in lactating Anglo-Nubian goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 217, p. 45-55, 2016.
- KHOLIF, A. E.; GOUDA, G. A.; OLAFADEHAN, M.; ABDO. M. Effects of replacement of *Moringa oleifera* for berseem clover in the diets of Nubian goats on feed utilisation, and milk yield, composition and fatty acid profile. *Animal*, v. 12, p. 964-972, 2017.
- KHOLIF, A. E.; GOUDA, G. A.; ANELE, U. Y.; GALYEAN, M. L. Extract of *Moringa oleifera* leaves improves feed utilization of lactating Nubian goats. *Small Rumin Res* v. 158, p. 69-75, 2018.

- KHOLIF, A. E.; GOUDA, G. A.; GALYEAN, M. L. ANELE, U. Y.; MORSY, T. A. Extract of *Moringa oleifera* leaves increases milk production and enhances milk fatty acid profile of Nubian goats. *Agroforestry Systems*. v. 93, n. 5, p 1877-1886, 2019.
- KIM, E.; GUAN, L.; LEE, S. Effects of flavonoid-rich plant extracts on in vitro ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. *Asian-Australas J Anim Sci*; v. 28, n. 4, p. 530-537, 2015. doi:10.5713/ajas.14.0692
- KUMAR, S.; PUNIYAA, K.; PUNIYTA, M.; DAGAR, S. S.; SIROHI, S. K.; SINGH, K.; GRIFFITH, G. W. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 1557-1566, 2009.
- LEONE, A.; FIORILLO, G.; CRISCUOLI, F.; RAVASENGHI, S.; SANTAGOSTINI L.; FICO, G.; BERTOLI, S. Nutritional characterization and phenolic profiling of *Moringa oleifera* leaves grown in Chad, Sahrawi refugee camps, and Haiti. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 18923-18937, 2015.
- LIN; M.; ZHANG, J.; CHEN, Z. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*, v. 47, p. 469-479, 2018. doi:10.1016/j.jff.2018.06.011.
- MADI, N.; DANY, M.; ABDOUN, S.; USTA, J. *Moringa oleifera* nutritious aqueous leaf extract has anticancerous effects by compromising mitochondrial viability in an ROS-dependent manner. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 35, p. 604-613, 2016.
- 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*, v. 105, p. 116-122, 2016. doi:10.1016/j.sajb.2015.12.007
- MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKE, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *The Animal Consortium*. v.1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.
- MATLOUP, O. H.; ELAWABA, M. A B.; HASSANBF, A.; HADHOUDAM, I.; KHATTABAM, S.A.; KHALELB, S.; SALLAMCA, M. A; KHOLIF, E. Performance of lactating Friesian cows fed a diet supplemented with coriander oil: Feed intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation, blood chemistry, and milk production. *Animal Feed Science and Technology*. v. 226, p. 88-97, 2017.
- MCSWEENEY, C.; MACKIE, R. Microorganisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. *Background Study Paper*, 2012.
- MEALE, S. J.; CHAVES, A. V., BAAH, J.; MCALLISTER, T. A. Methane Production of Different Forages in In vitro Ruminal Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 25, n. 1, p. 86-91, 2011. doi:10.5713/ajas.2011.11249.
- MENDIETA-ARAICA, B.; SPORNDLY, R.; SANCHEZ, N. R.; SPORNDLY, E. *Moringa (Moringa oleifera)* leaf meal as a source of protein in locally produced concentrates for dairy cows fed low protein diets in tropical areas. *Livestock Science*, v. 137, p. 0-17, 2011.
- MINATO, H.; ENDO, A; HIGUCHI, M. Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *J Gen Appl Microbiol*, v. 12, p. 39-52, 1966.

- MOULD, F. L.; KLIEM, K. E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R. M. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Anim Feed Sci Technol*, v. 31, n. 50, p. 123-124, 2005.
- MOLINA-BOTERO, I. C.; ARROYAVE-JARAMILLO, J.; VALENCIA-SALAZAR, S.; BARAHONA-ROSALES, R.; AGUILAR-PÉREZ, C. F.; BURGOS, A. A.; ARANGO, J.; KU-VERA, J. C. Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Anim Feed Sci Technol*, v. 251, p. 1–11, 2019.
- MOYO B, MASIKA PJ, HUGO A, MUCHENJE V. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Afr J Biotechnol*. v. 10, p. 12925–12933, 2011. doi:10.5897/AJB10.1599
- MOYO, B.; OYEDEMI, S. P.; MASIKA, P. J.; MUCHENJE, V. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat Science*, v. 91, p. 441-447, 2012.
- MOULD, F. L., KLIEM, K. E., MORGAN, R., MAURICIO, R. M. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 31-50, 2005.
- NASCIMENTO, J. A. ARAÚJO, K. L. G. V. EPAMINONDAS, P. S. Ethanol extracts of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 114, n. 2, p. 833–838, 2013.
- OLDONI, T. L. C.; MERLIN, N.; KARLING, M.; CARPES, S. T.; ALENCAR, S. M.; MORALES, R.; SILVA, E. A.; PILAUD, E. J. Bioguided extraction of phenolic compounds and UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. *Food Research International*, v. 125, n. 1-9, p.108- 127, 2019. doi:10.1016/j.foodres.2019.108647
- ONSARE, J. G.; ARORA, D. S. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol*. v. 118, p. 313–325, 2015.
- PARRA-GARCIA, A.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; GREINER, R.; BARBABOSA-PLIEGO; A.; CAMACHO-DIAZ, L. M.; SALEMET, A. Z. M. Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on ruminal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics in a steer model. *Environ Sci Pollut Res* v. 26, n.15, p. 15333–15344, 2019. doi:10.1007/s11356-019-04963-z
- PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, v.71, p. 1198–1222, 2010.
- PATRA, A. K.; SAXENA, J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr. Res. Rev.*, v. 22, p. 2204-219, 2009.
- PEDRAZA-HERNÁNDEZ, J. M.; ELGHANDOUR, M. M. Y.; KHUSRO; A.; CAMACHO-DIAZ, M. V., L. H; BARBABOSA-PLIEGO, A.; SALEMA, A. Z. M. Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleifera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment. *Journal of Cleaner Production*. v. 234, p. 779-786, 2019. doi:10.1016/j.jclepro.2019.06.126

- PERCHELLET, E. M.; MOUTASEB, H. U., MAKKAR, H. P. S.; PERCHELLET, P. Ability of tannins extracted from various tree leaves to inhibit the biomarkers of tumor promotion in mouse skin in vivo. *Int J Oncology*, v. 9, p. 801–809, 1996.
- POLLINI L, TRINGANIELLO C, IANNI F, BLASI F, MANES J, COSSIGNANI L. Impact of Ultrasound Extraction Parameters on the Antioxidant Properties of *Moringa Oleifera* Leaves. *Antioxidants (Basel)*. v. 9, n. 4, p.277, 2020 doi: 10.3390/antiox9040277. PMID: 32224892; PMCID: PMC7222185.
- REZAEIAN, M.; BEAKES, G. W.; PARKER, D. S. Distribution and estimation of anaerobic zoospore fungi along the digestive tracts of sheep. *Mycol Res*, v. 108, p. 1227-1233, 2004.
- RIEDL, K. M.; CARANDO, S.; ALESSIO, H. M.; MCCARTHY, M.; HAGERMAN, A. E. Antioxidant activity of tannins and tannin–protein complexes: assessment in vitro and in vivo. *American Chemical Society Symposium Series* v. 807, p.188–200, 2002.
- 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*, v. 66, p. 246-254, 2015. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.002
- SALEM, A. Z. M.; OLIVARES, M.; LÓPEZ, S.; GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; CAMACHO, L. M.; CERRILLO, S. M. A. Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. *Anim Feed Sci Technol.*, v. 170, p. 27–34, 2011.
- SALEM, A. Z. M.; RONQUILLO, M.; CAMACHO, L. M.; CERRILLO, S. M. A.; DOMÍNGUEZ, I. A.; BÓRQUEZ, J. L. Beneficial effects of plant extracts in ruminant nutrition: a review. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 82, n. 10, p. 1117-1121, 2012.
- SALEM, A. Z. M.; KHOLIF, A. E.; OLIVARES, M.; ELGHANDOUR, M. M. Y.; MELLADO, M.; ARECE, J. Influence of *S. babylonica* extract on feed intake, growth performance and diet in vitro gas production profile in young lambs. *Trop Anim Health Prod.* v. 46, p. 213–219, 2014.
- SAMANTA, S. K.; KANDIMALLA, R.; GOGOI, B.; DUTTA, K. N.; CHOUDHURY, P.; DEB, P. K.; TALUKDAR, N.C. Phytochemical portfolio and anticancer activity of *Murraya koenigii* and its primary active component, mahanine. *Pharm. Res.*, v. 129, p. 227-236, 2017. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.024
- SÁNCHEZ, N.R.; LEDIN, S.; LEDIN, I. Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different management regimes in Nicaragua. *Agroforest Syst.*, v. 66, p. 231–42, 2006. doi:10.1007/s10457-005-8847-y
- SANKHALKAR, S.; VERNEKAR, V. Quantitative and qualitative analysis of phenolic and flavonoid content in *Moringa oleifera* lam and *Ocimum tenuiflorum* L *Pharm. Res.*, v. 8, p. 16-21, 2016. doi:10.4103/0974-8490.171095
- SANTOS, E. T.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, C. F.; LOURDES P.G.; SOUZA-NETA, C.; GERIS, R. MARTINS, A. E. G; SANTANA, L. C.; BARBOSA, A.; HERYMÁ GIOVANE, O. SILVA, G. C.; FREITAS, M. P. F.; OLIVEIRA, F. F.; BATISTA, R. Antibacterial Activity of the Alkaloid-Enriched Extract from *Prosopis juliflora* Pods and Its Influence on in Vitro Ruminal Digestion. *Int J Mol Sci.*, v. 14, n. 4, p. 8496-8516, 2013. doi: 10.3390/ijms14048496

