

## ***In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of leaves and aqueous extract of four medicinal plants with phytobiotic potential in animal production**

### **Actividad antimicrobiana y antioxidante *in vitro* de hojas y extracto acuoso de cuatro plantas medicinales con potencial fitobiótico en la producción animal**

R. Aroche<sup>1,2</sup>, X. Jiang<sup>2</sup>, R. Rodríguez<sup>3</sup>, X. Li<sup>2</sup>, Carolina Avellaneda<sup>4</sup> and Y. Martínez<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba.

<sup>2</sup>Key Laboratory of Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.

<sup>3</sup>Centro de Estudio de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba.

<sup>4</sup>Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

\*Email: ymartinez@zamorano.edu

R. Aroche: <https://orcid.org/0000-0002-3940-1026>

X. Jiang: <https://orcid.org/0000-0002-8799-3572>

R. Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0003-2641-1767>

X. Li: <https://orcid.org/0000-0003-2047-9840>

Carolina Avellaneda: <https://orcid.org/0000-0001-9759-1078>

Y. Martínez: <https://orcid.org/0000-0003-2167-4904>

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and antioxidant properties of leaves and aqueous extracts from four medicinal plants (*Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, *Morinda citrifolia*, and *Moringa oleifera*). Six bacterial strains were used in the study, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was determined for leaves, while the minimum inhibitory concentration (MIC) and MBC were evaluated for aqueous extracts. Additionally, the *in vitro* antioxidant activity was measured using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, and secondary metabolites were identified and quantified by ultra-high-performance liquid chromatography. Results showed that *A. occidentale* and *P. guajava* had the highest antimicrobial activity against all bacterial strains, likewise, these medicinal plants also demonstrating the highest antioxidant activity. *A. occidentale* had a high concentration of quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, kaempferol-7-O-glucoside, quercetin, caffeic acid, and cinnamic acid in its leaves. In conclusion, *A. occidentale* and *P. guajava* are the most effective plants in terms of *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity in their leaves and aqueous extracts, while *Moringa oleifera* has good antioxidant activity but no bactericidal effect, and *Morinda citrifolia* has no antimicrobial or antioxidant effect.

Keywords: *antimicrobial activity, bactericidal, fine powder, leaves, secondary metabolite, antioxidant*

Currently, there is a growing interest in researching natural alternatives to subtherapeutic antibiotics, particularly medicinal plants that possess beneficial phytochemical compounds and exhibit antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties (Oanh *et al.* 2023). Various studies have demonstrated that phytochemical compounds can enhance the genetic expression of farm animals in different production

El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes *in vitro* de hojas y extractos acuosos de cuatro plantas medicinales (*Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, *Morinda citrifolia* y *Moringa oleifera*). En el estudio se utilizaron seis cepas bacterianas y se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) para las hojas, mientras que para los extractos acuosos se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la CMB. Además, la actividad antioxidante *in vitro* se midió utilizando 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo y los metabolitos secundarios se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución. Los resultados mostraron que *A. occidentale* y *P. guajava* tuvieron la mayor actividad antimicrobiana contra todas las cepas bacterianas, así mismo, ambas plantas medicinales también demostraron la mayor actividad antioxidante. *A. occidentale* tuvo una alta concentración de quercetina 3-O-glucósido-7-O-ramnósido, kaempferol-7-O-glucósido, quercetina, ácido cafeico y ácido cinámico en sus hojas. En conclusión, *A. occidentale* y *P. guajava* son las plantas más efectivas en términos de actividad antimicrobiana y antioxidante *in vitro* en sus hojas y extractos acuosos, mientras que *Moringa oleifera* tiene buena actividad antioxidante pero ningún efecto bactericida, y *Morinda citrifolia* no tiene efecto antimicrobiano y antioxidante.

Palabras clave: *actividad antimicrobiana, bactericida, polvo fino, hojas, metabolito secundario, antioxidante*

Actualmente, existe un interés creciente en investigar alternativas naturales a los antibióticos subterapéuticos, particularmente plantas medicinales que posean compuestos fitoquímicos beneficiosos y exhiban propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes (Oanh *et al.* 2023). Diversos estudios han demostrado que los compuestos fitogénicos pueden mejorar la expresión genética de los animales de granja en diferentes esquemas

schemes without the use of preventive antibiotics in their diet (Skoufos *et al.* 2020). Moreover, Karásková *et al.* (2015) reported that phytobiotics can reduce oxidative rancidity in foods/feeds, promote productivity naturally, and be used as an adjuvant in the treatment of various animal diseases. In this context, medicinal plants such as *A. occidentale*, *P. guajava*, *M. citrifolia*, and *M. oleifera* have been frequently employed worldwide to alleviate or eliminate different disease symptoms in humans and animals (Aroche *et al.* 2018).

