



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO  
FENO DE *MORINGA OLEIFERA* LAM. E  
SEU EFEITO SOBRE A CAPACIDADE  
REPRODUTIVA DE CARNEIROS**

**Michele Pereira da Silva**

**SÃO CRISTÓVÃO – SE  
2024**

# **PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO FENO DE *MORINGA OLEIFERA LAM.* E SEU EFEITO SOBRE A CAPACIDADE REPRODUTIVA DE CARNEIROS**

**Michele Pereira da Silva**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Orientador : Prof. Dr. Gladston Rafael de Arruda Santos

Coorientador : Dr. Hymerson Costa Azevedo

Coorientador : Dr. Evandro Neves Muniz

**SÃO CRISTÓVÃO – SE  
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S586p Silva, Michele Pereira da.  
Propriedades antioxidantes do feno de *Moringa Oleífera* LAM e seu efeito sobre a capacidade reprodutiva de carneiros / Michele Pereira da Silva; orientador Gladston Rafael de Arruda Santos. - São Cristóvão, SE, 2024.  
37 f.: il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Carneiros. 2. Feno. 3. Antioxidantes. 4. Fecundidade. 5. Andrologia. I. Santos, Gladston Rafael de Arruda, orient. II. Título.

CDU 636.32/.38

# PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO FENO DE *MORINGA OLEIFERA* LAM. E SEU EFEITO SOBRE A CAPACIDADE REPRODUTIVA DE CARNEIROS

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
**Michele Pereira da Silva**

Aprovada em 30 de abril de 2024

Gladston Rafael  
de Arruda Santos

Assinado de forma digital por  
Gladston Rafael de Arruda  
Santos  
Dados: 2024.07.29 21:04:31  
-03'00'

---

Prof. Dr. Gladston Rafael de Arruda Santos (UFS)  
Orientador



Documento assinado digitalmente

ANSELMO DOMINGOS FERREIRA SANTOS  
Data: 30/07/2024 10:50:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (a) Dr. (a) Anselmo Domingos Ferreira Santos (UFS)  
Examinador Externo



Documento assinado digitalmente

ANA MARA DE OLIVEIRA E SILVA  
Data: 31/07/2024 11:08:43-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (a) Dra Ana Mara de Oliveira e Silva (UFS)  
Examinadora Externa

**SÃO CRISTÓVÃO – SE  
2024**

Dedico primeiramente a Deus que sempre esteve ao meu lado, me dando forças para continuar.

Ao meu filho e a minha irmã, onde sempre ensinei sobre a importância da educação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que sempre está me iluminando e nunca me desamparou.

Ao meu amor, a minha mãe, primas (Bete e Daise) que sempre estiveram ao meu lado, a meu filho e minha irmã (que tenho como filha), por eles faço tudo e através deles renovo minhas forças para seguir, pois não foi nada fácil, só eles sabem o que passei para chegar aqui (Família).

Gostaria de deixar o meu profundo agradecimento ao meu orientador o professor Gladston, sempre muito atencioso e prestativo, muito, muito paciente, pessoa maravilhosa, obrigada por todo o incentivo e preocupação, por todas as palavras de conforto e sabedoria, isso foi muito importante para mim, nunca esquecerei de tudo o que fez, o senhor é um exemplo de professor e de pessoa.

Ao meu coorientador Dr Hymerson, sempre muito dedicado, organizado, grande profissional que admiro, obrigada pela oportunidade desde o início da graduação como PIBIC, desde lá, tive a honra de aprender muito, agradeço toda orientação.

Ao meu coorientador Dr Evandro, tenho um enorme carinho e uma gratidão eterna, desde o curso técnico onde tive a oportunidade de conhecer o senhor e Dr Rangel e até hoje agradeço a Deus por esse dia, vocês são pessoas maravilhosas.

A toda equipe da Embrapa em Glória, onde encontrei pessoas maravilhosas, que me acolheram, me ajudaram, com muita paciência e dedicação, possibilitando a realização desse experimento.

A Dr Rafael que disponibilizou a realização do experimento no campo experimental em Nossa Senhora da Glória e sempre uma pessoa muito prestativa, me ajudando no que precisei desde o PIBIC, TCC e agora o mestrado.

A equipe do LABRA que esteve comigo na realização de todos os detalhes realizados antes e durante o experimento.

Dr Rangel que igualmente a Dr Evandro tenho um enorme carinho, desde o curso técnico onde tive a oportunidade de conhecer e ser estagiária e PIBIC e hoje agradeço a honra de participar da minha banca.

A Iran, pessoa de grande coração que com toda boa vontade, comparecia sempre que possível (antes, nos intervalos e depois de suas aulas) para me

ajudar e reforço novamente, me ajudou demais, saiba que ganhou uma amiga pra toda vida.

A Luciana que esteve comigo durante a realização das análises no LANA, sempre ao meu lado me ensinando e me ajudando.

A professora Ana Mara, que com todos os compromissos se disponibilizou a ajudar nas análises e com muita paciência, me ensinou e me orientou da melhor forma possível.

Ao professor Anselmo que disponibilizou equipamentos quando necessário, por disponibilizar seu tempo quando precisei para tirar dúvidas e por me dar a honra de participar de minha banca.

A Suzane que esteve ao meu lado em todas as análises referentes ao antioxidantes, sempre muito solícita, paciente e prestativa.

A Daniel e a Raquel que se disponibilizaram para me ajudar com a estatística e tirando minhas dúvidas referentes aos antioxidantes.

A Daniel e Patrícia do laboratório de nutrição da Embrapa, que realizaram análises referente ao experimento.

As colegas de Glória Bia, Dani e Cleomara que receberam em sua casa durante a realização do experimento e foram super carinhosas e prestativas.

A toda a equipe do DZO que esteve comigo sempre muito prestativa, me ajudando quando precisei Luis, Igor, Dona Mara e aos demais.

Ao professor Edvaldo que com toda boa vontade e confiança disponibilizou seu equipamento para uso no experimento.

Ao professor Braulio e aos alunos do seu grupo de estudos como Victor, Rafaela, Thais e Cristovão.

Ao professor Urias disponibilizou equipamentos e deixou a disposição, quando foi necessário.

À Universidade Federal de Sergipe - UFS que está contribuindo para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

## EPÍGRAFE

Quero aproveitar o meu tempo com gente que reza. Gente que torce por tudo que é bom. Quero sentar pra ver o pôr do sol com quem sabe como é divino todo milagre diário. Com quem entende que ter um dia bom, sem notícias ruins é motivo para dobrar os joelhos. Quero ao meu lado pessoas que que falam com os olhos e que sabem que ouro é ter alguém que ama incondicionalmente. Quero servir uma taça de vinho e brindar o encontro verdadeiro de almas que se esbarram por simples e pura afinidade.

Ana Luiza Costa

## BIOGRAFIA

MICHELE PEREIRA DA SILVA, filha de Miguel Angelo Pereira da Silva e Maria do Carmo Silva, nasceu na cidade de Salvador - BA, em 09 de janeiro de 1990. Em 2005, passou a estudar na Escola Agrotécnica Federal de São Cristóvão-SE, hoje o Instituto Federal de Sergipe, Campus Quissamã, formando-se Técnica em Agropecuária no ano de 2008. Foi estagiária na Embrapa Tabuleiros Costeiros, na área de Nutrição Animal, também em 2008.

Em 2015 ingressou na Faculdade Pio Décimo, onde fez parte grupo de estudos em reprodução Animal (GEPRA), participando da organização de palestras e projetos. Foi monitora voluntária na disciplina de Ginecologia e Andrologia Veterinária (2019.2). Foi bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na área de Biotecnologia da Reprodução Animal (2017-2018), também bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) pela Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), na área de Nutrição Animal (2018-2019), ambos na Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Em 2020, ingressou no Programa de Pós-graduação Integrado em Zootecnia na Universidade Federal de Sergipe, com área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes e Forragicultura, sob orientação da Professor Dr. Gladston Rafael de Arruda Santos.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1	<i>Espermatozoides e plasma seminal</i>	16
2.2	<i>Estresse oxidativo e ação dos antioxidantes</i>	17
2.3	<i>Moringa Oleifera Lam.</i>	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1	<i>Locais para realização do experimento</i>	20
3.2	<i>Animais experimentais</i>	21
3.3	<i>Manejo alimentar e Análise químico-bromatológica</i>	21
3.5	<i>Análise de antioxidantes no feno de Moringa Oleifera</i>	23
3.5.1	<i>Quantificação de compostos bioativos</i>	24
3.5.2	<i>Capacidade antioxidante</i>	25
3.5.2.1	<i>Ensaio do radical DPPH</i>	25
3.5.2.2	<i>Ensaio do radical ABTS</i>	25
3.5.2.3	<i>Poder de redução de ferro</i>	26
3.6	<i>Colheita e análise do sêmen e desenvolvimento ponderal dos carneiros</i>	26
3.7	<i>Capacidade antioxidante in vitro do plasma seminal</i>	28
3.8	<i>Análise estatística</i>	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
4.1	<i>Composição fitoquímica e capacidade antioxidante do feno de Moringa</i>	29
4.1.1	<i>Quantificação de compostos bioativos</i>	29
4.1.2	<i>Capacidade antioxidante</i>	30
4.2	<i>Variação do peso vivo dos carneiros</i>	32
4.3	<i>Análises seminais e espermáticas</i>	32
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>36</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Análise de percentual de varredura do radical DPPH

Figura 2. Análise de percentual de varredura do radical ABTS

Figura 3. Análise da integridade de membrana plasmática

Figura 4. Capacidade antioxidante total do plasma seminal

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções dos concentrados dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 2. Dietas dos grupos experimentais com níveis de substituição da silagem de milho pelo feno de *Moringa Oleifera*

Tabela 3. Composição químico-bromatológica das dietas experimentais com diferentes níveis de substituição da silagem de milho pelo feno de *Moringa Oleifera*.