- SARWATT, S. V.; MILANG'HA, M. S.; LEKULE, F. P.; MADALLA N. *Moringa oleifera* and cottonseed cake as supplements for smallholder dairy cows fed Napier grass *Livest. Res. Rural Dev.*, v. 16, p. 12- 22, 2004. <http://www.lrrd.org/lrrd16/6/sarw16038.htm>
- SERADJ, A. R.; ABECIA, L.; CRESPO, J.; VILLALBA, D.; FONDEVILA, M.; BALCELLS, J. The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 197, p. 85-91, 2014.
- SHI, Y.; PRABAKUSUMA, A. S.; ZHAO, Q.; WANG, X.; HUANG, A. Proteomic analysis of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract provides insights into milk-clotting proteases *LWT-Food Science and Technology.*, v. 109, p. 289-295, 2019.
- SINGH, R. K.; TAFIDA, G. M. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* (lam) leaves extracts against some selected bacteria. *International. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*, v. 6, n. 9, iss. 1, p. 52-54, 2014.
- SINGH, R. K.; DEY, A., PAUL, S. S.; SATBIR, S.; PUNIAET, D. B. S. Associative effects of plant secondary metabolites in modulating in vitro methanogenesis, volatile fatty acids production and fermentation of feed in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Agroforest Syst.*, p.487, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00395-3>
- SOLIVA, C. R.; KREUZER, M.; FOIDL, N.; FOIDL, G.; MACHMULLER, A.; HESS, H. D. Feeding value of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation in vitro. *Anim Feed Sci Technol*, v. 118, p. 47–62, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.005>
- SOLTAN, Y. A.; HASHEM, N. M; MORSY, A. S. EL-AZRAK, K. M. NOUR, EL-DIN, A.; SALLAM, S. M. Comparative effects of *Moringa oleifera* root bark or monensin supplementation on ruminal fermentation, nutrient digestibility and growth performance of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 235, p. 189, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.021>
- SOUTO, J. S, BORGES, C.H.A.; MEDEIROS, W.P; LEONARDO, F.P.; SOUTO, P.C; SOUTO, L.S. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de moringa na germinação e no crescimento inicial da alface. *Agropecuária Científica no Semiárido.* v. 11, p. 56-60, 2015.
- SU, B.; CHEN, X. Current Status and Potential of *Moringa oleifera* Leaf as an Alternative Protein Source for Animal Feeds. *Front Vet Sci.*, v.7, n. 53, 2020. [doi:10.3389/fvets.2020.00053](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00053)
- SUN, B.; ZHANG, Y.; DING, M.; XI, Q.; LIU, G.; LI, Y.; LIU, D.; CHEN, X. Effects of *Moringa oleifera* leaves as a substitute for alfalfa meal on nutrient digestibility, growth performance, carcass trait, meat quality, antioxidant capacity and biochemical parameters of rabbits, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, p. 12678, 2017.
- THAMBIDURAI, Y.; SUDARSANAM, D.; H. SKMKIZHAKUDAN; J.K. Screening of bioactive compounds from marine sponges collected from Kovalam, Chennai. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, v.10, p. 231-236, 2017.
- TEIXEIRA, E. M. B.; CARVALHO, M. R. B.; NEVES, V. A.; SILVA, M. A.; PEREIRA, L. A Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. Leaves *Estelamar. Food Chemistry.*, v. 47, p. 57-58, 2014.

- TILOKE, C.; ANAND, K.; GENGAN, R. M.; CHUTURGOON, A. A. *Moringa oleifera* and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. *Biomed Pharmacother.*, v. 108, p. 457–466, 2018.
- UGBOGU, E. A; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; IKPEAZU, V. O., BUENDÍA, G.R; MOLINA, O.M.; ARUNSI, U.O.; EMMANUEL, O.; SALEM, A. Z. M. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *J. Clean. Prod.*, v. 213, p. 915-925, 2019. doi:10.1016/j.jclepro.2018.12.233
- VERMA, A. R.; VIJAYAKUMAR, M; MATHELA, C. S.; RAO, C. V. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology.*, v. 47, p. 2196-2201, 2009.
- VIBHUTE, V. M.; SHELKE, R. R.; CHAVAN, S. D.; NAGE, S. P. Effect of probiotics supplementation on the performance of lactating crossbred cows. *Vet World.*, v. 4, p. 557-561, 2011.
- VITTI, D. M.; NOZELLA, E. F.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C.; SILVA FILHO, J. C.; COSTA, C.; et al. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Anim Feed Sci Technol.*, v. 122, p. 123–33, 2005. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.007
- VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y., GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products.*, v. 44, p. 566-571, 2013.
- WALLACE, R. J.; MCEWAN, N. R.; MCINTOSH, F. M.; TEFEREDEGNE, B.; NEWBOLD, C. J. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Austral. J. Anim. Sci.*, v. 15, p.1458-1468, 2002.
- WANAPAT, M. Rumen manipulation to increase the efficient use of local feed resources and productivity of ruminants in the tropics. *Asian-Aust J Anim Sci.*, v.13, p. 59-67, 2000.
- WANG, L.; CHEN, X.; WU, A. Mini Review on Antimicrobial Activity and Bioactive Compounds of *Moringa oleifera*. *Medicinal Chemistry.*, v. 6, n. 9, p. 145-152, 2016. doi:10.4172/2161-0444.1000402
- WANG, D. L. Y.; GAO, Y.; DING, H.; LIU, S.; HAN, X.; GUI, J. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.*, v. 218, p. 152-158, 2017.
- WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin- containing plant materials on ruminant production—a review. *J. Sci. Food Agric.*, v. 53, p. 8093–8105, 2005. doi:10.1021/jf048053d
- WU, D.; CAI, Z. H.; WEI, Y. X.; ZHANG, C.; LIANG, G. L.; GUO, Q. G. A pesquisa avança em *Moringa* como um novo alimento para proteínas vegetais. *Chin J Anim Nutr.*, v. 2, n. 5, p. 503-11, 2013.
- YAGHOUBI, S. M. J.; GHORBANI, G.R.; RAHMANI, H. R.; NIKKHAH, A. In vitro manipulation of rumen fermentation by propolis flavonoids and monensin *J. Dairy Sci.*, v. 90, n. 1, p. 105-106, 2007.

CAPÍTULO II

EXTRATOS AQUOSOS DA FOLHA DE *Moringa oleifera* NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o efeito das extrações aquosas por maceração, decocção e infusão de folhas frescas ou secas de *Moringa oleifera* na digestibilidade *in vitro* e parâmetros fermentativos ruminais, bem como analisar a composição fitoquímica dos extratos de moringa. Para tanto, foi coletado o fluido ruminal de um bovino, fistulado no rúmen. Foram pesados 5 g de substrato (feno de alfafa) em cada erlenmeyer de 125 mL, aos quais foram adicionados 10 mL de fluido ruminal e 40 mL de solução tampão mineral. Os tratamentos consistiram em: controle, extrato obtido por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decocção da folha fresca (DF) e seca (DS); e infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), totalizando 7 tratamentos, com 3 repetições. Nos erlenmeyers foi adicionado 0,4 mL de extratos referente a cada tratamento, com exceção dos correspondentes aos controles. Os erlenmeyers foram saturados com CO₂, selados com rolhas de borracha, e colocado em uma incubadora a 39 °C, durante 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas dos compostos bioativos presentes em cada extrato aquoso das folhas de moringa. A concentração de todos os compostos bioativos, saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides quantificados foi maior quando utilizou-se folhas frescas ($P < 0,05$). Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante. Os extratos de moringa não influenciaram na digestibilidade da matéria seca *in vitro* e da fibra em detergente neutro, na concentração de amônia ruminal, na população de protozoários, no pH e nos ácidos graxos ($P > 0,05$). A extração dos compostos bioativos foi mais eficiente utilizando folhas frescas de *M. oleifera*, e somente os teores de flavonoides foram afetados pelos métodos de extração aquosa. Em relação à incubação, os parâmetros fermentativos não foram afetados pelos extratos.

Palavras-chave: decocção, digestibilidade, infusão, fitoquímicos, maceração.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the effect of aqueous extractions by maceration, decoction and infusion of fresh or dried leaves of *Moringa oleifera* on in vitro digestibility and ruminal fermentative parameters, as well as to analyze the phytochemical composition of moringa extracts. For this purpose, ruminal fluid from a bovine, fistulated in the rumen, was collected. 5 g of substrate (alfalfa hay) was weighed in each 125 ml conical flask, to which 10 ml of rumen fluid and 40 ml of mineral buffer solution were added. The treatments consisted of: control, extract obtained by maceration of fresh (MF) and dry (MS) leaves; decoction of fresh (DF) and dry (DS) leaves; and infusion of fresh (IF) and dry (IS) leaves, totaling 7 treatments, with 3 repetitions. Erlenmeyers were added 0.4 mL of extracts for each treatment, with the exception of those corresponding to controls. The elermeyers were saturated with CO₂, sealed with rubber stoppers, and placed in an incubator at 39 ° C for 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Qualitative and quantitative analyzes of the bioactive compounds present in each aqueous extract of the moringa leaves were carried out. The concentration of all bioactive compounds, saponins, flavonoids, tannins and quantified alkaloids was higher when fresh leaves were used (P <0.05). All extracts showed antioxidant activity. Moringa extracts did not influence in vitro dry matter and neutral detergent fiber digestibility, rumen ammonia concentration, protozoa population, pH and fatty acids (P > 0.05). The extraction of bioactive compounds was more efficient using fresh leaves of *M. oleifera*, and only the levels of flavonoids were affected by aqueous extraction methods. Regarding the incubation, the fermentative parameters were not affected by the extracts.

Keywords: decoction, digestibility, infusion, phytochemicals, maceration.

INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* vêm se sobressaindo como aditivo natural empregado na produção animal. É utilizada em muitos países como alimento e produtos alimentícios em função de elevada produção de biomassa em pouco tempo, possuir alto valor nutricional, antioxidantes e benefícios fitoquímicos (Falowo et al., 2018; Dong et al., 2019). As propriedades funcionais da moringa derivam de uma enorme variedade de compostos bioativos, também denominados de metabólitos secundários ou fitoquímicos (Falowo et al., 2018). Esses compostos possuem ação antibacteriana, antioxidante, anticoccidiana e anti-helmíntica. De modo geral, não são tóxicos e são reconhecidos por modificar o mecanismo fermentativo ruminal (Salem et al., 2014; Pedraza-Hernández et al., 2019).

