

Influência da sazonalidade e maturação nos teores de fibras de *Moringa oleifera*

Influence of seasonality and maturation on the levels of fibers of *Moringa oleifera*

RESUMO

Letycia Alyne Matei

letyciam@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

tatianeoldoni@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Cintia Boeira Batista Lafay

cintiabbatista@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Suelen dos Santos

suelensantos@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

O cultivo da planta *Moringa oleifera*, se espalhou por vários continentes chegando até a América do Sul. Amplamente cultivada por possuir teores de proteínas e fibras, fatores que estimulam estudo sobre essa planta. Este trabalho teve como objetivos: (I) otimizar os métodos de determinação de proteínas através da metodologia de Bradford e determinação de fibras por detergente neutro (FDN) e detergente ácido (FDA); (II) determinar a influência da sazonalidade e estádios de maturação em amostras de *M. oleifera* cultivadas em Santa Catarina, Bahia e São Paulo. A utilização da metodologia para a determinação de proteínas não foi eficiente, pois, não foi obtida linearidade para o gráfico de calibração. O método de FDN e FDA, se mostrou um método eficaz, apresentando valores para FDN de 14,22% a 40,78%, já os valores de FDA variaram de 5,84% a 22,87%. Com o auxílio do Teste de Tukey, foi possível estabelecer que as estações do ano apresentaram influência significativa nos teores de FDN e FDA das amostras analisadas. No inverno as folhas apresentaram os maiores valores para FDN e FDA e na primavera os menores teores. Assim, concluímos que as condições climáticas afetam os teores de fibras presentes na planta.

PALAVRAS-CHAVE: Proteínas. Fibras. Composição centesimal.

ABSTRACT

The cultivation of the *Moringa oleifera* plant, spread over several continents reaching South America. Widely cultivated for having proteins and fibers, factors that stimulate study on this plant. This work had as objectives: (I) to optimize the methods of determination of methods through the methodology of Bradford and determination of fibers by neutral detergent (FDN) and acid detergent (FDA); (II) to determine the influence of seasonality and maturation stages in *M. oleifera* cultivated in Santa Catarina, Bahia and São Paulo. The use of the methodology for the determination of proteins was not efficient, because no linearity was obtained for the calibration graph. The FDN and FDA method, if shown to be an effective method, values for FDN from 14.22% to 40.78%, whereas the FDA values vary from 5.84% to 22.87%. With the aid of the Tukey test, it was possible to establish that the seasons dissipating influence on the levels of FDN and FDA of the analyzed samples. In winter, the smaller leaves have the highest values for FDN and FDA and in the spring, the lowest levels. Thus, we conclude that climatic conditions affect the fiber content present in the plant.

KEYWORDS: Proteins. Fibers. Centesimal composition.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* é uma planta originária do nordeste da Índia e é considerada uma erva medicinal, tem seu emprego na suplementação alimentar devido aos elevados teores nutricionais (Kou et al., 2018). Segundo Sánchez-Machado et al., (2010), partes da planta foram utilizadas na alimentação de populações onde a *M. oleifera* é naturalmente encontrada e as folhas apresentaram valores elevados de proteínas e seus frutos apresentaram elevados teores de fibras, comprovando que essa planta pode ser incluída na alimentação humana. Devido às suas características biológicas, seu plantio estendeu-se para outros continentes, chegando a América do Sul, tendo se adaptado bem às regiões mais quentes do Brasil. Sabendo que a *M. oleifera* é uma planta extremamente versátil e que pode ser encontrada em várias regiões do mundo, por possuir alta adaptabilidade, estudos indicam que os teores de proteínas e fibras, podem variar devido a influência da sazonalidade da planta e estágio de maturação da planta (Macambira et al., 2018).