Tabela 4. Composição químico-bromatológica dos diferentes elementos dietas ofertadas aos carneiros.

Tabela 5. Teor de compostos fenólicos e flavonoides no extrato etanólico do feno e da *Moringa in natura*.

Tabela 6. Capacidade antioxidante do extrato etanólico do feno e da *Moringa in natura*.

Tabela 7. Pesos vivos dos carneiros alimentados com diferentes níveis de feno *Moringa Oleifera* na dieta no decorrer do experimento.

Tabela 8. Avaliações do sêmen realizadas no decorrer do experimento em carneiros alimentados com diferentes níveis de feno de *Moringa Oleifera*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
CC	Concentrado
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CON	Concentração espermática
cm	Centímetro
D-3	Primeiro dia do período de adaptação ao manejo experimental
D 0	Último dia do período de adaptação ao manejo experimental
D 1	Primeira colheita e análise de sêmen
D 15	Segunda colheita e análise de sêmen
D 30	Terceira colheita e análise de sêmen
D 45	Quarta colheita e análise de sêmen
D 60	Quinta colheita e análise de sêmen
DMA	Defeitos Espermáticos Maiores (%)
DME	Defeitos Espermáticos Menores (%)
DT	Defeitos espermáticos totais
DPPH	Composto químico orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EE	Extrato Etéreo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F-MO	Feno de Moringa
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
FDA	Fibras em detergente neutro
FDN	Fibras em detergente ácido
g	Gramas

G0	Grupo alimentado com 0% de <i>Moringa Oleifera</i>
G10	Grupo alimentado com 10% de <i>Moringa Oleifera</i>
G20	Grupo alimentado com 20% de <i>Moringa Oleifera</i>
G30	Grupo alimentado com 30% de <i>Moringa Oleifera</i>
IA	Integridade de acrossomo
Kg	Kilograma
LIG	Lignina
MO	<i>Moringa in natura</i>
MOT	Motilidade espermática
MM	Matéria mineral
mm	Milímetros
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MS	Matéria seca
PB	Proteína bruta
SS	Silagem de sorgo
SPTZS	Espermatozoides
TNT	Tecido não tecido
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VL	Volume
VE	Vigor espermático
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## RESUMO

O feno de *Moringa oleifera* (F-MO) pode representar uma importante fonte de compostos antioxidantes em dietas para carneiros reprodutores ajudando a prevenir os danos das espécies reativas de oxigênio sobre os espermatozoides. Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes de dietas com F-MO e seu efeito sobre o potencial reprodutivo de carneiros. Foram selecionados 28 carneiros, divididos em quatro grupos (G) e submetidos a dietas experimentais isoprotéicas compostas de 30% de concentrado (CC) (milho, farelo de soja e ureia); mais diferentes proporções de silagem de sorgo (SS); e feno de F-MO: G0 (controle: 0% F-MO, 70% SS); G10 (10% F-MO, 60% SS); G20 (20% F-MO, 50% SS); G30 (30% F-MO, 40% SS), além de água e sal mineral *ad libitum*. Foram realizadas análises químico-bromatológicas dos componentes das dietas e das sobras. Análises de compostos bioativos, fenólicos e flavonoides, capacidade antioxidante pela varredura do radical DPPH, captação do radical ABTS e redução de ferro pelo método FRAP foram realizadas em amostras de *Moringa* in natura (MO) e do F-MO. Também foram realizadas análises de FRAP no plasma seminal para avaliar a capacidade antioxidante total da mesma. A cada 15 dias, durante 60 dias, foram realizadas pesagens dos carneiros para controle do desenvolvimento ponderal e coletas de sêmen para análises seminais (volume, concentração espermática e número total de espermatozoides) e espermáticas do sêmen (motilidade, vigor, morfologia, integridade, funcionalidade da membrana plasmática e integridade do acrossomo). O F-MO não diferiu da MO quanto aos fenólicos totais. Já o teor de flavonoides foi maior no F-MO que na MO (4,75 vs. 3,88 mg Eq CAT/g). As análises de DPPH, ABTS e FRAP revelaram alta capacidade antioxidante e alto poder redutor do F-MO. A capacidade antioxidante total do plasma seminal não diferiu entre os grupos experimentais. Das análises no sêmen foram observadas diferenças entre os grupos apenas quanto à integridade espermática: grupos de carneiros que receberam o F-MO na dieta independente da concentração (G10, G20 e G30) apresentaram maior percentual em relação ao G0. Conclui-se que a fenação potencializa a capacidade antioxidante da *Moringa oleifera* e que sua presença na composição de dietas aumenta o potencial reprodutivo de carneiros.

**Palavras-chaves:** espermatozoides, fertilidade, ovinos, sêmen.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* hay (MO-H) may represent an important source of compounds with antioxidant action for the diets of breeding rams, helping to prevent damage from reactive oxygen species on spermatozoa. This study aimed to evaluate the antioxidant properties of diets with MO-H and their effect on the reproductive potential of rams. There were used 28 rams, divided in four groups (G) submitted to experimental isonitrogenous diets composed of 30% concentrate (CC) (corn, soybean meal and urea); plus a different proportions of sorghum silage (SS) and MO-H, where: G0 (control: 0% MO-H, 70% SS); G10 (10% MO-H, 60% SS); G20 (20% MO-H, 50% SS); G30 (30% MO-H, 40% SS). Water and mineral salt for sheep were offered *ad libitum*. Chemical-bromatological analyzes of the components of the diets and leftovers were carried out. Analysis of bioactive, phenolics and flavonoids compounds, antioxidant capacity by DPPH radical scavenging, ABTS radical uptake and iron reduction by the FRAP method were carried out on fresh *Moringa* (MO) and MO-H samples. FRAP analyzes were also carried out in seminal plasma to evaluate its total antioxidant capacity. Every 15 days, for 60 days, the rams were weighed to control weight development and semen was collected for seminal (volume, sperm concentration and total number of sperm) and semen analyzes (motility, vigor, morphology, integrity, plasma membrane functionality and acrosome integrity). MO-H did not differ from MO regarding total phenolics. The flavonoid content was higher in MO-H than in MO (4.75 vs. 3.88 mg Eq CAT/g). DPPH, ABTS and FRAP analyzes revealed high antioxidant capacity and high reducing power of MO-H. The total antioxidant capacity of seminal plasma did not differ among the experimental groups. From the semen analyzes, differences were observed among the groups only in terms of sperm integrity: groups of rams having F-MO in the diet regardless of concentration (G10, G20 and G30) showed a higher percentage compared to G0. It is concluded that haying enhances the antioxidant capacity of *Moringa oleifera* and that its presence in the composition of diets increases the reproductive potential of rams.

Keywords: sperm, fertility, sheep, semen.

## 1 INTRODUÇÃO

Em condições fisiológicas, as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), comumente denominadas radicais livres (RL) e os antioxidantes encontram-se em equilíbrio nos sistemas celulares. No entanto, quando há falhas neste equilíbrio bem como produção excessiva de EROs, ocorre o estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2010; ARAÚJO et al., 2017) que pode provocar efeitos prejudiciais na reprodução, tanto no sistema reprodutor feminino quanto no masculino.

Os espermatozoides são células aeróbias, sendo o oxigênio um elemento crucial para a manutenção de suas funções (ANDRADE et al., 2010). Uma dessas funções é a capacitação, realizada extracelularmente ao nível da membrana plasmática (MP) (O'FLAHERTY et al., 2006); no entanto, quando presente em grande quantidade, o oxigênio pode causar danos à célula espermática, especialmente quando há uma elevada produção de EROs (ANDRADE et al., 2010).