Conforme Salem et al. (2014), os microrganismos ruminais podem metabolizar e utilizar determinadas concentrações dos compostos bioativos como fonte de energia, sem deixar resíduos nas produções. De acordo com Arowolo e He. (2018), os extratos podem melhorar a estabilidade do ambiente ruminal, assim como a degradação e fermentação de fibras, inibem o crescimento de determinadas bactérias, aumentam a disponibilidade e utilização de nutrientes, resultando no aumento da produção de produtos de origem animal. Neste sentido está a importância da moringa como aditivo podendo modificar o mecanismo fermentativo do rúmen sem deixar resíduos nos produtos de origem animal (Pedraza-Hernández et al., 2019).

Vários estudos comprovaram os efeitos positivos da inclusão do extrato aquoso de folhas frescas de *M. oleifera* na fermentação ruminal *in vitro* (Elghandour et al., 2018; Parra-García et al., 2019; Pedraza-Hernández et al., 2019). A utilização de técnicas *in vitro* deve se principalmente à sua facilidade de inclusão, repetibilidade, redução no uso de animais; assim como economia financeira (Getachew et al., 2005; Aderinboye et al., 2016).

Mesmo com a comprovação dos benefícios na utilização de extratos aquosos da moringa, e um dos fatores que influencia na composição dos compostos bioativos ser a forma de extração, ainda não se pode comprovar qual é a forma de extração mais eficiente para se obter a modulação da fermentação ruminal.

Neste contexto, objetiva-se analisar a composição fitoquímica das extrações aquosas por maceração, decocção e infusão de folhas frescas ou secas de *M. oleifera* e o

efeito dos extratos de moringa na digestibilidade *in vitro* e outros parâmetros fermentativos ruminais.

MATERIAL E MÉTODOS

EXTRATOS

Coleta das folhas de moringa

Folhas de plantas de *M. oleifera* foram coletadas aleatoriamente de várias árvores jovens e maduras, na Fazenda Experimental, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), MS, em outubro de 2018. As amostras foram identificadas taxonomicamente e espécimes representativos foram depositados no Herbário da UFGD.

As folhas coletadas foram lavadas em água corrente. O excesso de água foi removido e as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas a -20° C, para posterior realização do estudo dos extratos. Após o descongelamento em geladeira, parte das folhas foram secas previamente em estufa de circulação forçada de ar, a 45° C por 72h. As folhas secas foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, em peneira com crivos de 1 mm, para as avaliações qualitativas e quantitativas dos compostos.

Extrato aquoso

Foram realizados três métodos de extração, com as folhas frescas e secas de moringa: infusão, maceração e decocção. O início do processo foi o mesmo para todos os tratamentos. Foram pesados 76,86g (correspondente a 20g de MS) de folhas frescas de moringa e 22,49g (correspondente a 20g de MS) de folhas secas, ambas fracionadas em pequenos pedaços.

No processo de infusão foram adicionados 200 mL de água destilada fervente. Deixado descansar por 24h na incubadora a 30 °C e após, filtrado em filtro Whatman N° 1 (Vongsak et al., 2013).

Para a maceração foram adicionados 200 mL de água destilada fria. Batidos em liquidificador por 30 segundos e filtrado em filtro Whatman N° 1.

Na decocção adicionou-se 200 mL de água destilada fria. Foram fervidos a 100 °C por 30 min. Após esfriar por 30 min, foi realizada a filtração em filtro Whatman N° 1 (Vongsak et al., 2013).

O extrato resultante de cada método de extração foi armazenado em geladeira por 24 h para serem utilizados na incubação e congelados até a realização das análises qualitativas e quantitativas dos compostos bioativos.

Análises qualitativas

A presença de saponinas foi determinada utilizando-se a técnica descrita por Banso; Adeyemo (2006). Em tubos de ensaios foram adicionados 10 mL de água destilada. Pipetados três mililitros (3 mL) do extrato aquoso de moringa dentro do tubo. Em seguida, o tubo foi agitado em vortex durante 5 minutos e deixado em repouso durante 30 minutos. A formação de espuma indicou a presença de saponinas.

Para a detecção da presença de taninos foi utilizada metodologia descrita por Trease; Evans (1989). Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de extrato aquoso de moringa. Adicionados 5 mL de água destilada. Filtrou-se a solução utilizando papel de filtro Whatman N ° 42. Foi adicionado 1 mL de cloreto férrico a 0,1 % ao filtrado. A mudança de coloração para verde (esverdeado) indicou a presença de taninos.

A análise da presença de flavonoides foi realizada conforme Harborne (1998). Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de extrato aquoso e pipetadas algumas gotas de hidróxido de sódio 20%. Observou-se a mudança para coloração amarela, indicando a presença de flavonoides. Adicionadas algumas gotas de ácido acético e a mudança na coloração para incolor, confirma a presença de flavonoides.

Para a detecção de esteroides foi empregada a metodologia de Trease; Evans (1989). Foram adicionados 2 mL de extrato aquoso e 2 mL de anidrido acético nos tubos de ensaio. Em seguida, adicionados cuidadosamente 2 mL de H₂SO₄. A mudança de coloração violeta para azul ou verde indicou a presença de esteroides.

Os terpenoides foram detectados conforme descrito por Trease & Evans (1989). Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mL de extrato aquoso. Ainda foram adicionados aos poucos 2 mL de clorofórmio. Em seguida acrescentados 3 mL de H₂SO₄. A mudança para a coloração marrom avermelhada indicou a presença de terpenoides.

A análise qualitativa da presença de alcaloides foi de acordo com Harbone (1998). Foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico aquoso a 1% em 1 mL do extrato e agitados num banho de vapor. Então acrescentou-se 1 mL de água destilada, filtrando a solução em papel de filtro Whatman N° 42. Do filtrado foi retirado 1 mL para ser

tratado com 3 gotas do reagente de Mayer. A mudança de coloração para amarela indicou a presença de alcaloides.

A presença de compostos fenólicos foi detectada segundo Sofowora (1993). Foram adicionados 5 mL de extrato aquoso em um tubo de ensaio, juntamente com 10 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de amônio e 5 mL de álcool amílico concentrado. A solução ficou em repouso durante 30 minutos. Uma coloração verde azulada indicou a presença de fenol.

Análises quantitativas

Para a análise dos alcaloides foi realizada a metodologia descrita por Harborne (1973). Foram pesados 5g de extrato aquoso em um becker. Adicionados 200 mL de ácido acético a 10% em etanol. A amostra foi coberta com plástico insulfilm e em repouso por 4 h. Após este procedimento, foi filtrada com papel de filtro Whatman N° 42. O extrato ficou em banho maria até restar um quarto do volume original. Adicionadas 15 gotas de hidróxido de amônio concentrado ao extrato. A solução ficou em repouso cerca de 4 horas. Foi adicionado hidróxido de amônio diluído na solução e depois filtrada com papel de filtro Whatman N° 42. O resíduo foi seco e pesado, o resultado representa a quantidade de alcaloides.

A quantificação de saponinas foi de acordo com Obdoni; Ochuko (2002). Foram adicionados 20 mL extrato aquoso no becker. Em seguida foram adicionados 100 mL de etanol aquoso a 20%. A amostra foi aquecida em banho-maria por 4 horas a 55 ° C, e agitada ocasionalmente. Depois filtrada a amostra com papel filtro papel de filtro Whatman N° 42. No resíduo foi adicionado 200 mL de etanol a 20%. O extrato resultante ficou em banho-maria a 90 °C. Em um funil de separação foram adicionados 20 mL de éter dietílico aos extratos e agitados vigorosamente. A camada de água foi armazenada, a camada restante de éter descartada. Foi repetido o procedimento. Após a separação foram adicionados 60 mL de n-butanol. E adicionado 20 mL de cloreto de sódio a 5%. A solução remanescente foi aquecida e seca em banho-maria. O resíduo seco foi pesado, o resultado representa a quantidade de saponinas.

Os flavonoides foram quantificados segundo a metodologia de Edeoga et al., (2005). Foram pesados 10 g do extrato aquoso dentro de béquer. Adicionados 100 mL de metanol aquoso a 80%. Reextraindo 3 vezes utilizando a mesma quantidade de metanol. A solução foi filtrada usando papel de filtro Whatman N° 42 (125 mm). A solução foi colocada em cadinho previamente pesado e deixada em banho-maria até

secar por 4 horas. O resíduo seco foi pesado e o resultado representa a quantidade de flavonoides total.

A análise dos taninos foi realizada de acordo com Vetter; Barbosa, (1995). Para os taninos. Em um béquer 100 ml de água destilada foram adicionados a dois gramas do extrato. A solução foi mantida em banho-maria a 90 °C por uma hora. A mistura foi filtrada usando o papel Whatman N° 1 e o resíduo foi reextraído novamente. Os dois filtrados foram recolhidos em conjunto e deixados descansar. Água destilada foi adicionada a solução até 500 ml. Desta solução 100 mL foram transferidos para um béquer e adicionados 10 ml de formaldeído a 40% e 5 ml de ácido sulfônico concentrado, respectivamente. Toda a mistura foi submetida a refluxo durante 30 minutos e foi deixada esfriar. A mistura foi filtrada, seca e pesada. O resíduo representa a quantidade de taninos total.

Para a determinação do conteúdo fenólico total do extrato foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (Meda et al., 2005). Para tanto, a cada 100 mL de extrato em metanol (1g L^{-1}) foi adicionado 1,0 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (v/v 1:10). Depois de 3 min, foi adicionada 1,5 mL de uma solução saturada de Na_2CO_3 (2%). A mistura ficou em repouso por 30 min, e então a densidade óptica foi medida pela absorvância a 765 nm, usando um espectrofotômetro. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de ácido gálico preparada em 80% de metanol.

Os teores de flavonoides dos extratos foram determinados segundo Lin; Tang, (2007). A cada 500 μL de extrato em metanol (1g/L) foi adicionado 1,50 mL de etanol (95%); 0,10 mL de cloreto de alumínio - $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - (10%); 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 mol L^{-1}) e 2,80 mL de água destilada. Os tubos de ensaio com as amostras repousaram por 40 min em temperatura ambiente. Então, foi medida a absorvância a 415 nm, utilizando um espectrofotômetro. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de quercetina.

Os taninos condensados foram estimados conforme a metodologia adaptada de Maxson e Rooney (1972). As amostras foram misturadas com 5 mL do reagente vanilina-HCl (HCl concentrado a 8% em metanol e vanilina a 4% em metanol). Após 20 min de repouso a absorvância foi medida a 500 nm em um espectrofotômetro. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de quercetina. A determinação da concentração de taninos condensados foi realizada com base em uma curva padrão de catequina.