Low concentrations of *A. occidentale* (*Anacardiaceae* family) have been found to increase egg production and quality and decrease pig diarrheal syndrome (Martínez *et al.* 2013 and Aroche *et al.* 2017). In animal production, *P. guajava* promote egg production, eggshell thickness, and reduce liquid feces in pigs after weaning (Ceballos-Francisco *et al.* 2020). The inclusion of *M. citrifolia* in animal diets has also been found to promote egg production and weight gain in pigs (Salazar *et al.* 2017 and Aroche *et al.* 2018). Likewise, *M. oleifera* possess anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activity (Dhakad *et al.* 2019) and has been recommended as a protein source in animal diets (Valdivié *et al.* 2020).

These four plants have garnered significant global interest in animal production due to their nutraceutical properties that enhance productive indicators, intestinal health, and the quality of the final product (Ramírez *et al.* 2020). Despite the productive results of their nutraceutical use in animals, few investigations have identified the secondary metabolites responsible for the possible comparative antibacterial and antioxidant effect *in vitro*. This information would allow elucidating the medicinal benefits reported in animals of zootechnical interest. Therefore, the objective of this research was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of leaves and aqueous extracts from four medicinal plants (*A. occidentale*, *P. guajava*, *M. citrifolia*, and *M. oleifera*).

### Materials and Methods

**Plant material.** Around 20 kg per plant of fresh leaves of *A. occidentale*, *P. guajava*, *M. oleifera* and *M. citrifolia* were collected in Granma province, Cuba, during the low rainy season of February/2019. This zone is characterized by a flat topography and brown soil with carbonates (Hernandez *et al.* 2019), authenticated by specialists from the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Granma. The plants were more than one year old and without any pathology. The leaves were dried in the shade for five (*A. occidentale*, *P. guajava* and *M. oleifera*) and ten days (*M. citrifolia*), with free air circulation to constant weight and then dried in a stove (WSU 400, Germany) with air recirculation for 1 hour at 60 °C. Subsequently, the leaves were crushed in a hammer mill with parallel blades, at 1 mm of size. The samples were

de producción sin el uso de antibióticos preventivos en su dieta (Skoufos *et al.* 2020). Además, Karásková *et al.* (2015) informaron que los fitobióticos pueden reducir la rancidez oxidativa en alimentos/piensos, promover la productividad de forma natural y usarse como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades de los animales. En este contexto, plantas medicinales como *A. occidentale*, *P. guajava*, *M. citrifolia* y *M. oleifera* se han empleado con frecuencia en todo el mundo para aliviar o eliminar diferentes síntomas de enfermedades en humanos y animales (Aroche *et al.* 2018).

Se ha descubierto que bajas concentraciones de *A. occidentale* (familia *Anacardiaceae*) aumentan la producción y calidad de los huevos y disminuyen el síndrome diarreico de los cerdos (Martínez *et al.* 2013 y Aroche *et al.* 2017). En producción animal, *P. guajava* promueve la producción de huevos, el grosor de la cáscara de los huevos y reduce las heces líquidas en los cerdos después del destete (Ceballos-Francisco *et al.* 2020). También se ha descubierto que la inclusión de *M. citrifolia* en las dietas animales promueve la producción de huevos y la ganancia de peso en los cerdos (Salazar *et al.* 2017 y Aroche *et al.* 2018). Asimismo, la *M. oleifera* posee actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana (Dhakad *et al.* 2019) y ha sido recomendada como fuente de proteínas en dietas animales (Valdivié *et al.* 2020).

Estas cuatro plantas han ganado un importante interés mundial en la producción animal debido a sus propiedades nutraceuticas que mejoran los indicadores productivos, la salud intestinal y la calidad del producto final (Ramírez *et al.* 2020). A pesar de los resultados productivos de su uso nutraceutico en animales, pocas investigaciones han identificado los metabolitos secundarios responsables del posible efecto antibacteriano y antioxidante comparativo *in vitro*. Esta información permitiría dilucidar los beneficios medicinales reportados en animales de interés zootécnico. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante *in vitro* de hojas y extractos acuosos de cuatro plantas medicinales (*A. occidentale*, *P. guajava*, *M. citrifolia*, y *M. oleifera*).

### Materiales y Métodos

**Material vegetal.** Se recolectaron alrededor de 20 kg de hojas frescas por planta de *A. occidentale*, *P. guajava*, *M. oleifera* y *M. citrifolia* en la provincia de Granma, Cuba, durante la temporada de pocas lluvias de febrero/2019. Esta zona se caracteriza por una topografía plana y suelo pardo con carbonatos (Hernández *et al.* 2019), autenticado por especialistas de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma. Las plantas tenían más de un año y sin patología alguna. Las hojas se secaron a la sombra durante cinco (*A. occidentale*, *P. guajava* y *M. oleifera*) y diez días (*M. citrifolia*), con libre circulación de aire hasta peso constante y luego se secaron en estufa (WSU400, Alemania) con recirculación de aire durante 1 hora a 60 °C. Posteriormente, las hojas se trituraron en un molino

stored at room temperature of 26 °C, in fully airtight plastic bags until further use. *In vitro* experiments were performed at the Feed Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences to determine the antibacterial and antioxidant activity of the leaves and their aqueous extracts.