O colesterol está presente em grande quantidade na MP dos espermatozoides, mais precisamente na região da cabeça, sendo importante para manter a fluidez da célula (ARAÚJO et al., 2017), que possui alta quantidade de ácidos graxos insaturados (AGPI) torna-os vulneráveis à ação de agentes oxidantes, como os RL, e assim, suscetíveis à peroxidação lipídica com perda de função e morte (VALENÇA; GUERRA, 2007).

Diversos fatores podem provocar o aumento da produção de EROs e a redução da disponibilidade de antioxidantes desequilibrando este sistema (ANDRADE et al., 2010). A manipulação, lavagem e diluição expõem o sêmen ao oxigênio, levando à produção de EROs. Além disso a lavagem e a diluição do sêmen podem remover ou reduzir a proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal (MAIA; BICUDO, 2009). A exposição dos animais a condições de estresse e a nutrição inadequada também são fatores que podem provocar desequilíbrio (ANDRADE et al., 2010).

A Moringa Oleifera Lam (MO) é uma planta com alto potencial de valor nutricional, rica em proteínas, carboidratos e minerais, recomendada para a suplementação proteica de ruminantes. Ela possui baixa quantidade de taninos e saponinas e contém em sua composição uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, especialmente o oleico (SOBRAL et al., 2020), além de

lipídios e glicosídeos e diferentes polifenóis como os flavonídeos e ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, carotenoides, ácido ascórbico e outros antioxidantes naturais, tornando-a uma fonte alimentar rica, com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (MOUSA et al., 2019).

A MO pode ser oferecida na alimentação animal na forma *in natura*, ensilada ou fenada, sem restrições quanto à quantidade. Em forma de feno, a MO pode compor rações concentradas, sendo uma importante fonte proteica, possibilitando a substituição de componentes convencionais da ração (LISITA et al., 2018). Considerando que o sêmen ovino é rico em ácidos graxos poli-insaturados, possuindo alta sensibilidade à peroxidação lipídica, os antioxidantes contidos na Moringa podem diminuir as EROs e, conseqüentemente, a lipoperoxidação, elevando o sistema de defesa antioxidante do sêmen de carneiros. O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes do feno de MO e seu efeito sobre o potencial reprodutivo de carneiros após sua ingestão.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Espermatozoides e plasma seminal**

Os espermatozoides são produzidos pelos testículos em um processo regulado por hormônios chamado espermatogênese. São liberados do testículo e passam para o epidídimo, onde completam sua maturação. Durante o processo até a ejaculação, os espermatozoides se misturam com secreções da próstata e das vesículas seminais formando enfim o sêmen. Neste momento eles já possuem a motilidade, porém não estão prontos para realizar a fertilização no trato genital feminino, necessitando processo chamado capacitação que para acontecer depende de fatores como temperatura e tempo, permitindo que se liguem à zona pelúcida (ZP) do oócito, com a liberação de enzimas proteolíticas, para poder penetrar e se fundir ao oócito (O'FLAHERTY et al. 2006).

A capacitação é um termo usado para definir um processo que permite que os espermatozoides se tornem aptos para fertilizar os ovócitos. Espermatozoides podem produzir pequenas quantidades de EROs sem prejudicar a função celular e promover vias de transdução de sinal associadas à capacitação (ARAÚJO et

al., 2017). Em quantidades muito baixas, as EROs têm um efeito positivo na capacitação e na reação acrossômica, dois processos necessários para que os espermatozoides adquiram capacidade de fertilização (O' FLAHERTY et al., 2006).

Depois de ultrapassar a barreira da ZP, o espermatozoide pode fundir-se com o oócito e resultar numa fertilização bem-sucedida. Um alto grau de fluidez da membrana espermática é necessário para que ocorra a fusão adequada. Algum grau de fluidez da membrana é garantido pelo alto teor de AGPI da membrana plasmática do espermatozoide (KOTHARI et al., 2010).

O plasma seminal é uma mistura de fluidos produzidos na rede testicular, no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias (glândulas prostática, vesiculares, ampolas e bulbo-uretrais). A composição molecular é complexa e específica de cada espécie. O plasma seminal inclui açúcares, proteínas, antioxidantes, minerais, sais orgânicos (MOULA; AMIRI, 2022), além de íons inorgânicos, lipídios, enzimas, prostaglandinas e vários outros fatores (DRUART et al., 2013).

Durante muito tempo o plasma foi considerado somente um meio de transporte para os espermatozoides, hoje está claro que este fluido também tem efeitos duradouros na sua movimentação, armazenamento no trato reprodutivo feminino e preservação (MOULA; AMIRI, 2022). Componentes do plasma seminal, particularmente proteínas, influenciam na maturação, estabilização, capacitação e até mesmo na interação com o oviduto e oócito dos espermatozoides (DRUART et al., 2013)

## **2.2 Estresse oxidativo e ação dos antioxidantes**

As EROs ou radicais livres são instáveis e reativas, se ligam a outro elétron para alcançar a estabilidade, podendo reagir facilmente com a maioria das biomoléculas, começando uma reação em cadeia. Estes compostos são formados em reações de óxido-redução, seja cedendo um elétron e tornando-se oxidado, ou recebendo outro e ficando na forma reduzida. A sua principal fonte é a mitocôndria, por meio da cadeia de transporte de elétrons, porém são gerados também nas membranas celulares e citoplasma, e essa geração pode ser favorecida pela presença de íons ferro e cobre (NOGUEIRA et al., 2014).

O aumento ou prolongamento desse estresse pode causar efeitos deletérios sobre as células e estão geralmente associados às patologias e morte celular (NOGUEIRA et al., 2014). O estresse oxidativo também é considerado uma causa importante na infertilidade, pois este fenômeno pode o provocar alta taxa de danos ao DNA espermático (VALDÉS et al., 2011). O espermatozoide e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes que reduzem as EROs em níveis fisiológicos, na tentativa de conter danos aos espermatozoides. As principais enzimas antioxidantes contidas no plasma seminal são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (LIMA, 2011; SHOKRY et al. 2020).

Antioxidantes de baixo peso molecular como a vitamina C, E e carotenos também são responsáveis pela inativação de EROs. Alguns deles, incluindo glutaciona, albumina e metalotioneínas e ácido úrico, são produzidos no corpo, mas a maioria são compostos exógenos derivados de fontes naturais, como plantas (flavonóides, ácidos fenólicos, carotenóides, estilbenos, cumarinas, lignanas, vitaminas) ou minerais (selênio, zinco, manganês) fornecidos com a dieta. Quando os antioxidantes endógenos envolvidos nas defesas dos radicais livres não conseguem proteger o corpo contra as EROs, é necessário o consumo de antioxidantes exógenos (FLIEGER et al., 2021).

Nos alimentos, os antioxidantes mesmo em pequena quantidade, são capazes de prevenir ou adiar a oxidação de moléculas facilmente oxidáveis, como as gorduras. Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação e; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação; como alcoxila e peroxila, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo assim a reação em cadeia (TIVERON, 2010).

No sêmen, além da geração de moléculas oxidantes, existem também mecanismos responsáveis por remover essas substâncias. Este sistema antioxidante desempenha um papel importante na prevenção de danos celulares internos e na proteção da capacidade fertilizante dos espermatozoides (VALDÉS et al., 2011).

### 2.3 *Moringa Oleifera* Lam.

A *Moringa Oleifera*. Lamarck é uma espécie originária da Índia com ampla distribuição mundial, principalmente em países tropicais. Pertencente à família Moringaceae, composta por apenas um gênero (*Moringa*) com 13 espécies (LIMA, 2016; FALOWO et al., 2018; SOARES et al. 2021). É uma planta arbórea de médio porte, perene, com crescimento rápido, podendo chegar até 12 metros de altura (SOBRAL et al., 2020). Seu ponto ideal para corte ocorre aos seis meses, após sua emergência, com alta capacidade de rebrotação e produção de biomassa (OLIVEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020).

A MO contém em sua composição nutrientes e compostos bioativos em diferentes partes da planta como: Vitamina A, C, E, carotenoides, ferro, cálcio, fósforo, cobre, potássio, aminoácidos essenciais específicos (metionina, cistina, triptofano e lisina) (ANWAR et al., 2007), vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B12), carotenoides, compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonóides (SOARES et al., 2021) zinco e selênio (SILVA et al., 2019). Além disso proporciona uma ótima fonte de volumoso, devido ao seu grande número de folhas no período de estiagem, se tornando ótima opção para nutrição animal, com alto teor de proteínas (SOBRAL et al., 2020).

A MO cresce em ambientes com climas tropical e subtropicais, seco e úmidos, com precipitação anual de 760 a 2500 mm (requer menos de 800 mm de irrigação), suporta temperaturas entre 18 e 28 °C, qualquer tipo de solo, com pH entre 4,5 e 8 (LEONE et al., 2015). Com essas características a MO vem se difundindo cada vez mais no Brasil, mais especificamente no semiárido brasileiro, por possuir adaptação às suas condições edafoambientais, podendo ser utilizada em sistemas convencionais de pastagens, servindo como alternativa para suprir as necessidades dos rebanhos, melhorando a produtividade animal, sem exigir muitos tratamentos culturais para seu cultivo (SILVA et al., 2019).