Quanto a atividade antioxidante os extratos foram analisados por TLC utilizando quercetina como comparação positiva. As placas foram diluídas em clorofórmio/metanol a 10% e, após secagem, foram nebulizadas com uma solução de 0,4 mmol L⁻¹DPPH em metanol. As células foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas em um fundo de coloração púrpura, indicando possível atividade antioxidante (Soler-Rivas et al., 2000).

A atividade de sequestrar radicais livres dos extratos aquosos de moringa foi determinada através do método de radicais livres 1,1-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Blois, 1958). Várias concentrações das amostras foram adicionadas a 2 mL de soluções de metanol DPPH (0,1 mM) preparadas diariamente. A mistura foi agitada e deixada repousar à temperatura ambiente no escuro por 30 min. A absorvância foi medida a 517 nm. O Butil-hidroxitolueno (BHT) foi usado como controle positivo. As concentrações das amostras para uma inibição de 50% de DPPH (IC₅₀) foram calculadas com base no gráfico de I% (percentagem de inibição) versus uma concentração da amostra em microgramas por mililitro ((µg/mL). A porcentagem de inibição (% I) foi calculada com a equação:

$$\% I = (A_0 - A)/A_0 \times 100,$$

Sendo que A₀ corresponde a absorvância de DPPH (controle) e A é a absorvância de cada amostra mais DPPH.

A atividade antioxidante foi calculada utilizando o método de eliminação de radicais azino-bis (ácido etil-benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) conforme a metodologia adaptada de Rufino et al. (2007). As amostras dos extratos (1,0 mg /mL) foram diluídas para concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg / mL em metanol. Para formar o radical cátion (ABTS), foram misturados 7,0 mM ABTS e 140 mM persulfato de potássio e mantido no escuro por 16 h em temperatura ambiente. Antes do uso, o ABTS +solução foi diluído para obter uma absorvância de 0,700 ± 0,05 a 734 nm com etanol (P.A.). Para análise da amostra, 3 mL de ABTS + solução foi adicionada a 30 µL de diferentes concentrações da amostra em metanol (5–250 µg / mL). Depois de 30 min, a absorvância foi obtida a 734 nm, utilizando espectrofotômetro. O valor de IC₅₀ foi calculado como a concentração da amostra necessária para limpe 50% dos radicais livres, representando graficamente o I% versus a concentração do extrato. A porcentagem de inibição foi calculada como

$$ABTS (\%) = (A_0 - A / A_0) \times 100,$$

Onde A₀ é a absorvância do controle e A é a absorvância das amostras.

EXPERIMENTO IN VITRO

Incubação

Utilizou-se a metodologia de incubação ruminal *in vitro* adaptada de Goering e Van Soest (1970). Antes de iniciar a incubação foi coletado o líquido ruminal de um bovino fistulado. O método de fermentação ruminal foi realizado em 96 erlenmeyer. Foram pesados 0,5 g de substrato (feno de alfafa) dentro de um saquinho de TNT (5x5 cm) em cada erlenmeyer de 125 mL, aos quais foram adicionados 10 mL de fluido ruminal juntamente a 40 mL de solução tampão mineral.

Tabela 1. Análise da composição do substrato (feno de alfafa) utilizado para fermentação *in vitro*.

Nutriente	Feno de alfafa
Matéria Seca	89,81
Matéria Mineral	9,10
Proteína Bruta	17,43
Extrato Etéreo	4,06
Fibra em Detergente Neutro	55,20
Fibra em Detergente Ácido	34,24

Os tratamentos consistiram em extratos aquosos de folhas de moringa obtidos por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decocção da folha fresca (DF) e seca (DS); infusão da folha fresca (IF) e seca (IS); e o tratamento controle, totalizando 7 tratamentos, com 3 repetições (rodadas de incubação). A quantidade de extrato foi de 0,4 mL por erlenmeyer (correspondendo a uma dose diária de 80 mL por animal por dia), adicionando-se o mesmo volume de água ao tratamento controle. Esse procedimento foi realizado com constante aspensão de CO₂ e, imediatamente após a inoculação, os frascos foram selados com rolhas de borracha.

As amostras foram incubadas na BOD a 39° C, por um período de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Após a incubação, os frascos foram colocados no gelo. Em seguida foi realizada a mensuração do pH. Foi transferido 1 mL da solução para eppendorf, ao qual foi adicionado 1 mL de formaldeído (37%) e armazenado em refrigerador para contagem de protozoários. Foram transferidos 2 mL para eppendorf, contendo 20µL de ácido sulfúrico (50%), e congelado para análise de AGV. O restante do líquido foi congelado para posterior avaliação de amônia.

Os saquinhos retirados dos erlenmeyers foram lavados com água destilada até a água ficar transparente. Os saquinhos foram colocados na estufa de temperatura 65°C por 24 h e posteriormente na estufa de 105 por 2 h e pesados.

A estimativa de digestibilidade foi calculada pela diferença no peso dos saquinhos antes e após a incubação. Também foram realizadas análises de fibra em detergente neutro (FDN), segundo técnica descrita por Van Soest et al. (1991) com os saquinhos provenientes da fermentação *in vitro*, para o cálculo da digestibilidade da FDN. A análise de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal foi realizada segundo técnica descrita por Fenner (1965), e adaptada por Vieira (1980) e a contagem de protozoários conforme descrito por Debority (1984) adaptada por D' Agosto e Carneiro (1999).

Para as análises de AGV as concentrações de etanol e dos ácidos acético, propanoico, butírico, valérico e isovalérico nas amostras foram determinadas por cromatografia gasosa através de um cromatógrafo Shimadzu© GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax-DA™ (30m, 0,25mm ID, 0,25µm df,) e detector de ionização de chama (FID), após acidificação das mesmas com 1 M de ácido o-fosfórico p.a. e fortificação com mistura de ácidos voláteis livres. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 250°C e 300°C e temperatura inicial da coluna de 40 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste à velocidade linear de 42 cm s⁻¹ e WSFA-2 como padrão interno (Del Valle et al., 2018).

As concentrações de etanol e dos ácidos acético, propanoico, butírico, valérico e isovalérico nas amostras foram determinadas por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo Shimadzu© GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax- DA™ (30m, 0,25mm ID, 0,25µm df) e detector de ionização de chama (FID), após acidificação das mesmas com 1 M de ácido o-fosfórico p.a. e fortificação com mistura de ácidos voláteis livres. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 250°C e 300°C e temperatura inicial da coluna de 40 °C. Utilizando hélio como gás de arraste à velocidade linear de 42 cm.s⁻¹. Utilizando WSFA-2 como padrão interno.

ESTATÍSTICA

A avaliação dos extratos foi conduzida em um delineamento de blocos ao acaso, onde cada repetição do processo de extração consistiu em um bloco, em esquema fatorial 2 x 3, sendo dois efeitos de folha (secas e frescas) e três métodos de extração

(infusão, decocção e maceração). As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico SAS PROC GLM, considerando o efeito de folhas (secas e frescas), métodos de extração (infusão, decocção, maceração) e interação entre métodos e folhas. A diferença de médias foi testada pelo teste de Tukey, considerando 5% de probabilidade.

Para avaliação dos dados da incubação *in vitro* foi utilizado delineamento em blocos ao acaso, considerando cada rodada de incubação como um bloco, em esquema fatorial com tratamento adicional $2 \times 3 + 1$, sendo dois efeitos de folha (secas e frescas) e três métodos de extração (infusão, decocção, maceração), mais o tratamento controle. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico SAS PROC GLM, considerando o efeito de folhas (secas e frescas), métodos de extração (infusão, decocção, maceração) e interação entre métodos e folhas. A diferença de médias foi testada pelo teste de Tukey, considerando 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Compostos bioativos e antioxidantes dos extratos

De acordo com os testes analíticos, todas as extrações aquosas da folha de moringa apresentaram os compostos bioativos: compostos fenólicos, terpenoides, saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides e esteroides. Todos os extratos apresentaram atividades antioxidantes DPPH e ABTS.

A composição de saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides foi afetada pela condição das folhas (secas ou frescas), com exceção dos flavonoides mg CE/100g). Os flavonoides (mg/100 mL) e ABTS foram influenciados pelos métodos de extração. Já a atividade antioxidante foi influenciada pela condição da folha.

Tabela 2. Compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos obtidos de folha secas e frescas em função do método de extração.

	Seca			Fresca			EPM	P-value		
	Maceração	Infusão	Decocção	Maceração	Infusão	Decocção		Folha	Método	F*M
Saponinas (mg/100 ml)	1,73	1,74	1,76	5,11	5,16	5,14	0,066	< 0,01	0,70	0,86
Flavonóides (mg/100 ml)	4,09	4,27	4,18	12,14	12,56	12,41	0,079	< 0,01	<0,01	0,07
Flavonóides (mg CE/100g)	24,02	23,80	21,20	19,00	25,0	23,04	0,067	0,43	<0,05	0,08
Taninos (mg/100 ml)	8,29	8,55	7,99	22,41	23,05	21,46	0,071	< 0,01	0,08	0,50
Taninos condensados (mg CAE/100g)	6,00	6,79	5,39	7,98	8,00	7,75	0,086	<0,05	0,48	0,68
Alcalóides (mg/100 ml)	3,57	3,53	3,54	10,42	10,25	10,41	0,075	< 0,01	0,06	0,20
Fenois totais (mg TAE/100g)	100,10	102	98,00	105,00	108,95	104,00	0,069	< 0,01	0,08	0,86
DPPH (IC₅₀ µg/mL)	51,00	50,58	48,00	57,00	57,13	55,05	0,087	< 0,01	0,97	<0,05
ABTS (IC₅₀ µg/mL)	68,00	55,25	53,00	79,00	60,12	50,20	0,097	< 0,05	< 0,01	<0,05

EPM: Erro padrão da média. F: folha; M: método.

Incubação *in vitro*

Os extratos de moringa não influenciaram na digestibilidade da matéria seca. Foi observado que os tratamentos tiveram o mesmo comportamento em relação ao período de incubação. Houve um aumento da digestibilidade da MS ao longo das horas de incubação (Figura 1).