As proteínas são extremamente importantes no funcionamento do organismo, são capazes de desempenhar processos enzimáticos, hormonais, até mesmo como neurotransmissores. Um dos principais métodos utilizados para determinação de proteínas é o método de Bradford (1976). Este método utiliza o reagente Coomassie brilliant blue (BG-250), e é conhecido pela sua rapidez e sensibilidade, além de sofrer menos interferência do que outros métodos.

A fibra alimentar representa a parcela de carboidratos responsáveis por fornecer aos microrganismos energia para realizarem suas funções no aparelho digestivo. A determinação da fibra alimentar, pode ser feita pelos métodos de fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), sendo que há alguns anos, pesquisadores sugerem que os resultados obtidos pela determinação de FB, não demonstravam um elevado nível de confiabilidade devido ao fato de não representar o valor exato de fibras presente na amostra analisada (Neumann, 2002).

O método desenvolvido por Van Soest (1963), utiliza o detergente neutro para a separação da fração solúvel (conteúdo celular) e o que não é dissolvido nesse detergente é chamado de fibra em detergente neutro, constituída por celulose, hemicelulose, lignina, proteína danificada pelo calor e cinzas. Em 1967, Van Soest continuou aprimorando seus métodos de determinação de fibras em plantas, utilizando um ácido capaz de solubilizar os açúcares, amidos, hemiceluloses, proteínas, resultando assim no detergente ácido.

Apesar dos métodos de Van Soest demonstrarem aceitação rápida, por sua baixa eficácia, novos métodos com modificações surgiram, sendo possível citar o método de Berchielli et al. (2001), onde utiliza-se o *Filter Bag Technique* (FBT) da Ankom, visando facilitar o procedimento de análise, pois o ensaio é realizado dentro de um digestor, pela utilização de filtros em formato de saquetas. Os mesmos são acondicionados dentro do digestor garantindo a homogeneização das amostras e permitindo a análise de um número maior de amostras diariamente.

Observando que os estudos de determinação da composição nutricional das folhas da *M. oleifera* são escassos no Brasil, este estudo teve como objetivos: (I) otimizar os métodos de determinação de proteínas por meio da metodologia de Bradford e determinação de fibras por detergente neutro (FDN) e detergente ácido (FDA); (II) determinar a influência da sazonalidade e estádios de maturação em amostras de *M. oleifera* cultivadas em Santa Catarina, Bahia e São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de *M. oleifera* foram enviadas por produtores dos seguintes locais: Itajaí, Santa Catarina (SC); Silveira, São Paulo (SP); Santa Cruz de Cabralia, Bahia (BA), coletadas no verão, outono, inverno e primavera e em dois estádios de maturação: planta jovem (40 dias de brotação) e madura (80 dias de brotação). As amostras foram enviadas secas e trituradas e as análises foram realizadas em triplicata. Foram analisadas 78 amostras, sendo 6 delas, amostras de branco, para fins de cálculos posteriores.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Para a realização da análise de proteínas totais, segundo Bradford (1976), foi pesado 1 g do material vegetal, previamente triturado, acondicionado em um almofariz em conjunto com 10 mL da solução tampão de fosfato de potássio (0,2 M, pH 7,5). Em seguida essa mistura foi macerada e em torno de 2 mL foi centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Cerca de 25 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e adicionados 225 µL de tampão e cerca de 0,5 mL do reagente de Bradford. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. O padrão de albumina de soro bovino (BSA) 100 µg mL⁻¹, foi utilizado para a leitura da curva, as quantidades utilizadas em cada ponto da curva estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Curva padrão utilizando o padrão BSA.

Pontos da curva padrão	BSA (mL)	Proteína (µg)	Solução tampão (mL)	Reagente de Bradford (mL)
0	0	0	0,5	1,0
1	0,1	10	0,4	1,0
2	0,2	20	0,3	1,0
3	0,3	30	0,2	1,0
4	0,4	40	0,1	1,0
5	0,5	50	0	1,0

Fonte: Bradford (1976).