A MO pode ser promissora quando administrada na alimentação de carneiros melhorando a qualidade do sêmen (SHOKRY et al., 2020), devido ao seu teor de componentes antioxidantes (ANWAR et al., 2007; SILVA et al., 2019; SOARES et al., 2021).

A MO pode ser empregada na alimentação animal na forma de feno ou silagem, moída e misturada à ração (SÁ, 2018). O feno da MO (F-MO) apresenta alta capacidade de absorção de água sugerindo a presença de compostos mais hidrofílicos na proteína (AYE; ADEGUN, 2013). Na alimentação de ovinos com F-MO de folhas de MO a mesma poderia substituir a torta de algodão diminuindo o custo de produção (ADEGUN; AYE, 2013). O F-MO apresenta altos teores de matéria mineral, apresenta também elevado teor de lipídios (verificado através da análise de extrato etéreo), classificando a espécie como planta rica em óleos (AYE; ADEGUN, 2013), tornando-se uma ótima alternativa econômica e sustentável para produção animal (ADEGUN; AYE, 2013).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com o número de protocolo nº 442022.

#### **3.1 Locais para realização do experimento**

O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Semiárido, localizado nos municípios de Nossa Senhora da Glória e Graccho Cardoso, SE (10°13' Sul, 37°27' Oeste; altitude 300m), no período de 07/12/2022 à 08/02/2023. Os carneiros utilizados foram selecionados a partir do rebanho do Núcleo de Conservação *in situ* de Ovinos da raça Santa Inês do Campo Experimental Pedro Arle da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Frei Paulo, Agreste de Sergipe. As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Laboratório de Reprodução Animal (LABRA), ambos pertencentes a Embrapa e também no Laboratório de Avaliação Nutricional (LAN), Laboratório de Nutrição Animal (LANA) e Laboratório de Análises de Alimentos localizados na Universidade Federal de Sergipe.

### 3.2 Animais experimentais

Foram utilizados 28 carneiros adultos, com peso médio de  $69,36 \pm 1,29$  kg selecionados a partir de exames andrológicos que compreenderam o exame clínico geral e especial dos órgãos reprodutivos e análise do sêmen (CBRA, 2013; MARTINS et al., 2016; TOKER et al., 2016). Antes do início do experimento esses animais foram tratados com solução de cloridrato de levamisol a 5%, para o controle de verminoses. Os carneiros foram distribuídos aleatoriamente através de sorteio em quatro grupos de acordo com as dietas experimentais sendo mantidos em baias coletivas (7 carneiros/baia) medindo 2,8 x 3,6 metros (1,44 m<sup>2</sup>/ animal)

### 3.3 Manejo alimentar e Análise químico-bromatológica

Antes da formulação das dietas experimentais foi realizado o processo de fenação da MO. Para a confecção do feno F-MO, foi realizado o corte manual da planta sempre pela manhã, selecionando-se os caules tenros com até 1 cm de diâmetro e folhas. Com o auxílio de uma lona plástica o material colhido repousava por aproximadamente 8 dias ao sol para desidratação. Depois de seco, o material desidratado foi picado em máquina forrageira resultando em partículas de 0,5 a 2 cm para posteriormente ser armazenado em sacos de ráfia.

A partir da confecção do F-MO foi possível formular as dietas experimentais de modo que elas fossem isoproteicas com 12% de proteína bruta e balanceadas para atender as exigências de carneiros adultos com ganho de peso diário médio de 100 g/animal/dia (NRC, 2007). As dietas foram compostas de silagem de sorgo (SS), concentrado (CC) à base de milho, farelo de soja, ureia e sal, além de diferentes proporções de F-MO. As diferentes dietas determinaram a formação dos grupos experimentais como descrito a seguir e variaram de acordo com a composição do concentrado e o nível de substituição da SS pelo F-MO como consta nas tabelas de 1 a 3: G0 (controle: 0% F-MO, 70% SS e 30% CC); G10 (10% F-MO, 60% SS e 30% CC); G20 (20% F-MO, 50% SS e 30% CC) e G30 (30% F-MO, 40% SS e 30% CC). Todos os carneiros tiveram acesso *ad libitum* à água e sal mineral.

Tabela 1. Proporções dos concentrados dos diferentes grupos experimentais.

Alimentos	Grupos experimentais			
	G0 (%)	G10 (%)	G20 (%)	G30 (%)
Farelo de Soja	30	20,3	11,4	2
Milho	66,5	76,2	85,4	95
Calcário	0,5	0,5	0,2	0
*Sal	2	2	2	2
Ureia	1	1	1	1
Total	100	100	100	100

\*Composição nutricional (G/KG): 200 Cálcio;75 Fósforo; 90 Sódio; 10 Enxofre; 5 Magnésio; 400 Ferro; (MG/KG) 1.848 Manganês;3.060 Zinco; 40 Iodo; 20 Cobalto; 24 Selênio; (UL/KG) 312.500 Vitamina A; 50.000 Vitamina D3; Vitamina E 437

Tabela 2. Dietas dos grupos experimentais com diferentes níveis de substituição da silagem de milho pelo feno de *Moringa Oleifera*.

Alimentos	Grupos experimentais			
	G0 (%)	G10 (%)	G20 (%)	G30 (%)
Feno de Moringa	0	10	20	30
Silagem de Sorgo	70	60	50	40
Concentrado*	30	30	30	30

\* base de milho, farelo de soja, calcário, ureia e sal.

Tabela 3. Composição químico-bromatológica das dietas dos grupos experimentais (G) com diferentes níveis de substituição da silagem de milho pelo feno de *Moringa Oleifera*.

Nutrientes	Grupos experimentais			
	G0 (%)	G10 (%)	G20(%)	G30 (%)
Proteína Bruta - PB (%)	12,05	12,00	12,01	12,02
Nutrientes Digestíveis Totais - NDT (%)	66,31	66,76	67,53	67,19
Calcio - Ca (g)	0,432	0,430	0,426	0,414
Fósforo - P (g)	0,339	0,330	0,323	0,315

Os carneiros foram alimentados durante 63 dias (D), sendo os três primeiros (D-3 à D0) compreendidos como período de adaptação e os 60 dias posteriores (D1 à D60) considerado o período experimental efetivo para análise do efeito das dietas.

Foram realizadas coletas de amostras de MO, do F-MO, SS e demais componentes da dieta no início do experimento e das sobras da dieta no final do experimento. Estas amostras foram congeladas (-80°C) e armazenadas para posteriormente serem submetidas a análises químico-bromatológicas a fim de

determinar os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) além da determinação das fibras em detergente neutro (FDN), em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG). As metodologias usadas foram baseadas nas recomendações descritas por Silva & Queiróz (2002) e por Van Soest (1967) posteriormente adaptada por Detmann et al. (2012). As amostras foram congeladas na medida que eram coletadas para posteriormente serem descongeladas, secas em estufa com ventilação forçada a 55 °C por 72 horas e moídas em moinho de facas do tipo Willey, utilizando peneira com crivos de 1 mm de diâmetro, com posterior armazenamento em potes individuais devidamente identificados.

A Tabela 4 apresenta os resultados referentes às análises da composição químico-bromatológica de todos os componentes administrados nas dietas dos carneiros no decorrer do experimento.

**Tabela 4.** Composição químico-bromatológica dos diferentes elementos das dietas ofertadas aos carneiros

<b>Alimentos</b>	<b>MS (%)</b>	<b>MM (%)</b>	<b>FDN (%)</b>	<b>FDA (%)</b>	<b>EE (%)</b>	<b>PB (%)</b>
<b>Feno de MO</b>	89,94	10,42	50,6	46,71	3,06	22,93
<b>Milho</b>	87,54	1,52	36,18	36,6	1,75	8,55
<b>Farelo de Soja</b>	87,96	7,24	49,77	12,35	1,03	50,3
<b>Silagem de sorgo</b>	26,74	6,65	75,3	58,74	2,8	8,02
<b>Ureia</b>	100,0	.	.	.	.	262,0
<b>Ingredientes</b>						
<b>Concentrado G0</b>	87,48	5,08	42,25	20,24	7,33	31,73
<b>Concentrado G10</b>	87,79	5,15	43,36	15,47	4	24,63
<b>Concentrado G20</b>	87,79	5,15	37,95	12,63	4,44	21,31
<b>Concentrado G30</b>	87,86	4,06	36,99	14,63	4,78	16,9

MS= Matéria seca; MM= Matéria mineral; FDN= Fibra em detergente neutro; FDA= Fibra em detergente ácido; EE= Extrato etéreo, PB= Proteína bruta; G0= Grupo alimentado com 0% de F-MO; G10= Grupo alimentado com 10% de F-MO; G20= Grupo alimentado com 20% de F-MO; G30= Grupo alimentado com 30% de F-MO.