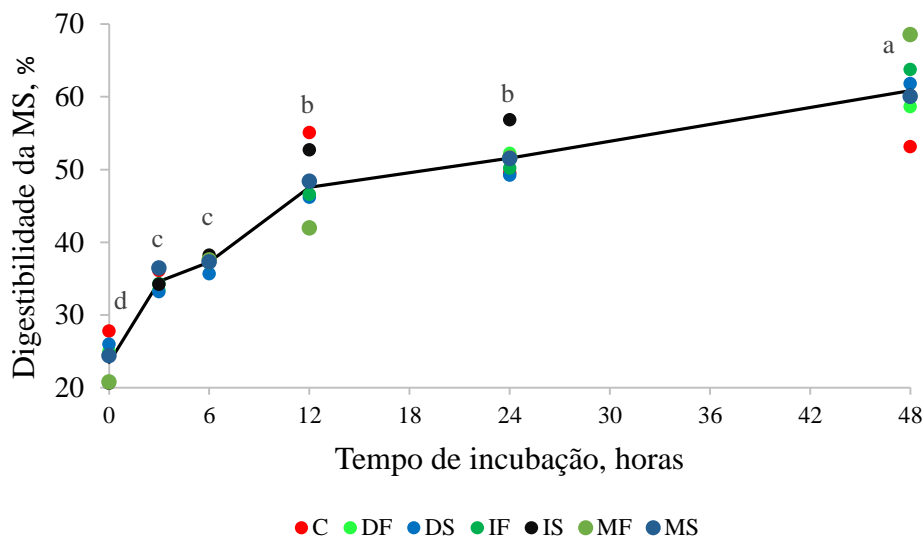


Figura 1. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca de alfafa com inclusão de extratos aquosos de folhas de moringa obtidos por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decoção da folha fresca (DF) e seca (DS); infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), e controle (C). Efeito de condição da folha $P = 0,8765$, efeito de método de extração $P = 0,4820$, efeito de interação entre condição da folha e método de extração $P = 0,8071$. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A digestibilidade *in vitro* da FDN não foi afetada pela presença dos extratos aquosos, utilização de folhas frescas ou secas, métodos de extração e interação entre a condição da folha e o método de extração. Entretanto, à medida que as amostras ficaram incubadas, todos os tratamentos foram influenciados pelas horas de incubação. Os valores de FDN aumentaram, em média, de 16,53% em 0 h para 28,96% a partir das 3 h, aumentando novamente até o período final de incubação para 46,19 % (Figura 2).

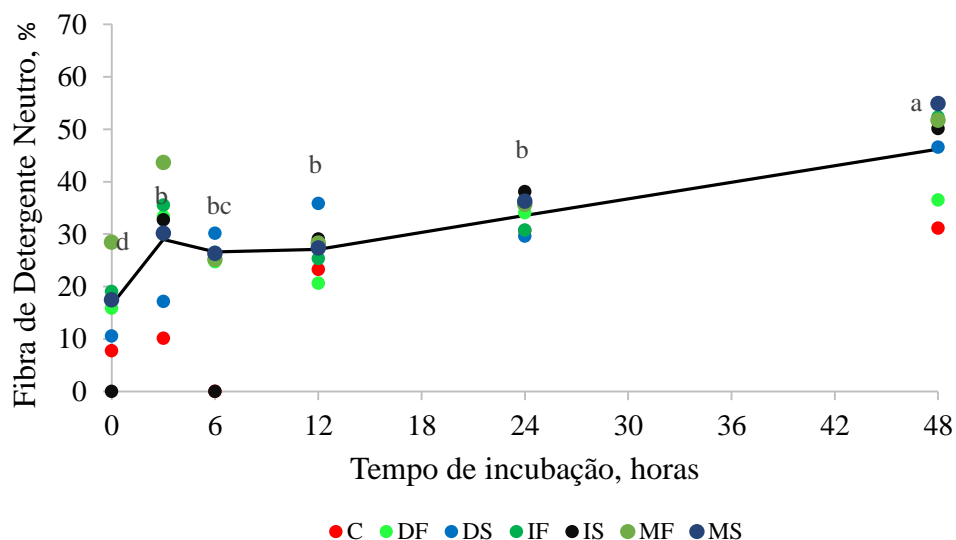


Figura 2. Digestibilidade in vitro da FDN de alfafa com inclusão de extratos aquosos de folhas de moringa obtidos por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decoção da folha fresca (DF) e seca (DS); infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), e controle (C). Efeito de condição da folha $P = 0,8071$, efeito de método de extração $P = 0,0758$, efeito de interação entre condição da folha e método de extração $P = 0,6312$. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Durante a incubação, o pH não foi influenciado pela presença dos diferentes extratos aquosos de moringa. No entanto, o valor do pH foi afetado pelas horas de incubação in vitro, diminuindo, em média, de 6,82 para 6,59 (Figura 3).

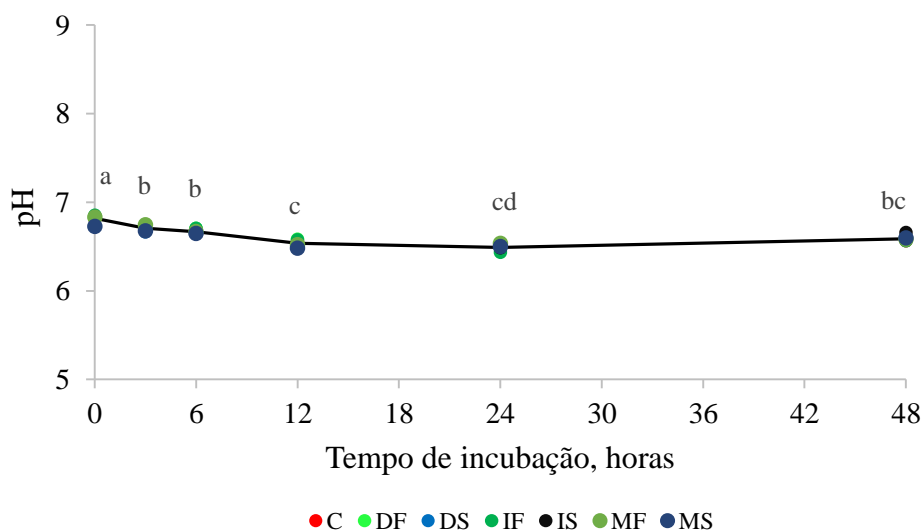


Figura 3. Valores de pH durante a incubação in vitro com inclusão de extratos aquosos de folhas de moringa obtidos por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decoção da folha fresca (DF) e seca (DS); infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), e controle (C). Efeito de condição da folha $P = 0,2918$, efeito de método de extração $P =$

0,7858, efeito de interação entre condição da folha e método de extração $P = 0,4364$. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados, não houve diferença nos níveis de amônia ruminal entre as amostras incubadas com extrato aquoso de *M. oleifera*. Ao longo do período de incubação, a concentração de amônia foi afetada pelo tempo de incubação in vitro. Os tratamentos aumentaram, em média, de 0,72% até 0,98% às 3 h de incubação e 1,00% às 6 h, diminuindo e se estabilizando em torno de 0,98% até o final do período experimental com 0,95% (Figura 4).

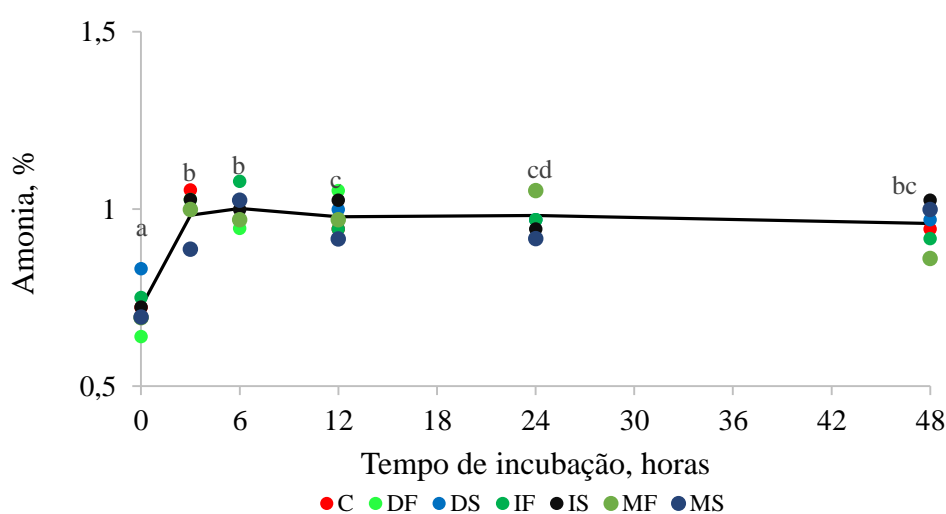


Figura 4. Valores da amônia durante a incubação in vitro com inclusão de extratos aquosos de folhas de moringa obtidos por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decoção da folha fresca (DF) e seca (DS); infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), e controle (C). Efeito de condição da folha $P = 0,4678$, efeito de método de extração $P = 0,2749$, efeito de interação entre condição da folha e método de extração $P = 0,5026$. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A população de protozoários não foi afetada pelos diferentes métodos de extração de moringa. No entanto, foi observada alteração na população de protozoários ao longo do tempo de incubação. A contagem inicial (0 hora de incubação) foi de $3,71 \times 10^4$, aumentou com 6 horas de incubação ($4,17 \times 10^4$) e reduziu com 12 h, mantendo a média de $4,02 \times 10^4$ até 48 horas de incubação (Figura 5).