*Preparation of the fine powder and aqueous extract.* To obtain the fine powder, 5 kg per plant leaves were ground in a commercial grain crushing machine (Zhejiang Horus Industry and Trade Co., Ltd., Zhejiang, China) through a 40 mesh (0.45 mm) sieve (Yoston, China) and stored in completely airtight bags until use for microbiological tests. Also, 16.67 g of the leaves of each plant were weighed and mixed with 500 mL of water for aqueous extraction. The aqueous extract was obtained by the sonication method, using an ultrasonic extractor (model SY-1000E, China) for 50 minutes at 50 °C, allowed to stand for 1 hour, and filtered through Whatman filter paper No. 1. It was subsequently condensed through a rotary evaporator (model RE-2000, China), under reduced pressure at 45 °C at 60 rpm to reach an amount less than 10 mL of extract (Fieser 2004). The extract was frozen at -80 °C for at least 4 hours, and finally dried in a lyophilizing machine (model LGJ-18, China).

*Minimum bactericidal concentration of fine powder.* The MBC of the fine powder from leaves of the four plants was determined for dilution method (Rios *et al.* 1988) in triplicate. For this, bacterial culture was prepared in culture medium at a concentration of approximately  $15 \times 10^7$  CFU/mL compared to theoretical optical density (550 nm absorbance) that defines the level of 0.50 in the McFarland turbidimetric scale, and was inoculated and incubated for 12 hours, later, 90 mm diameter Petri dishes were prepared with Müller-Hinton Agar (MHA) at different concentrations of the fine powder. The concentration of the bacterial suspensions was adjusted to 0.5 (optical density) by using a spectrophotometer. Each bacterial culture of 100 µL was inoculated, which consisted in strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88+ and ATCC 1515, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and ATCC 25923, *Salmonella enteritidis*: ATCC 3377, and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. In the first period, concentrations of 5, 15 and 30 mg/mL of fine powder in the culture medium were tested to identify the minimum concentration of each plant in that range for each bacterium tested. Then, concentrations less than 5.0 mg/mL (0.125, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg/mL) were used for fine powder of leaves of *A. occidentale* against the six bacteria strains and same concentrations of fine powder of leaves of *P. guajava* against *E. coli* ATCC 1515, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enteritidis*: ATCC 3377, and *S. Typhimurium* ATCC 14028; concentrations of 5.0 to 15.0 mg/mL (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0 and 15.0 mg/mL) of fine powder in culture medium for *P. guajava* against *E. coli* K88+ and *S. aureus* ATCC

de martillos de cuchillas paralelas, a 1 mm de tamaño. Las muestras se almacenaron a 26 °C de temperatura ambiente, en bolsas de plástico completamente herméticas hasta su uso posterior. Se realizaron experimentos *in vitro* en el Feed Research Institute de la Chinese Academy of Agricultural Sciences para determinar la actividad antibacteriana y antioxidante de las hojas y sus extractos acuosos.

*Preparación del polvo fino y extracto acuoso.* Para obtener el polvo fino, se molieron 5 kg de hojas de planta en una máquina trituradora de granos comercial (Zhejiang Horus Industry and Trade Co., Ltd., Zhejiang, China) a través de un tamiz de malla 40 mesh (0.45 mm) (Yoston, China) y se almacenaron en bolsas completamente herméticas hasta su uso para pruebas microbiológicas. Además, se pesaron 16.67 g de las hojas de cada planta y se mezclaron con 500 mL de agua para extracción acuosa. El extracto acuoso se obtuvo por el método de sonicación, con un extractor ultrasónico (modelo SY-1000E, China) durante 50 minutos a 50 °C, se dejó reposar durante 1 hora y se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1. Posteriormente se condensó a través de un rotavapor (modelo RE-2000, China), bajo presión reducida a 45 °C a 60 rpm para alcanzar una cantidad menor a 10 mL de extracto (Fieser 2004). El extracto se congeló a -80 °C durante al menos 4 horas y finalmente se secó en una máquina liofilizadora (modelo LGJ-18, China).