### **3.5 Análise de antioxidantes no feno de *Moringa Oleifera***

As mesmas foram descongeladas, pré secas em estufa com ventilação forçada a 55 °C por 24 horas. Amostras moídas de F-MO foram utilizadas para análise em triplicata de antioxidantes sendo utilizadas amostras de MO para efeito de comparação. Primeiramente foram obtidos os extratos diluindo-se 100

g de amostra em 250 mL de etanol submetidos a agitação magnética por 24 horas. Posteriormente, o conteúdo do sobrenadante foi filtrado a vácuo e os extratos etanólicos foram concentrados. Os extratos foram mantidos em frascos de vidro âmbar bem lacrados, sob refrigeração (2°C), até serem utilizados para triagem fitoquímica e antioxidante. Foram preparadas soluções estoque dos extratos nas concentrações de 1000 µg/mL e posteriormente, a partir desta, foram feitas diferentes diluições para obter-se as concentrações de 10, 30, 100 e 300 µg/mL. Os extratos nestas diferentes concentrações foram submetidos às análises de compostos bioativos e da capacidade antioxidante.

### **3.5.1 Quantificação de compostos bioativos**

A análise de bioativos da MO e F-MO se baseou na quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides dos seus extratos. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Swain e Hills (1959) com algumas modificações. Alíquotas de 12,5 µL dos extratos foram diluídos com uma solução de 200 µL de água destilada e 12,5 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, foram adicionados 25 µL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo esta mistura mantida em repouso, ao abrigo da luz, por uma hora em temperatura ambiente e então, as absorbâncias foram mensuradas em leitor de placas a 720 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, determinados por uma curva de ácido gálico (12,5 a 200 µg/mL) realizada nas mesmas condições.

Os flavonoides foram determinados pelo método de Jia et al. (1999), com algumas modificações, usando o método do tricloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>). Uma alíquota (25 µL) dos extratos foi misturada com água destilada (100 µL) e, posteriormente, com solução de NaNO<sub>2</sub> (5%, 7,5 µL). Após 6 minutos, foi adicionada a solução de AlCl<sub>3</sub> (10%, 7,5 µL) e mantida a mistura em repouso por mais 6 minutos. foram adicionadas. Em seguida foi adicionada uma solução de NaOH (4%, 100 µL) e água destilada (10 µL) mantida sob repouso durante 15 minutos. A intensidade da cor rosa foi medida espectrofotometricamente a 510 nm. A catequina foi utilizada para a curva padrão (0,125 a 2 µg) e os resultados foram expressos como mg de equivalentes de catequina por g de extrato.

### **3.5.2 Capacidade antioxidante**

Os ensaios para mensuração da capacidade antioxidante *in vitro* descritos abaixo foram realizados em quintuplicada. O Trolox que é um antioxidante sintético derivado da vitamina E foi utilizado como padrão na concentração de 100 µg/mL.

#### **3.5.2.1 Ensaio do radical DPPH**

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) segundo Brand-Willians et al. (1995). Alíquotas de 50 µL dos extratos, foram adicionadas a 150 µL de solução metanólica de DPPH a  $6 \times 10^{-5}$  mol/L. As determinações foram acompanhadas de um controle sem antioxidante, contendo 50 µL de metanol no lugar dos extratos. A redução do radical DPPH• foi medida a 517 nm em espectrofotômetro logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de absorvância (Abs) das amostras dos extratos foi correlacionado com o do controle e estabelecido o percentual de varredura do radical DPPH•, expressa pela equação abaixo sendo os valores expressos em concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>), correspondente à quantidade de amostra necessária para neutralizar 50% da solução de DPPH:

$$\% \text{ de varredura} = 100 - [(Abs \text{ amostra} \times 100) / Abs \text{ controle}]$$

#### **3.5.2.2 Ensaio do radical ABTS**

Uma alíquota de 30 µL dos extratos foi transferida para microplacas contendo 300 µL do radical ABTS (Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) que correspondeu a 5 mL da sua solução estoque a 7mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio a 140 mM. A leitura das microplacas foi feita em espectrofotômetro (734 nm) após sua calibração com álcool etílico como controle e repouso das amostras por 6 minutos. O decréscimo nos valores de absorvância (Abs) das amostras foi correlacionado com o do controle e estabelecido o percentual de varredura do radical ABTS, expressa pela equação abaixo sendo os resultados expressos em IC<sub>50</sub>:

% de varredura =  $100 - [(Abs amostra \times 100) / Abs controle]$

### **3.5.2.3 Poder de redução de ferro**

Uma alíquota de 9  $\mu$ L dos foi transferida para uma microplaca, onde foi acrescentado 27  $\mu$ L de água destilada e 270  $\mu$ L do reagente FRAP que corresponde a 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. A microplaca foi mantida a 37°C por 30 minutos para então ser avaliada em espectrofotômetro (595 nm) utilizando-se o reagente FRAP como branco para calibração. Os resultados foram expressos em  $\mu$ M de equivalentes de sulfato ferroso/mL de extrato.

## **3.6 Colheita e análise do sêmen e desenvolvimento ponderal dos carneiros**

Durante o período experimental efetivo de 60 dias, foram realizadas colheitas e análises de sêmen a cada 15 dias (D1, D15, D30, D45 e D60) para avaliação do seu potencial reprodutivo dos carneiros. Além disso, foram feitas pesagens corporais dos carneiros no D1, D15, D45 e D60 utilizando balança mecânica móvel tipo gaiola (LABOREMUS®, BL300PRO).

O sêmen foi colhido com auxílio de eletroejaculador (TK 800®, Uberaba, Brasil). Inicialmente os carneiros foram contidos em estação em tronco do tipo guilhotina para posteriormente terem sua ampola retal esvaziada de fezes. Posteriormente, foi introduzida no reto dos animais uma sonda lubrificada com gel à base de carboximetilcelulose posicionando-se os seus eletrodos ventralmente e aplicando-se seis estímulos elétricos de baixa voltagem (8 V) com duração de seis segundos e intervalos de seis a 10 segundos (DAMIÁN; UNGERFELD, 2011).

O sêmen colhido foi submetido a avaliações seminais e espermáticas. As avaliações seminais compreenderam o volume (VL), concentração espermática (CON) e número total de espermatozoide (NTE) seguindo metodologias adaptadas daquelas recomendadas pelo CBRA (2013). O VL foi mensurado com auxílio de uma pipeta de precisão e expresso em mililitros (mL) A CON foi

determinada a partir da adição de uma alíquota de sêmen à água ultrapura (Milli-Q®, Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 1:400 e observação em câmara de Neubauer sob microscópio ótico (Nikon® E100, Japão) com aumento de 400x. A partir da multiplicação do VL pela CON foi determinado o número total de espermatozoides (NTE) da amostra seminal colhida.

As avaliações espermáticas compreenderam a motilidade (MOT), vigor (VE), morfologia, integridade, funcionalidade da membrana plasmática e integridade do acrossomo. A MOT e o VE foram avaliados imediatamente após a colheita adicionando-se 10µL de sêmen em 150 µL de solução de X-Cell® (IMV, L'Aigle, França) aquecida a 37 °C. Uma alíquota de 10µL da mistura foi transferida para uma lâmina e coberta por uma lamínula aquecidas (37 °C) sendo avaliada em um microscópio ótico (Nikon® E100, Japão) com aumento de 400x sendo a MOT mensurada numa escala de 0 a 100% e o VE de 1 a 5.

A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada através da transferência de alíquotas de sêmen de 10 µL para 500 µL de solução tampão fosfato-salino com glutaraldeído a 0,2% aquecidos a 37 °C. Dessa mistura foram retirados 10 µL para serem analisados 200 espermatozoides por meio de microscópio de contraste de fase (Nikon® E100, Japão) com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, classificados com defeitos maiores (DMA) e menores (DME). Foi realizada a soma dos DMA e DME para determinar o número de espermatozoides com defeitos espermáticos totais (DT).