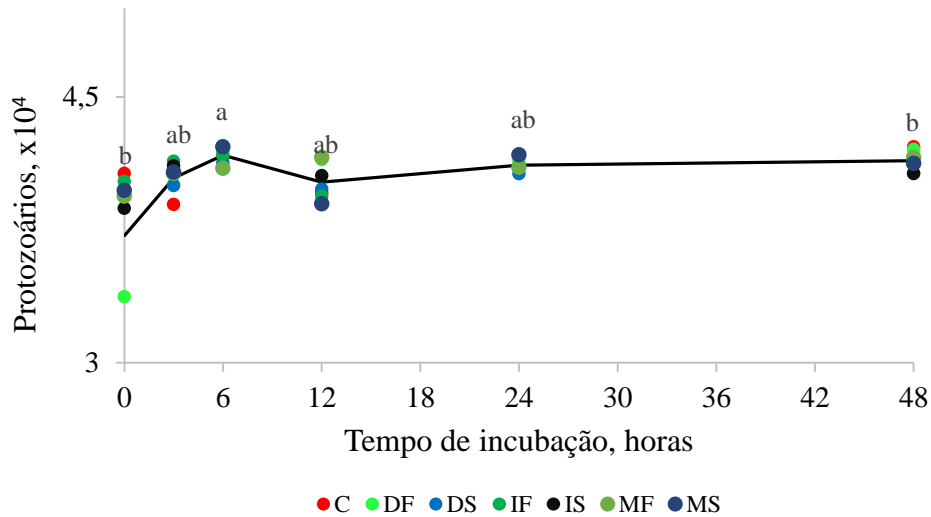


Figura 5. População de protozoários da incubação in vitro com inclusão de extratos aquosos de folhas de moringa obtidos por maceração da folha fresca (MF) e seca (MS); decoção da folha fresca (DF) e seca (DS); infusão da folha fresca (IF) e seca (IS), e controle (C). Efeito de condição da folha $P = 0,4203$, efeito de método de extração $P = 0,1270$, efeito de interação entre condição da folha e método de extração $P = 0,5897$. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

ÁCIDOS GRAXOS

A utilização dos extratos aquosos de moringa não influenciou nos ácidos graxos analisados da incubação.

Tabela 3. Ácidos graxos voláteis em 24 h de incubação com extratos aquosos de moringa.

	Controle	Seca			Fresca			EPM	P-value		
		Maceração	Infusão	Decocção	Maceração	Infusão	Decocção		Folha	Metodo	F*M
Acetato, mM	9,49	10,21	9,03	10,65	17,01	14,95	13,36	3,120	0,02	0,71	0,64
Propionato, mM	3,37	4,69	3,83	4,13	7,26	5,45	5,41	1,437	0,07	0,40	0,81
Butirato, mM	1,10	1,19	0,86	1,10	1,78	1,49	1,54	0,389	0,04	0,55	0,93
Isovalérico, mM	0,22	0,24	ND	0,24	0,20	0,24	0,23	0,030	0,57	0,73	0,69
Valérico, mM	ND	0,27	ND	ND	0,21	0,27	0,20	0,003	0,05	0,07	ND
Total, mM	14,19	16,47	13,71	16,00	26,35	22,15	20,53	4,871	0,03	0,56	0,73
Acetato, %	66,88	62,16	65,00	66,47	64,57	67,58	65,50	2,908	0,45	0,35	0,64
Propionato, %	23,77	28,45	28,87	26,03	27,50	24,70	25,90	3,595	0,43	0,74	0,71
Butirato, %	7,78	7,19	6,14	6,78	6,75	6,72	7,49	0,656	0,48	0,34	0,44
Isovalérico, %	1,56	1,59	ND	1,42	0,76	0,95	1,41	0,567	0,47	0,92	0,57
Valérico, %	ND	1,22	ND	ND	0,81	1,05	0,81	0,032	0,06	0,15	ND
Acetato:Propionato	2,82	2,18	2,33	2,59	2,37	2,74	2,55	0,417	0,46	0,58	0,75

EPM: Erro Padrão da Média; ND: Não detectável. F: folha; M: método.

DISCUSSÃO

Compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos

A concentração dos compostos metabólitos quantificados foi influenciada pelas folhas secas e frescas, com exceção dos flavonoides. Em geral, são vários os fatores que podem influenciar sua concentração, como as condições ambientais, época de colheita, genética da planta, método de secagem, estágio de maturação das folhas, método de extração utilizado e as diferentes sensibilidades dos métodos utilizados para sua análise (Leone et al., 2015). Nesse estudo, a utilização das folhas frescas comparada à secagem das folhas foi responsável pela diferença observada.

Nobósse et al. (2018), avaliando o conteúdo fitoquímico de extrato aquoso de folhas frescas de *M. oleifera* observaram que o conteúdo fenólico total variou entre 2,1 e 3,6 g GAE/100 g MS e o conteúdo de flavonoides variou entre 0,9 e 1,0 g CE/100 g MS conforme a idade das folhas. Já no trabalho de Nwidu et al. (2018), o conteúdo fenólico foi de 165,2 mg GAE/g e o conteúdo de flavonoides foi de 27 mg QUER E/g.

Em relação a experimentos com extrato aquoso de moringa para ruminantes, Kholif et al. (2018) utilizaram como método de extração inicialmente a infusão: 1 kg de matéria seca de folha/8 L de água destilada, a 25-30 °C por 72 h, seguida por decocção: aquecimento a 39 °C por 1 h, e o extrato foi armazenado a 4 °C. Na composição dos extratos, os autores fizeram análises da proporção de taninos e compostos fenólicos totais, com 2,75 g/L e 6 g/L, respectivamente. Os resultados dos diferentes estudos demonstram diferenças quanto aos teores de fitoquímicos de extratos aquosos de moringa, que podem ser atribuídas a diversos fatores, incluindo as diferenças entre os métodos, temperatura e região de cultivo.

Segundo Sultana et al. (2014), o conteúdo de fitoquímicos na folha de *M. oleifera* pode variar dependendo da base genética da planta, como a cultivar e o ambiente de cultivo. Nossos resultados indicaram a presença de taninos e saponinas, principais compostos que podem ser utilizados como aditivos alimentares em animais. Porém, esses compostos, dependendo da concentração, podem resultar na diminuição da palatabilidade e na redução do consumo de ração em ruminantes (Sultana et al., 2014).

Por isso, a importância de utilizar as extrações aquosas, a qual visam diminuir os fatores antinutricionais relativamente elevados das folhas, sendo utilizados diversos processamentos, tanto para reduzir o teor de antinutrientes, quanto para melhorar a palatabilidade (Su: Chen, 2019), como a secagem, maceração, infusão e decocção. Os resultados demonstraram que em folhas secas o conteúdo de taninos foi significativamente

menor comparado às folhas frescas. De acordo com Vitti et al. (2005), a secagem é um processamento que pode reduzir os taninos em 15 a 30% em comparação com a folha fresca. Quanto à presença de saponinas no extrato, que pode fornecer um sabor amargo, as quantidades baixas presentes não causam nenhum efeito adverso em ruminantes (Moyo et al., 2011). No entanto, devido à variação dos teores destes compostos pode ser indicado reduzir a quantidade através de processamentos da folha.

A vantagem da fervura é a redução de inibidores de protease, lectinas e saponinas das folhas de *M. oleifera*. A cocção também pode diminuir o teor de taninos devido à oxidação e à menor solubilidade, consequência de seu maior grau de polimerização (Delfino & Canniatti-Brazaca, 2010; Souza et al., 2019). Quanto à secagem, além de melhorar a qualidade nutricional das folhas, diminui a quantidade de fitato, oxalato e saponina. Porém, são encontrados resultados divergentes em relação a essas informações, como no estudo de Mbah et al. (2012), em que foi observado aumento do conteúdo de taninos após a secagem. No trabalho de Vitti et al. (2005) foi observada diminuição significativa com a secagem ao sol e ao forno em relação ao conteúdo de tanino. As divergências podem ser ocasionadas devido à temperaturas diferentes, a qual também afeta o conteúdo de taninos, pelo fato de ser um composto fenólico.

As concentrações de fitoquímicos são afetadas pela temperatura, pois temperaturas muito altas degradam os fenóis, enquanto temperaturas moderadas facilitam a abertura das células, aumentando as transferências de massa, que resultam na liberação dos compostos fenólicos (Matshedis et al., 2015).

A atividade antioxidante também é influenciada pela maior concentração de compostos fenólicos. Matshedis et al. (2015) relataram que, com o aumento da temperatura, os extratos de moringa tiveram maior atividade redutora, podendo ser atribuído à quantidade variada dos teores de fitoquímicos. Outro fator importante é o tempo de fervura, no qual o menor tempo resulta em concentrações mais altas do conteúdo fenólico, e em tempo prolongado resulta em menores teores fenólicos recuperados.

Os compostos encontrados nos extratos aquosos de *M. oleifera*, fenóis, taninos e flavonoides, como quercetina, catequina, ácido tânico e ácido gálico, apresentam atividades biológicas e antioxidantes (Su, Chen, 2019). De acordo com Nobósse et al. (2018), a atividade de eliminação de DPPH de extratos de folhas de *M. oleifera* está fortemente relacionada à presença de clorofila e flavonoides. Já o radical ABTS, por outro lado, é principalmente eliminado por polifenóis totais, clorofila e flavonoides. Tanto o DPPH quanto o ABTS são radicais livres usados para avaliar a atividade de eliminação de radicais. Porém, o DPPH é

eliminado através da transferência de hidrogênio do antioxidante, enquanto o ABTS através da transferência de elétrons. Por este motivo, os resultados de antioxidantes são diferentes entre as análises de ABTS e DPPH.

Os altos teores de fenóis e flavonoides afetam a capacidade antioxidante dos extratos de folhas secas e frescas de moringa. A capacidade de transferência de hidrogênio e a natureza lipofílica dos flavonoides e da clorofila justificam sua alta contribuição para a capacidade de eliminação do DPPH. Os compostos fenólicos são hidrofílicos ou lipofílicos, dependendo de sua estrutura, resultando na sua alta capacidade de eliminar o radical ABTS. Os elevados níveis de atividade antioxidante atribuídos aos compostos fenólicos sugerem que eles podem ser usados como suplementos para prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo em animais (Xu, Chen; Guo, 2019; Nobósse et al., 2018).

De acordo com Rodríguez-Pérez et al. (2015), o conteúdo de compostos fenólicos das folhas de *M. oleifera* varia com o método de extração, bem como o solvente utilizado. Os métodos utilizados no trabalho, porém, afetaram somente os teores de flavonoides. Em outro experimento, que considerou a influência do método de extração para os teores de compostos, visando otimizar a extração de flavonoides das folhas da moringa, demonstrou a importância dos seguintes fatores: proporção de solvente de extração para o material de folhas (mL/g), temperatura de extração e tempo de extração (Hamed et al., 2019). Ainda, os teores antinutricionais das plantas podem ser diferentes conforme o método de análise empregado.

O conteúdo elevado de fitoquímicos observados podem ser atribuídos ao ambiente, sendo considerado como fator influenciador o estresse sofrido pela planta, devido às variações de temperatura da região, e principalmente devido ao ataque de predadores, resultando no aumento dos teores dos compostos nas folhas de moringa.