DETERMINAÇÃO DE FDN E FDA

Para a realização da análise é necessário o preparo de dois detergentes seguindo o método de Van Soest (1963, 1967). Para o preparo de um litro de detergente neutro: um litro de água destilada, 30,0 g de sulfato de sódio, 18,61 g de EDTA sal dissódico, 6,81 g de borato de sódio hidratado, 4,56 g de fosfato ácido de sódio anidro e 10 mL de trietilenoglicol. Para o preparo do detergente ácido, segundo Silva (1990), foram utilizados 20 g de brometo-cetil-trimetilamônio em uma solução de ácido sulfúrico (27,7 mL de ácido sulfúrico em 1 L de água destilada).

Segundo o método FBT utilizou-se 0,5 g de amostra de *M. oleifera*, as quais foram acondicionadas dentro das saquetas, com dimensões de 6 cm x 6 cm e seladas com o auxílio da seladora. Foram utilizados aproximadamente 2 L de detergente (ácido ou neutro) para cada bateria com capacidade de 30 saquetas. As saquetas ficaram em fervura a 98°C no determinador de fibras durante 60 minutos e na sequência foram realizadas 3 lavagens com água destilada em fervura durante 10 minutos cada. Em seguida, as saquetas foram retiradas do determinador de fibras e lavadas com acetona e água destilada por 5 minutos cada. Para a etapa de secagem as mesmas ficaram em estufa por cerca de 10 horas a 105°C. A pesagem foi realizada após retirar as saquetas e aguardar que as mesmas atingissem temperatura ambiente.

Foi utilizado o método de Van Soest modificado e citado por Berchielli et al. (2001), realizando primeiramente a determinação de fibras por detergente neutro, sendo possível o cálculo da porcentagem de FDN seguindo a Eq. (1). Onde P_1 : peso da saqueta vazia; P_2 : peso da amostra; P_3 : peso após a digestão; C_1 : correção da saqueta branca (peso final após a secagem/peso original).

$$\%FDN = \frac{(P_3 - (P_1 * C_1)) * 100}{P_2} \quad (1)$$

Para a determinação de fibras por detergente ácido, utilizou-se Eq. (2), onde: P_1 : peso da saqueta vazia; P_2 : peso da amostra; P_3 : peso após a digestão; C_1 : correção da saqueta branca (peso final após a secagem/peso original).

$$\%FDA = \frac{(P_3 - (P_1 * C_1)) * 100}{P_2} \quad (2)$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos de FDN e FDA, foram analisados utilizando a Análise Hierárquica de Componentes (HCA) no *software* ChemoStat e o coeficiente de variação (CV) no Excel. O emprego do HCA e do CV é necessário para avaliação da qualidade dos ensaios, sendo possível indicar a confiabilidade dos resultados obtidos. Após a avaliação da qualidade do ensaio pelos valores obtidos das triplicatas dos dados é realizada a análise de variância e teste de média de Tukey a 5 % de probabilidade para verificar as diferenças significativas entre as variáveis. O programa estatístico computacional utilizado foi o *software* Sisvar versão 5.6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método espectrofotométrico de determinação de proteínas de Bradford foi testado com as amostras de *M. oleifera* com o principal objetivo de realizar uma comparação com o método de Kjeldhal, visando otimizar um método que apresentasse eficácia e rapidez na análise de um número elevado de amostras. Porém, após algumas tentativas de obtenção da curva padrão, não foi possível estabelecer uma relação linear entre as absorções e as concentrações do padrão albumina. Apesar de ser um método rápido e que apresenta eficácia, o mesmo está sujeito a interferentes, que podem interferir na Lei de Lambert-Beer, podendo ser ocasionado pela variação da absorvidade de proteínas específicas devido à baixa solubilidade, ou até mesmo pela pureza do reagente BG-250 (Stoscheck, 1990).