Para análise de integridade da membrana plasmática foram utilizadas alíquotas de sêmen coradas com solução de eosina-nigrosina (1,1 g de Eosina, 6,6, de Nigrosina, 0,5g de citrato de sódio e 100 mL de água destilada com pH entre 6,8 a 7,0), na proporção de 1:1 a 1:3. A mistura foi incubada à 36°C por um minuto para confecção do esfregaço em lâmina. Posteriormente as lâminas secaram em temperatura ambiente e foram armazenadas para contagem de 200 espermatozoides em microscópio ótico (Nikon® E100, Japão) com aumento de 400x, sendo considerados como viáveis aqueles que apresentavam cabeça não corada de rosa pela eosina (MARTINS et al., 2016)

Para avaliação de integridade de acrossomo (IA) foi utilizada a associação dos corantes Trypan Blue e Giemsa. Inicialmente foram misturados 40 µL de sêmen com 40 µL de solução corante Trypan Blue 0,4% (Merck®, Brasil) em tubo de 1,5 mL para serem incubados por 15 minutos a 36 °C. Posteriormente

foram feitos esfregaços a partir de amostras desta mistura (3  $\mu$ L a 4  $\mu$ L) que foram secos em fluxo de ar, para depois serem fixados em metanol por 5 minutos. Após este período, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para secarem e depois serem coradas por no mínimo 8 horas em solução de Trypan Blue e Giemsa. As lâminas foram lavadas em água corrente e secas naturalmente (MARTINS et al., 2016). Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de campo claro (Nikon® E100, Japão) em aumento 1000x utilizando óleo de imersão. Os espermatozoides foram classificados com cabeça azul e acrossomo rosa escuro (morto com acrossomo íntegro), cabeça azul com acrossomo descorado (morto com reação acrossomo), cabeça rosa clara com acrossomo rosa escuro (vivos com acrossomo íntegro), cabeça rosa clara com acrossomo descorado (vivos com reação acrossomo) (MARTINS et al., 2016).

### **3.7 Capacidade antioxidante *in vitro* do plasma seminal**

O plasma seminal foi obtido a partir das amostras de sêmen colhidas. Amostras de sêmen foram submetidas a 2 centrifugações, primeira a 1000 g por 10 min e segunda a 4000 g por 20 min. O sobrenadante referente ao plasma foi retirado e armazenado em temperatura de -20 C°, para posterior análise (GLANDER et al., 2002). Para as análises da capacidade antioxidante, as amostras de plasma foram descongeladas em temperatura ambiente, agitadas utilizando vortex mixer (Labnet®, EUA) por 10 seg, diluídas na proporção de 1:2 (15  $\mu$ L amostra e 30 $\mu$  de solução tampão de acetato com pH 3,6 e concentração de 0,3 M). Foi aplicado o método FRAP em triplicata, seguindo a mesma metodologia utilizada para os extratos descrita anteriormente.

### **3.8 Análise estatística**

Os dados dos compostos bioativos e das capacidades antioxidantes *in vitro* dos extratos de MO e F-MO foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 9.0®. Os dados ambos apresentaram homocedasticidade e distribuição normal comprovada pelo teste Shapiro-wilk, e posteriormente foram submetidos ao test t para análise dos dois grupos independentes e ANOVA de

uma via, adotando-se teste post-hoc de Tukey, para DPPH e ABTS.

Os dados de integridade da membrana e do acrossomo, bem como capacidade antioxidante total do plasma seminal foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Tukey.

Os demais dados da avaliação do sêmen foram analisados utilizando-se o programa computacional SAS 9.1®. Os dados não apresentaram homocedasticidade e distribuição normal e foram analisados com estatística não paramétrica. Depois foram submetidos à análise de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Wallis e de comparações de médias pelo teste Dunn. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Composição fitoquímica e capacidade antioxidante do feno de Moringa

#### 4.1.1 Quantificação de compostos bioativos

Os resultados dos teores dos compostos fenólicos totais e flavonoides no F-MO estão expostos na tabela 5. Observou-se que o F-MO não diferiu significativamente da MO quanto ao teor de fenólicos totais ( $P < 0,05$ ). Já em relação aos flavonoides, foi observada uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) demonstrando que o F-MO tem maior teor comparado a MO.

Tabela 5 Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato etanólico do feno e da Moringa *in natura*.

Amostra	Fenólicos totais (mg Eq AG/g)	Flavonoides (mg Eq CAT/g)
Feno de Moringa	33,38 ± 2,27 <sup>a</sup>	4,75 ± 0,38 <sup>a</sup>
Moringa <i>in natura</i>	33,64 ± 3,05 <sup>a</sup>	3,88 ± 0,30 <sup>b</sup>

mg Eq AG/g = miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama; mg Eq CAT/g = miligramas de equivalentes de catequina por grama; os dados são apresentados como média ± desvio padrão; Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras

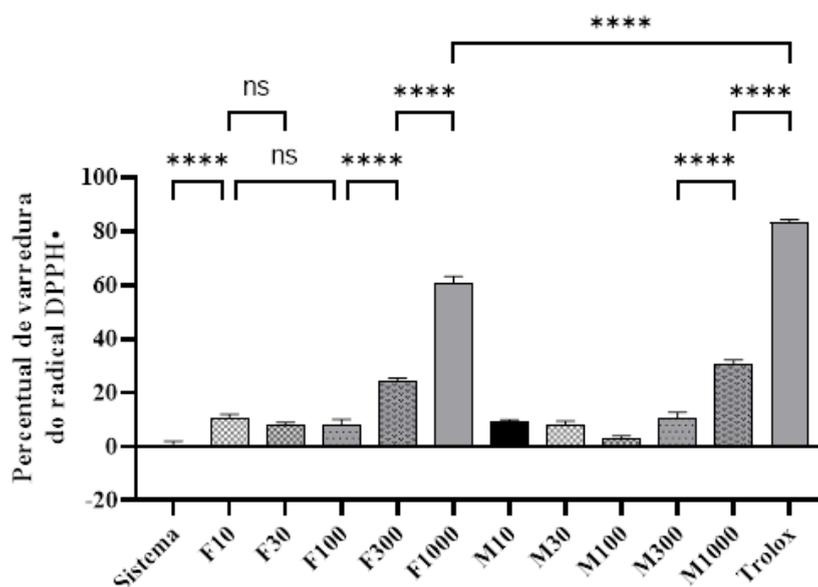
Os fenólicos totais formam um vasto grupo, que engloba uma gama de substâncias, com grande polaridade na maioria das vezes, reativos e susceptíveis à ação de enzimas. A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da

amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido a complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes. Os flavonoides se destacam entre os fenólicos, porém é menor que o mesmo possuindo uma atividade diferenciada (ANGELO; JORGE, 2007).

#### 4.1.2 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos do feno e da Moringa *in natura* foram avaliados por diferentes mecanismos incluindo capacidade antirradicalar e redutora, a partir de curvas de resposta preparadas em diferentes concentrações (3,10, 30, 100, 300 e 1000 µg).

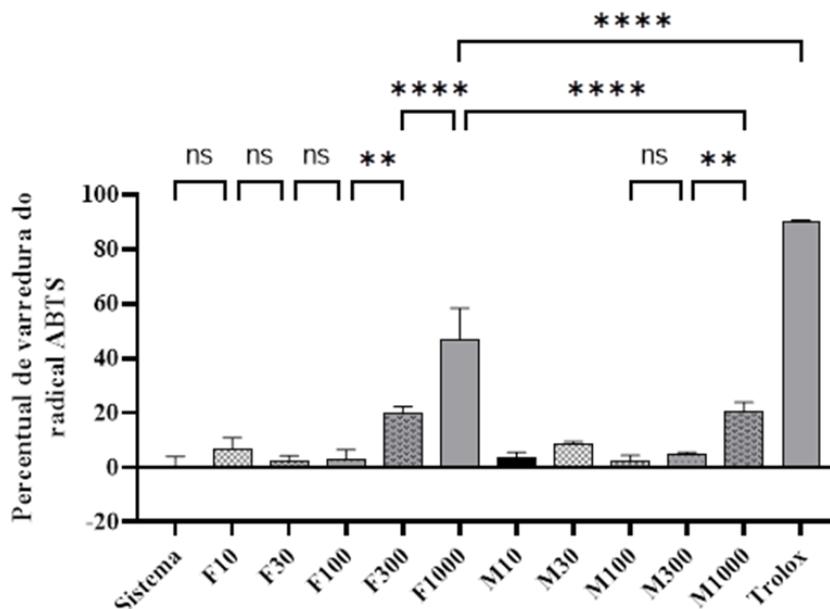
Na figura 1 é possível observar o percentual de varredura do radical DPPH dos extratos preparados em diferentes concentrações.



**Figura 1.** Análise de percentual de varredura do radical DPPH = Composto químico orgânico 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.

Sistema=radical sem oxidante; F10, F30, F100, F 300 e F 1000 = concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL do extrato de feno de Moringa; M 10, M 30, M100, M 300 e M 1000 = concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL do extrato de Moringa *in natura*; Trolox = antioxidante sintético derivado da vitamina E, \*\*\*\* = p valor, ns= não teve diferença significativa (p>0,05).

Na figura 2 é possível observar o percentual de varredura do radical ABTS dos extratos de feno e MO *in natura* preparados em diferentes concentrações.



**Figura 2.** Análise de percentual de varredura do radical ABTS = ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)  
 Sistema=radical sem oxidante; F10, F30, F100, F 300 e F 1000= concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL do extrato de feno de Moringa; M 10, M 30, M100, M 300 e M 1000 = concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL do extrato de Moringa *in natura*; Trolox = antioxidante sintético derivado da vitamina E, \*\*\*\* = p valor, ns= não teve diferença significativa (p<0,05).