O cultivo de *M. oleifera* está crescendo no país e muitos agricultores têm investido em sua produção. Em geral, as mesmas espécies de plantas podem diferir em conteúdo nutricional e compostos bioativos, dependendo da região em que são cultivadas (Granella et al., 2020). Por conta das influências de diversos fatores na composição fitoquímica da moringa, enfatiza-se a importância das análises desses fitoquímicos.

Incubação

No trabalho de Parra-Garcia et al. (2019), a inclusão do extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* na dieta não afetou a digestibilidade de MS. Entretanto, afetou positivamente a fermentação ruminal in vitro no maior nível de substituição de grãos de milho por casca de soja. Com exceção do pH, que aumentou em nível mais alto de adição do extrato, a interação

do tipo de dieta e dos níveis de extrato demonstrou ter um efeito positivo em todos os parâmetros de fermentação.

A atividade antimicrobiana dos fitoquímicos são diferentes entre os compostos, ainda em sua concentração inibitória mínima para os microrganismos ruminais, e na sensibilidade à ação fitoquímica entre as espécies microbianas (Bodas et al., 2012). Portanto, as concentrações encontradas na dose dos extratos utilizados podem não ter sido adequadas para efeito nas populações microbianas ruminais do experimento, por serem mais elevadas.

De acordo com Bodas et al. (2012) deve ser considerado os efeitos desses compostos no ambiente ruminal, que são modulados pelo pH ruminal, pela dieta na qual estão incluídos e pelos métodos de preparo e extração dos compostos (Patra; Saxena, 2009). Assim, na utilização do extrato aquoso da moringa para ruminantes, torna-se necessário considerar os fatores relacionados aos animais, como espécie, idade e condição fisiológica.

Nesse estudo, os extratos não influenciaram os valores de pH, mantendo sempre valores considerados dentro da faixa adequada de pH ruminal. Os ácidos graxos avaliados também não foram influenciados pelos extratos de moringa. Em outro experimento *in vitro*, a adição do extrato aquoso fresco de folhas de *M. oleifera* às dietas resultou em uma diminuição na produção de metano e um aumento na produção de CO₂ sem afetar os demais parâmetros fermentativos (Elghandour et al., 2018). Os pesquisadores também atribuem aos metabólitos secundários os efeitos na produção de metano e defendem que haja mais algum componente ativo presente no extrato que ainda não foi mencionado. Porém, nesse experimento, não foram realizadas análises da composição fitoquímica do extrato. A diferença entre os trabalhos pode estar relacionada com a composição dos extratos.

Apesar dos compostos não afetarem os parâmetros fermentativos analisados, foram detectadas a presença de saponinas, taninos, alcaloides, terpenoides, esteroides e flavonoides, além de quantificada a concentração destes em cada extrato aquoso. Enfatiza-se que o modo de ação de diferentes compostos bioativos varia e há pouca informação sobre combinações desses compostos como moduladores da fermentação ruminal, que poderiam afetar alguns, ou individualmente, parâmetros - em doses baixas - sem influenciar na digestibilidade dos alimentos (Singh et al., 2019).

Segundo Singh et al. (2019), a influência dos taninos e saponinas, em parâmetros da fermentação ruminal, dependem da dose do extrato utilizada, ou seja, a sua concentração, e da estrutura química do composto, como de taninos condensados e não condensados. No entanto, a maioria das pesquisas realizadas com extratos aquosos de moringa em ruminantes não

informam as concentrações de tais compostos bioativos para efeito positivo na fermentação ruminal.

Ressalta-se que as demais pesquisas realizadas até o momento com o extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* em ruminantes, atribuem os efeitos observados aos compostos bioativos, enquanto analisam dentre os metabolitos apenas os taninos e compostos fenólicos ou não identificam os compostos presentes nos extratos. Kholif et al. (2018) observaram melhora na fermentação ruminal com a utilização de extrato aquoso de folhas frescas da moringa, nas maiores doses do experimento, 20 mL e 40 mL. No extrato foi quantificado que havia 2,75 g de taninos e 6 g de fenólicos totais por litro. A diferença nos resultados pode ser atribuída à composição e aos teores dos fitoquímicos nos extratos de folhas frescas e secas. Fatores como atividade biológica dos compostos também devem ser considerados pois, além da concentração, a identificação de quais taninos, saponinas e compostos fenólicos estão presentes e influenciam os resultados da fermentação ruminal. Por exemplo, a atividade biológica de saponinas de distintas partes morfológicas da moringa pode diferir, e pequenas diferenças na estrutura podem alterar consideravelmente as atividades biológicas em animais (Livingston et al., 1977; Best et al., 2017). É recomendado a identificação dos compostos de extratos em estudos posteriores, já que os fitoquímicos extraídos pelos métodos utilizados podem não ser os mais eficazes para a modulação da fermentação.

Os efeitos antiprotozoários são inerentes nas saponinas, dependendo de pequenas mudanças em sua estrutura. Desse modo, as saponinas presentes nos extratos aquosos de moringa podem não ser as que afetam significativamente a população de protozoários. Por exemplo, sapogeninas como o ácido asiático e o ácido madecássico têm mais capacidade de inibição de protozoários do que outras saponinas correspondentes. Portanto, mais pesquisas são necessárias para entender o efeito das saponinas e a natureza de sua atividade antiprotozoária para desenvolver formas eficazes de uso.

Os teores de taninos são importantes para justificar os resultados, somados à identificação dos taninos presentes, que também podem não ser os principais responsáveis pela modulação da fermentação ruminal. Nos taninos, do mesmo modo que as saponinas, além da concentração, é necessário conhecer a natureza química do composto. Os efeitos dos taninos dependem dos teores e da reatividade desses compostos, que deriva de sua natureza química (Bueno et al., 2008; Rodriguez et al., 2015). A mesma concentração de taninos de plantas diferentes pertencentes a mesma espécie, bem como de distintas partes morfológicas da mesma planta pode produzir efeitos de magnitude diferente (Bueno et al., 2008). Alguns pesquisadores observaram que o consumo de saponinas e taninos por cordeiros aumentou a

digestibilidade de N, sendo esta resposta dependente da concentração e do tipo de fitoquímicos (Owens et al., 2012).

Os efeitos sob populações de bactérias são geralmente provocados por taninos hidrolisáveis e condensados. Porém, a associação dos tipos de taninos com os microrganismos ruminais é diferente, pois o tanino hidrolisável é mais suscetível à hidrólise microbiana do que o tanino condensado (McSweeney et al., 2001). Segundo Bodas et al. (2012), os efeitos dos taninos são bastante diferentes das suplementações de tanino em relação à mitigação de CH₄. Tais diferenças estão relacionadas com a dosagem ideal e composição química desses compostos.

A composição dos metabólitos nos extratos pode ser responsável pelos resultados obtidos. É preciso considerar os fatores relacionados à composição do extrato, como maturidade das folhas, métodos de extração, condições ambientais, utilização das folhas secas ou frescas, entre outros, bem como os animais, que incluem o doador do líquido ruminal, e a dieta experimental, visto que esses fatores podem influenciar tanto nos teores de tais compostos, quanto no modo de ação dos compostos bioativos.

CONCLUSÃO

A extração dos compostos bioativos foi mais eficiente utilizando folhas frescas de *M. oleifera*. Somente os teores de flavonoides foram afetados pelos métodos de extração aquosa, sendo a infusão considerada a melhor forma de extração.

Em relação à incubação, os parâmetros fermentativos não foram afetados pelos extratos, devido a concentração dos compostos nos extratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERINBOYE, Y.; AKINLOLU, A. O.; ADELEKE, M. A.; NAJEEM, G. O.; OJO, V. O. A.; ISAH, O. A.; SLOVAK, O. J. B. In vitro gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocular *J. Anim. Sci.*, v. 49, n. 1, p. 32-43; 2016.

AROWOLO, M. A.; HE, J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: a review. *Anim. Nutr.*, v. 4, n. 3, p. 241-249, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.010>

BANSO, A. ADEYEMO S. Phytochemical screening and antimalarial assessment of *Abutilon mauritianum*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium* *Biokemistri*, v. 18, p. 39-44, 2006.

- BEST, D.A., LARA-LARA, P.E., AGUILAR-URQUIZO, E. *ET AL.* In vivo digestibility and nitrogen balance in sheep diets with foliage of fodder trees in substitution for soybean meal. *Agroforest Syst* v. 91, p. 1079–1085, 2017.
- BLOIS, MS., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 181, no. 4617, p. 1199-1200. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.
- BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plants secondary metabolites. *Anim. F. Sc. and Tec.*, v. 176, p. 78-93, 2012.
- BUENO, I. C. S., VITTI, D. M. S. S., LOUVANDINI, H. & ABDALLA, A. L. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, v.141, n. 1, p. 153–170, 2008. 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.011.
- DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. *Appl. Env. Micr.*, v 48, p. 182-185, 1984.
- DEL VALLE, T. A, ZENATTI T. F, ANTONIO G, et al. Effect of chitosan on the preservation quality of sugarcane silage. *Grass Forage Sci.* v. 73, p. 630–638. 2018; <https://doi.org/10.1111/gfs.12356>
- D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M. E.; Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Rev. Br. de Zoo.* v.16, p. 725-729, 1999.
- DEL VALLE TA, ZENATTI TF, ANTONIO G, ET AL. Effect of chitosan on the preservation quality of sugarcane silage. *Grass Forage Sci.* v. 73, p.630–638, 2018. <https://doi.org/10.1111/gfs.12356>
- DONG, L.; ZHANG, T.; DIAO, Q. Effect of dietary supplementation of *Moringa oleifera* on the production performance and fecal methanogenic community of lactating dairy cows. *Anim.*, v. 9, n.5. p. 262, 2019.10.3390/ani9050262
- EDEOGA, H. O., OKWU D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afr. Jour. of Biotec.*, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.
- ELGHANDOUR, M. M. Y.; RODRÍGUEZ-OCAMPO, I. A. PARRA-GARCIA, A. Z. M. SALEM, R. GREINER, O.; MÁRQUEZ-MOLINA, M.; BARROS-RODRÍGUEZ, A.; BARBABOSA-PILEGO, B. Biogas production from prickly pear cactus containing diets supplemented with *Moringa oleifera* leaf extract for a cleaner environmental livestock production *J. Clean. Prod.*, v. 185, p. 547-553, 2018.
- FALOWO, A. B.; MUKUMBO, F. E.; IDAMOKORO, E. M.; LORENZO, J. M.; AFOLAYAN, A. J.; MUCHENJE, V. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. In nutrition and animal food products: A review. *F. Res. Int.*, v. 106, p. 317-334, 2018.
- FENNER, H. Methods for determining total volatile base in rumen fluid by steam distillation. *J. Dairy. Sci.*, v. 48, n. 3, p. 249-251, 1965.
- GRANELLA, S. J.; BECHLIN, T. R., DIVAIRCHRIST, S., COELHO, R. M. CARLOS PAZ, H. O. An approach to recent applications of *Moringa oleifera* in the agricultural and biofuel industries *South African Journal of Botany* volume 137 2021, p.110-116, 2020.