O método de determinação de FDN e FDA, foi realizado em triplicata para as 24 amostras de *M. oleifera*, totalizando 72 repetições. Por resultar em um número elevado de amostras, se fez necessário o emprego de ferramentas estatísticas. Utilizou-se a princípio o coeficiente de variação (CV), para cada amostra englobando suas triplicatas. Percebendo que algumas amostras apresentaram o valor de %CV elevado e para garantir a homogeneidade entre amostras, empregou-se a ferramenta quimiométrica de Análise Hierárquica de Componentes (HCA). Utilizando a HCA, foi possível identificar as replicatas que não estavam de acordo com as demais, o que influenciava no valor do CV. Foram retiradas 12 replicatas irregulares, para que não afetassem na análise do padrão geral da análise de fibras.

Ao realizar o Teste de Tukey, responsável por verificar qual variável atrelada ao teste apresentaria um valor inferior a 0,05 ($\alpha = 0,05$ %), foi possível observar que dentre os valores obtidos para a determinação de FDN e FDA, o valor que ficou abaixo de 0,05, foi da variável correspondente às estações do ano. Ou seja, a significância exata associada ao efeito das estações do ano é igual a 0,0001, demonstrando assim que, o risco de se rejeitar incorretamente a hipótese é próximo a zero. Os valores médios de FDN e FDA são apresentados nas Tabela 2 e 3.

Tabela 2 – Valores médios de FDN para as folhas de *M. oleifera* nas diferentes estações do ano, região e estágio de maturação: J(Jovem) e M(Maduras)

FDN				
Estações	Regiões			Média
	Sul	Sudeste	Nordeste	
Verão	14,59 ^J	29,56 ^J	16,58 ^J	24,64 ab
	34,85 ^M	37,57 ^M	14,68 ^M	
Outono	14,38 ^J	14,95 ^J	32,48 ^J	22,07 a
	14,22 ^M	15,77 ^M	40,64 ^M	
Inverno	36,74 ^J	40,78 ^J	16,83 ^J	31,31 b
	33,96 ^M	38,07 ^M	21,51 ^M	
Primavera	15,10 ^J	19,59 ^J	19,80 ^J	17,09 a
	16,28 ^M	15,85 ^M	15,91 ^M	
Média	22,51 ns	26,51 ns	22,30 ns	

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 2 – Valores médios de FDA para as folhas de *M. oleifera* nas diferentes estações do ano, região e estágio de maturação: J(Jovem) e M(Maduras)

FDA				
Estações	Regiões			Média
	Sul	Sudeste	Nordeste	
Verão	6,06 ^J	8,96 ^J	7,48 ^J	9,16 a
	13,65 ^M	11,83 ^M	6,96 ^M	
Outono	5,84 ^J	7,18 ^J	13,37 ^J	9,97 a
	6,02 ^M	7,61 ^M	19,79 ^M	
Inverno	16,84 ^J	22,87 ^J	9,21 ^J	15,29 b
	19,94 ^M	12,13 ^M	10,76 ^M	
Primavera	8,89 ^J	11,64 ^J	11,22 ^J	10,37 a
	9,48 ^M	10,70 ^M	10,31 ^M	
Média	10,84 ns	11,14 ns	11,61 ns	

Fonte: Autoria própria (2020).

*Os valores são expressos como média \pm DP (n = 3). Os valores médios com letras diferentes, na mesma coluna, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). n.s = não significativo.

É possível observar que a média obtida para a estação inverno apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao ser comparada com as demais estações do ano, apresentando ainda, os maiores valores, para ambas as análises, FDN e FDA. Com isso, pode-se ressaltar que as condições climáticas pelas quais a planta é submetida, faz com que a mesma apresente maiores ou menores valores de fibras em sua composição. As médias obtidas a partir dos valores das diferentes regiões onde a planta foi cultivada indicam que esta variável não afeta de forma significativa os teores de fibras da planta *M. oleifera*.