Nos resultados encontrados no presente trabalho, os extratos de F-MO apresentaram alto poder redutor quando comparados ao da MO que apresentaram menor capacidade de redução de íons. Férricos.

As análises de DPPH, ABTS e FRAP demonstraram que o feno tem maior (P<0,05) capacidade antioxidante quando comparado com à MO *in natura* (Tabela 6).

Tabela 6. Capacidade antioxidante do extrato etanólico do feno e da Moringa *in natura*.

Amostra	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)	FRAP Eq Suf. Ferroso (1000 mg/mL)
Feno	802,00 ± 36,76 <sup>a</sup>	1091,78 ± 269,31 <sup>a</sup>	418,08 ± 18,17 <sup>a</sup>
Moringa <i>in natura</i>	1840,38 ± 160,45 <sup>b</sup>	2943,82 ± 460,20 <sup>b</sup>	146,83 ± 16,89 <sup>b</sup>

DPPH= Composto químico orgânico 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; ABTS= ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); FRAP= Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante de Redução do Ferro); Suf Ferroso= Sulfato Ferroso. IC<sub>50</sub> = Concentração inibitória média; Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as médias das amostras

## 4.2 Variação do peso vivo dos carneiros

O peso vivo dos carneiros alimentados com as dietas ao longo do experimento está exposto na Tabela 7.

Tabela 7. Pesos vivos (kg) dos carneiros alimentados com diferentes níveis de feno de *Moringa Oleifera* na dieta no decorrer do experimento

Grupo	Momentos			
	D1	D15	D30	D60
<b>G 0</b>	70,63 ± 9,01	73,11 ± 7,33	75,29 ± 7,93	74,17 ± 7,34
<b>G 10</b>	69,79 ± 7,13	76,09 ± 5,68	75,43 ± 6,26	80,83 ± 7,47
<b>G 20</b>	69,47 ± 8,04	80,15 ± 14,03	79,75 ± 11,70	81,85 ± 15,62
<b>G 30</b>	67,56 ± 7,08	72,20 ± 6,21	77,29 ± 6,96	78,09 ± 8,96

G0= 0% de moringa; G10= 10% de moringa; G20= 20% de moringa; G30= 30% de moringa.

## 4.3 Análises seminais e espermáticas

A Tabela 8 apresenta os resultados referentes às análises do sêmen, demonstrando que os grupos experimentais não diferiram ( $p > 0,05$ ) quanto aos parâmetros analisados.

Tabela 8. Avaliações do sêmen realizadas no decorrer do experimento em carneiros alimentados com diferentes níveis de feno de *Moringa Oleifera*.

COLETAS	ANÁLISES	GRUPOS					
		G0	G10	G20	G30	MÉDIA	E. P
D1	VL (mL)	1,200	1,050	1,216	1,366	1,208	1,735
	CON (x 10 <sup>9</sup> sptz/mL)	1,359	1,401	3,485	5,347	2,898	0,159
	MOT (%)	66,666	70,000	75,000	71,666	70,833	0,686
	VE (1-5)	3,000	3,000	3,666	3,333	3,250	5,529
	DT (%)	4,042	4,042	1,667	4,833	3,646	0,124
	IA (%)	0,250	0,000	0,200	0,000	0,113	0,066
D15	VL (mL)	0,816	1,266	0,733	1,100	0,979	0,124
	CON (x 10 <sup>9</sup> sptz/mL)	2,353	1,251	2,231	3,638	2,368	0,490
	MOT (%)	71,666	73,333	71,666	71,666	72,083	0,417
	VE (1-5)	3,166	3,166	3,166	3,166	3,166	0,000
	DT (%)	9,625	9,625	2,250	4,042	6,386	1,906
	IA (%)	0,000	0,000	1,000	0,833	0,458	0,267
D30	VL (mL)	1,116	1,200	1,000	1,200	1,129	0,047
	CON (x 10 <sup>9</sup> sptz/mL)	3,166	1,230	3,095	3,216	2,677	0,483
	MOT (%)	70,000	73,333	73,333	68,333	71,250	1,250
	VE (1-5)	3,166	3,166	3,333	3,166	3,208	0,048
	DT (%)	6,583	6,583	17,250	10,875	10,323	2,521
	IA (%)	32,830	57,166	47,500	65,500	50,749	7,014
D45	VL (mL)	1,116	1,016	0,800	1,283	1,054	0,101
	CON (x 10 <sup>9</sup> sptz/mL)	2,818	2,490	1,569	3,733	2,653	0,447
	MOT (%)	68,333	76,666	73,333	75,000	73,333	1,800
	VE (1-5)	3,166	3,166	3,333	3,333	3,250	0,056
	DT (%)	11,417	11,417	8,833	7,042	9,677	1,069
	IA (%)	0,000	0,000	6,333	0,333	1,667	1,557
D60	VL (mL)	1,083	1,166	1,033	1,083	1,091	0,028
	CON (x 10 <sup>9</sup> sptz/mL)	2,747	1,472	3,125	1,377	2,180	0,444
	MOT (%)	71,666	75,000	76,666	78,333	75,416	1,423
	VE (1-5)	3,333	3,333	3,666	3,833	3,541	0,125
	DT (%)	4,500	4,500	2,083	1,292	3,094	0,828
	IA (%)	3,666	37,000	16,500	0,333	14,37475	8,308

G0 = 0% de moringa; G 10 = 10% de moringa; G 20= 20% de moringa; G 30= 30% de moringa; D1= Primeira coleta; D15= Segunda coleta; D30= Terceira coleta; D45= Quarta coleta; D60= Quinta coleta; VL=Volume do sêmen; CON= Concentração espermática; MOT= Motilidade espermática; VE= Vigor espermático; IA= Integridade de acrossomo; DT= defeitos totais; E P= Erro Padrão.

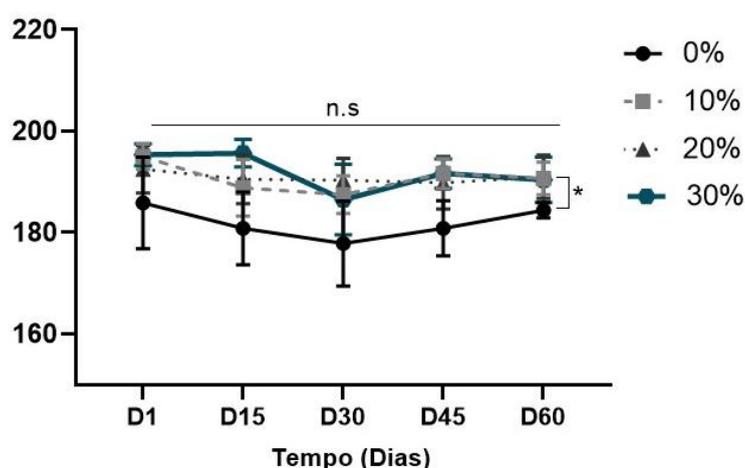
O volume de sêmen obtidos no presente estudo ficaram entre os valores normais relatados para a espécie variando de 0,5 a 2,0 ml (MAIA et al., 2011),

que variam a depender do método de coleta, da quantidade de serviços, entre outros. Syarifuddin et al. (2021) também não observaram alterações no volume do sêmen de bodes alimentados com dieta contendo folhas de MO, alegando que o resultado pode ter ocorrido devido ao baixo uso das folhas de MO.

Os valores de MOT e VE encontrados no presente trabalho são considerados próximos ou iguais aos valores mínimos para classificar os carneiros como aptos à reprodução segundo e classificam os animais está de acordo com esta recomendação.

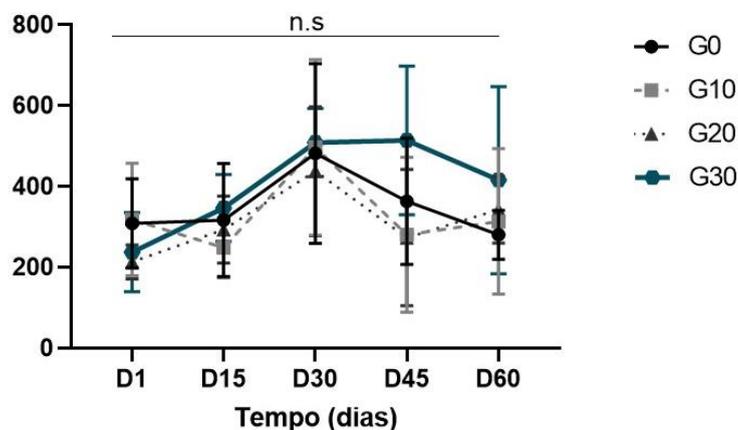
A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides apresentou diferenças altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos que receberam dieta contendo F-MO em comparação com o grupo controle independente da quantidade e do dia de administração. Estudos anteriores com ovinos, caprinos e bovinos demonstram efeitos positivos da ingestão da moringa nos parâmetros avaliados (ANGGARA et al., 2021; SHOKRY et al. 2020; SYARIFUDDIN et al., 2021).