- GETACHEW, G., DEPETERS, E. J., ROBINSON, P. H., FADEL, J. G. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. F. Sc. Tec.*, v. 123-124, p. 547–559, 2005.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analyses. 1th ed Washington, *Agric. Res. of Agric.*, 1970.
- HAMED; Y. S.; ABDIN, M.; AKHTAR, H. M. S.; CHEN, D.; WAN; P; CHEN, G.; ZENG, X. Extraction, purification by macrospores resin and in vitro antioxidant activity of flavonoids from *Moringa oleifera* leaves. *Sou. Afr. J. of Bot.* v. 124, p. 270-279, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.006>
- HANSEN, H.H.; EBEID, M. H , EL-BORDENY, N. E.; HASSAN, F U. In Vitro Evaluation of Moringa Whole Seed Cake as a Feed Ingredient to Abate Methane Emission from Ruminants *International journal of agriculture & biology*, p. 1814–9596 2020, 10.17957/IJAB/15.1380
- HASSAN FU, ARSHAD MA, EBEID HM, ET AL. PHYTOGENIC Additives Can Modulate Rumen Microbiome to Mediate Fermentation Kinetics and Methanogenesis Through Exploiting Diet-Microbe Interaction. *Front Vet Sci.* v. 7, 575-801. 2020
doi:10.3389/fvets.2020.575801
- HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, London, UK, 1973.
- HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods, A guide to Modern Techniques of Plant analysis, second ed. Chapman and Hall, London, p. 54-84, 1998.
- LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview *Int. J. Mol. Sci.*, v.16, p. 12791-12835, 2015.
- LIN, JY. AND TANG, CY., Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, v. 101, n. 1, p. 140-147. 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>.
- LIVINGSTON AL, WHITEHAND LC AND KOHLER GO, Microbiological assay for saponin in alfalfa products. *J Assoc Off Anal Chem* v. 60, p 957–960, 1977.
- KHOLIF, A. E.; GOUDA, G. A.; ANELE, U. Y.; GALYEAN, M. L. Extract of *Moringa oleifera* leaves improves feed utilization of lactating Nubian goats. *Small Rumin Res* v.158, p 69-75, 2018.
- OBADONI B; OCHUKO P. Phytochemical studies and comparative efficacy of the crude extracts of some haemostatic plants in Edo and Delta States of Nigeria. *GJPAS*, v. 8, p. 203-208, 2002.
- PARRA-GARCIA, A.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; GREINER, R.; BARBABOSA-PLIEGO; A.; CAMACHO-DIAZ, L. M.; SALEMET, A. Z. M. Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on ruminal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics in a steer model *Environ Sci Pollut Res*, v. 26, n. 15, p. 15333-15344, 2019.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04963-z>

- PATRA, A. K. SAXENA, J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production *Nutr. Res. Rev.*, v. n. 22, p. 2204-219, 2009.
- PEDRAZA-HERNÁNDEZ, J. M.; ELGHANDOUR, M. M. Y.; KHUSRO; A.; CAMACHO-DIAZ, M. V., L. H; BARBABOSA-PLIEGO, A.; SALEMA, A. Z. M. Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleifera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment. *Jour. of Cl. Prod.*, v. 234, p. 779-786, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.126>
- RAMOS-MORALES E, LYONS L, DE LA FUENTE G, BRAGANCA R, NEWBOLD C. Not all saponins have a greater antiprotozoal activity than their related saponinins. *FEMS Microbiol Lett.* v.366, p.144, 2019. 10.1093/femsle/fnz144
- 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 *Ind. Cr. and Prod.*, v. 66, p. 246-254, 2015. 10.1016/j.indcrop.2015.01.002
- SALEM, A. Z. M.; KHOLIF, A. E.; OLIVARES, M.; ELGHANDOUR, M. M. Y.; MELLADO, M.; ARECE, J. Influence of *S. babylonica* extract on feed intake, growth performance and diet in vitro gas production profile in young lambs. *Trop Anim Health Prod.* v. 46, p. 213–219, 2014.
- SINGH, R. K.; DEY, A., PAUL, S. S.; SATBIR, S.; PUNIAET, D. B. S. Associative effects of plant secondary metabolites in modulating in vitro methanogenesis, volatile fatty acids production and fermentation of feed in buffalo (*Bubalus bubalis*) *Agroflorest Syst*, p 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00395-3>
- SOFOWORA, A. *Plantas Mediciniais e Medicamentos Tradicionais na África*. Nova Iorque: Chichester John Willey & Sons; 1993.
- SOLER-RIVAS, C., ESPÍN, JC. AND WICHERS, HJ., 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, vol. 11, p. 330-338. [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1565\(200009/10\)11:5<330::AID-PCA534>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<330::AID-PCA534>3.0.CO;2-G).
- SOUTO, J. S.; BORGES, C. H. A.; MEDEIROS, W. P.; LEONARDO, F. P.; SOUTO, P. C, SOUTO, L. S. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de moringa na germinação e no crescimento inicial da alface. *Agrop. Cient. no Semiár.* v. 11, n. 2, p. 56-60, 2015.
- SULTANA N, ALIMON A, HAQUE KS, SAZILI AQ, YAAKUB H, HOSSAIN SJ. The effect of cutting interval on yield and nutrient composition of different plant fractions of *Moringa oleifera* tree. *J Food Agr Environ.* (2014) 12:599–604.
- MATSHEDISO, P.G. CUKROWSKA, E. L. CHIMUKA Development of pressurised hot water extraction (PHWE) for essential compounds from *Moringa Oleifera* leaf extracts *Food Chemistry*, 172 p. 423-427, 2015 10.1016/j.foodchem.2014.09.047
- MAXSON, ED. AND ROONEY, LW., 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, vl. 49, p. 719-729.
- MBAH BO, EME PE, PAUL AE. Effect of drying techniques on the proximate and other nutrient composition of *Moringa oleifera* leaves from two areas in Eastern Nigeria. *Pak J Nutr.*v.11, p.1044–8, 2012. 10.3923/pjn.2012.1044.1048

- MCSWEENEY C, PALMER B, MCNEILL D, KRAUSE D. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim Feed Sci Technol.* 91:83–93. 2001. 10.1016/S0377-8401(01)00232-2
- MEDA, A., LAMIEN, CE., ROMITO, M., MILLOGO, J. AND NACOUUMA, OG., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, vol. 91, no. 3, p. 571-577. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>.
- MOSS, A.R., JOUANY, J.P., NEWBOLD, J., Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49 (2000) 231-253
- MOYO B, MASIKA PJ, HUGO A, Muchenje V. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Afr J Biotechnol.* 10:12925–12933. (2011) 10.5897/AJB10.1599
- NOBOSSÉ P, FOMBANG EN, MBOFUNG CMF. Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh *Moringa oleifera* L. leaves. *Food science & nutrition* vol. 6, n.8, p. 2188-2198. 2018, doi:10.1002/fsn3.783
- NWIDU LL, ELMORSY E, APRIOKU JS, SIMINIALAYI I, CARTER WG. In Vitro Anti-Cholinesterase and Antioxidant Activity of Extracts of *Moringa oleifera* Plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria. *Medicines (Basel)*.v. 5, n.3, p.:71. 2018 10.3390/medicines5030071
- OWENS J, PROVENZA FD, WIEDMEIER RD, VILLALBA JJ Influence of saponins and tannins on intake and nutrient digestion of alkaloid-containing foods. *J Sci Food Agric* v. 92, n.11, p. 2373–2378, 2012.
- TREASE, G., EVANS, M. Text Book of Pharmacognosy. 13th Edition Bailliere Tindall Toronto. Tokyo, London, p. 200-201, 1989.
- XU YB, CHEN GL, GUO MQ. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Crude Extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. *Antioxidants (Basel)* v.:8, n. 8, p.296. 2019 doi:10.3390/antiox8080296
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. of Dair. Sc.*, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VETTER, R. E., BARBOSA, A. P. R. Mangrove bark: a renewable resin source for wood adhesives. *Ac. Amaz.*, v. 25, n. 1/2, p. 69-72, 1995.
- VIEIRA, P. F. Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 98 1980.
- VITTI DM, NOZELLA EF, ABDALLA AL, BUENO IC, SILVA FILHO JC, COSTA C, ET AL. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Anim Feed Sci Technol.* v.122, p. 123–33, 2005. 10.1016/j.anifeedsci.2005.04.007
- VONGSAK, B.; SITHISARN, P., MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crop. and Prod.*, v. 44, p. 566-571, 2013. .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente a moringa tem demonstrado resultados promissores para ser utilizada na alimentação animal. Porém a forma de inclusão, dentre outros fatores, pode afetar diretamente as respostas nos animais, devido a extração seletiva dos compostos bioativos, responsáveis pelas alterações na fermentação ruminal.

O estudo apresentou os principais compostos de interesse na modulação da fermentação ruminal, entretanto a moringa ainda possui outros compostos que podem estar exercendo atividades medicinais, bem como contém uma gama de nutrientes que pode ser empregada como alimento animal.

O estudo experimental indicou a presença dos compostos fenólicos, flavonoides, taninos e saponinas. e as suas quantificações nos extratos. A utilização de folhas frescas ou secas indicou efeito sobre os teores dos compostos. Apesar dos compostos estarem presentes nos extratos, a dosagem utilizada não teve efeito significativo para os parâmetros de fermentação ruminal analisados.

Sugere-se o desenvolvimento de pesquisas que especifiquem e quantifiquem os compostos presentes na moringa utilizada como aditivo em animais, e desse modo obter mais informações de dosagens recomendadas para o uso em ruminantes.