Os teores obtidos para FDN, ficaram próximos aos valores relatados por Foidl et al., (2003) e Mendieta-Araica et al., (2012). Alguns valores de FDA ficaram abaixo dos apresentados na literatura, porém é válido ressaltar que as amostras coletadas e analisadas, foram de lugares diferentes dos utilizados nas referências, pois atualmente no nosso país a pesquisa realizada com a *M. oleifera* é escassa. A maior quantidade de fibras é encontrada nos talos da planta, já as folhas, possuem um teor maior de proteínas do que de fibras. Sendo assim, a proporção caule:folhas, influencia diretamente nos valores de fibras das amostras (Lima, 2016).

Alguns estudos indicam que os teores obtidos para diversas análises, foram maiores para as amostras que foram coletadas no inverno, podendo ser explicado pelo fato de que a árvore da *M. oleifera* amadurece no inverno, elevando assim os teores analisados, segundo Iqbal & Bhangar (2006), as diferentes localidades onde as amostras foram coletadas, pouco interferiram nas análises efetuadas. Segundo Sreelatha & Padma (2009), a coleta das amostras analisadas em dois estádios de maturação, apresentaram baixa diferença nos resultados obtidos.

Segundo Kakengi et al. (2005), que analisou diferentes partes da *M. oleifera*, os valores de FDN e FDA obtidos foram de 11,1% e 7,9% respectivamente. Já para folhas e talos, os valores de FDN e FDA foram 37,6% e 26,7%, respectivamente. É possível concluir que a quantidade de folhas e talos na amostra analisada impacta diretamente os valores de fibras.

CONCLUSÃO

É possível concluir que os métodos de determinação de FDN e FDA, são formas mais confiáveis de determinar a quantidade de fibras presente em amostras de *M. oleifera*, do que apenas pelo método de determinação de fibra bruta. Pode-se concluir também que as estações do ano impactaram significativamente nos resultados obtidos para FDN e FDA, já os outros fatores, como regiões de cultivo e estádios de maturação não afetaram os valores obtidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Fundação Araucária, Central de Análises e Laboratório de Análises Agroindustriais (LAQUA).

REFERÊNCIAS

KOU, X. *et al.* Nutraceutical or Pharmacological Potential of *Moringa oleifera* Lam. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 343, feb./mar. 2018.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. *et al.* Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 175-180, jun./sep. 2010.

MACAMBIRA, G.M. *et al.* Caracterização nutricional das folhas de *Moringa oleifera* (MOL) para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 570-578, jan./abr. 2018.

Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 248-254, jan. 1976.

NEUMANN, N. **Avaliação, composição, digestibilidade e aspectos metabólicos da fibra**. In: Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal (VET00036) do programa de pós-graduação em ciências veterinárias da UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, p. 122, 2002.

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. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 829-835, oct. 1963.

BERCHIELLI, T. T. *et al.* Avaliação da Determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKOM. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, Minas Gerais, v. 30, n. 5, p. 1572-1578, jan. 2001.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa, p. 166, 1990.

STOSCHECK, C. M. Increased uniformity in the response of the Coomassie blue G protein assay to different proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 184, n.1, p. 111–116, jan. 1990.

FOIDL, N.; MAYORGA, L.; VÁSQUEZ, W. **Utilización del marango (Moringa oleifera) como forraje fresco para ganado**. 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/AGAP/FRG/Agrofor1/Foidl16.htm>>. Acesso em: 30 de jul. 2020.

MENDIETA-ARAICA, B. *et al.* Biomass production and chemical composition of Moringa oleifera under different planting densities and levels of nitrogen fertilization. **Agroforest Systems**, v.87, n.1, p.81–92, jun. 2012.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of Moringa oleifera leaves grown in Pakistan. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6:7, p. 544–551, may 2006.

SREELATHA, S.; PADMA, P.R. Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, n. 4, p. 303-311, nov. 2009.

KAKENGI, A. M. V. *et al.* Can Moringa oleifera be used as a protein supplement for ruminants? **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.18, n.1, p. 42-47, feb./nov. 2005.