Estes resultados podem ter sido obtidos em consequência da melhora no desenvolvimento das células germinativas, resultando na diminuição redução da peroxidação lipídica, da geração de radicais livres que prejudicam essas células e aumento do sistema de defesa antioxidante.



**Figura 3.** Análise da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides no sêmen de carneiros alimentados com dietas contendo diferentes quantidades de feno de Moringa (F-MO). \* Significa diferença ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos alimentados com dietas contendo F-MO Moringa (G10, G20 e G30) quando comparados ao controle (G0) em todos os momentos avaliados (D1,

D15, D30, D45 e D60). n.s significa que não houve diferença entre os momentos dentro do mesmo grupo.



**Figura 4.** Capacidade antioxidante total do plasma seminal em carneiros alimentados com dietas contendo diferentes quantidades de feno de Moringa (F-MO). n.s significa que não houve diferença dentro do mesmo grupo em relação aos momentos avaliados.

A presença de enzimas antioxidantes no plasma seminal ovino também pode contribuir para a manutenção da qualidade do sêmen contra os danos oxidativos influenciando sua fertilidade (CAVALCANTE et al. 2013). Entretanto não foi observada diferenças significativas entre os grupos para capacidade antioxidante total do plasma seminal (FIGURA 4).

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o feno potencializa a capacidade antioxidante da *Moringa oleifera* e que sua presença na composição de dietas aumenta o potencial reprodutivo de carneiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGUN M.K.; AYE P.A. Growth performance and economic analysis of West African Dwarf Rams fed Moringa oleifera and cotton seed cake as protein supplements to Panicum maximum. **American Journal of Food and Nutrition**, v. 3, p. 58-63, 2013.
- ANGGARA, F. D.; YUSUF, M.; TOLENG, A. L.; SAHIRUDDIN; MASTURI; HASRIN. Supplementation of Moringa (Moringa oleifera) leaf meal block on the quality of Bali bull semen. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v 788, 012144, 2021.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, vol. 66, nº1, São Paulo, 2007.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 79-85, v.34, n.2, 2010.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p.17–25, 2007.
- ARAÚJO, E. A. B.; SILVA, L. F. M. C.; OLIVEIRA S.N.; DALANEZI F.M.; ANDRADE JUNIOR L. R. P.; SOUZA F. F.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, p. 70-83, v. 24 (1), 2017.
- AYE P.A; ADEGUN M. K. Chemical Composition and some functional properties of Moringa, Leucaena and Gliricidia leaf meals. **Agriculture and biology journal of north america**. v.4, n.1, p. 71-77, 2013.
- BRAND -WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C.: Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v. 28 (1), p.25–30, 1995.
- CAVALCANTE, J.M.M.; AGUIAR, G.V.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.; MOURA, A.A.A.; NUNES, J.F. Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. , v.37, n.3, p.254-259, 2013.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal., v.3, p.15-26, 2013.
- DAMIÁN, J. P.; UNGERFELD, R. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal., physiological., biochemical., haematological and behavioural parameters. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 646-650, 2011.
- DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. Métodos para análises de alimentos – INCT – **Ciência Animal Suprema**. Ed. UFV, p. 214, 2012.
- DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P. L.; KERSHAW-YOUNG, C. M.; BATHGATE, R.; GIBB Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C. G.; GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, v. 91, p.13-22, 2013.
- 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. **Food Research. International**. v. 106, p. 317–334. 2018.
- FLIEGER, J.; FLIEGER, W.; BAJ, J. Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. **Materials**, v. 14, p. 4135, 2021.

GLANDER, H.J., LAMMERT, A., PAASCH, U., GLASOW, A., KRATZSCH, J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. **Andrologia**, v. 34, p.227–233, 2002.

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J.; The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

KOTHARI S.; THOMPSON, A; AGARWAL, A.; PLESSIS S. S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 425-435, 2010.

LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16 (6), p. 12791–12835, 2015.

LIMA, I. C. S. **Variações no perfil protéico e atividade antioxidante do plasma seminal e funções espermáticas associadas a potenciais condições de estresse térmico em bodes saanen criados no Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -Universidade Federal do Ceará-, Fortaleza- CE, p. 38-39, 2011.

LIMA, T. S. **Utilização do Feno de Moringa (moringa oleifera lam) na alimentação de suínos em crescimento e terminação**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco Universidade Federal da Paraíba / Universidade Federal do Ceará, Departamento de Zootecnia da UFRPE, Recife, p.86, 2016.

LISITA, F. O.; JULIANO, R. S.; MOREIRA, J. S. **Cultivo e Processamento da moringa na Alimentação de Bovinos e Aves**. Corumbá: Embrapa Pantanal., 2018.

MAIA, M.S., BICUDO S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 33, p. 183–193, 2009.

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p.175-179, 2011.

MARTINS, C. F., DODE, M.A.N., FELICIANO SILVA, A. E. D. Atlas de morfologia espermática bovina. 1ª ed., Brasília, Embrapa, p. 24-26, 2016.

MOUSA, A. A.; GANSH H. A. E.; ELDAIM, M. A. A.; MOHAMED M. A. E.; MORSI, A. H.; SABAGH, H. S. E. Protective effect of *Moringa oleifera* leaves ethanolic extract against thioacetamide – Induced hepatotoxicity in rats via modulation of cellular antioxidant, apoptotic and inflammatory markers. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, n. 31, 2019.

MOULA A. B., AMIRI, B. Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep: An updated review. **Small Ruminant Research**. v. 215: 106759, 2022.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. 1.ed. Washington, DC, USA: National Academy Press, p.362, 2007.

NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamífero. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.15, n.1, p.1-15, 2014.

OLIVEIRA, M. V. M; CHIODI, M. D. S; FERNANDES, H. J.; LISITA, F. O.; LUZ, D. F.; SALLA, L. E. *Moringa oleifera* na alimentação de bezerros lactentes da raça Pantaneira. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**., v.18, n.1, p.152-160, 2017.

OLIVEIRA, P. V. C.; OLIVEIRA, P. V. C.; RODRIGUES, S. C.; MELO, A. M. P.; LIMA, R. N. S.; NETO, C. O. A. Utilização de moringa oleifera na alimentação animal. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 53881-53893, 2020.

O'FLAHERTY; C., LAMIRANDE; E., GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 528–540, 2006.

SÁ, K. A. L. **Digestibilidade nutricional e energética do resíduo de goiaba e feno de moringa oleifera em suínos em crescimento**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, p.57, 2018.

SHOKRY, D. M.; BADR, M. R.; ORABI, S. H.; KHALIFA, H. K., EL-SEEDI, H. R.; ABD ELDAIM, M. A. Moringa oleifera leaves extract enhances fresh and cryopreserved sêmen characters of Barki rams. **Theriogenology**. v.153, p.133-42, 2020.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 235, 2002.

SILVA, G. V.; SOUTO J. S.; SANTOS, J. B. Cultivo de moringa: importância nutricional, uso e aplicações. **Meio Ambiente**, v.1, n.3. p.023-032, 2019.

SOARES, T. F. S. N.; SILVA, A. V. C.; MUNIZ, E. N. Moringa leaf extract: A cost-effective and sustainable product to improve plant growth. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 171-176, 2021.

SOBRAL., A. J. S.; MUNIZ, E. N. SILVA, C. N. Caracterização da Moringa oleifera Lam e sua utilização na alimentação animal. **Ciência Animal.**, v.30, n.2, p.68-79, 2020.

SWAIN, T., HILLS, W.E. The phenolic constituents of Punnus domestica. Iquantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 19, p.63–68, 1959.

SYARIFUDDIN, N.A.; RIZAL, M.; RIYADHI, M.; WAHDI, A. Semen quality of etawah crossbreed bucks fed with urea Moringa Molasses multinutrient block supplemented with native grass basal feed. **Advances in Biological Sciences Research**, v. 17, p.215-223, 2021

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.30-33, 2010.

TOKER, M. B.; ALCAY, S.; GOKCE, F.; USTUNER, B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. **Cryobiology**. v.72, p.205-209, 2016.

VALDÉS, A.M.R.; VÁZQUEZ, H.E.M.; BRAMBILA, E.A.S. Efecto de los flavonoides sobre los parámetros seminales en pacientes con oligoastenoteratozoospermia uso de flavonoides em oligoastenoteratozoospermia. **Colegio Mexicano de Urologia Nacional A.C.**, v. 17, p.62-65, 2011.

VALENÇA, R. M. B; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**.v.31, n.1, p.47-53, 2007.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. **Journal Animal Science**. V. 26, n.1, p.119-120, 1967.