*Concentración mínima bactericida del polvo fino.* La CMB del polvo fino de las hojas de las cuatro plantas se determinó por el método de dilución (Rios *et al.* 1988) por triplicado. Para ello se preparó cultivo bacteriano en medio de cultivo a una concentración aproximada de  $15 \times 10^7$  UFC/mL frente a la densidad óptica teórica (550 nm de absorbancia) que define el nivel de 0.50 en la escala turbidimétrica de McFarland, y se inoculó e incubó durante 12 horas. Después se prepararon placas Petri de 90 mm de diámetro con Agar Müeller-Hinton (MHA) a diferentes concentraciones del polvo fino. La concentración de las suspensiones bacterianas se ajustó a 0.5 (densidad óptica) utilizando un espectrofotómetro. Se inoculó con 100 µL de cada cultivo bacteriano, el cual consistió en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) K88+ y ATCC 1515, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y ATCC 25923, *Salmonella enteritidis*: ATCC 3377 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. En el primer período, se probaron concentraciones de 5, 15 y 30 mg/mL de polvo fino en el medio de cultivo para identificar la concentración mínima de cada planta en ese rango para cada bacteria analizada. Luego, se utilizaron concentraciones menores a 5.0 mg/mL (0.125, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL) para polvo fino de hojas de *A. occidentale* contra las seis cepas de bacterias y las mismas concentraciones de polvo fino de hojas de *P. guajava* contra *E. coli* ATCC 1515, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enteritidis* ATCC 3377 y *S. Typhimurium* ATCC 14028; concentraciones de 5.0 a 15.0 mg/mL (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0 and 15.0 mg/mL) de polvo fino en medio de cultivo para *P. guajava* contra *E. coli*

43300 and for *M. citrifolia* against *S. aureus* ATCC 43300 and 25923; finally, 15 to 30 mg/mL of fine powder of culture medium with *M. oleifera* against *S. aureus* ATCC 43300 (Rios *et al.* 1988).

*Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal of aqueous extract.* For this study, microdilution method was used for MIC and dilution method for MBC of the aqueous extract (Rios *et al.* 1988). Stock solution of 13.0 mg/mL was prepared, which was used to prepare in serial dilutions of 13.0, 6.5, 3.25, 1.63, 0.81, 0.41, 0.2, 0.1, 0.05, 0.03, and 0.01 mg/mL. The inoculum of *E. coli* (ETEC) K88+, *S. aureus* ATCC 43300, and *S. Typhimurium* ATCC 14028 were prepared in culture medium (Mueller Hinton Broth) at a concentration of approximately  $15 \times 10^7$  CFU/mL compared to theoretical optical density (550 nm absorbance) that defines the level of 0.50 in the McFarland turbidimetric scale. Then, 200  $\mu$ L/well of each dilution was placed in 96-well microplates and 2  $\mu$ L of each bacterial culture was inoculated for triplicates, incubated for 12 hours at 37 °C to determine its absorbance in a plate reader (ELISA, BIO-TEK, Synergy HT). Determination of the MBC was carried out for triplicated, 100  $\mu$ L of supernatant from those wells where bacterial growth was inhibited and seeded with a sterile glass triangular spatula in 90 mm diameter Petri dishes with Mueller-Hinton Agar (MHA), and incubated for 12 hours at 37 °C.

*Antioxidant activity of aqueous extract.* For this study, leaves from the four plants were evaluated with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH-) (Shen *et al.* 2010), where a solution of 0.1 mM of DPPH- in methanol was prepared. Later, 1 mL of this solution was taken and vigorously mixed in a vortex with 3 mL of the different concentrations (10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 1,156, 0.078, 0.039, 0.020 and 0.010 mg/mL) of the extract, and 200  $\mu$ L of each concentration were placed in a 96-well microplate. The solutions were left to stand at RT in the dark for 30 min and then, the absorbance at 517 nm was measured with the use of a plate reader (ELISA brand, BIO-TEK, Synergy HT). Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as reference. Low absorbance values indicate high free radical scavenging capacity, or high antioxidant capacity, which was calculated using the following formula: Antioxidant effect of DPPH-(% inhibition) =  $[(A_0 - A_1)/A_0 * 100]$ , where  $A_0$  is the absorbance of the control reaction, and  $A_1$  is the absorbance in the presence of the extracts and the reference. Then, % of inhibition was plotted against concentration and the calibration curve for BHT was:  $y = 139.34x + 10.42$ ,  $r^2 = 0.8672$ . All samples were evaluated in triplicate and the results were averaged and shown as  $IC_{50}$  values (mg/mL).

*Identification and quantification of major compounds from leaves of the four plants. pretreatment method.* The sample leaves (around 40 mg) from *A.*

K88+ y *S. aureus* ATCC 43300 y para *M. citrifolia* contra *S. aureus* ATCC 43300 y 25923. Finalmente, de 15 a 30 mg/mL de polvo fino de medio de cultivo con *M. oleifera* contra *S. aureus* ATCC 43300 (Rios *et al.* 1988).

*Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del extracto acuoso.* Para este estudio, se utilizó el método de microdilución para CMI y el método de dilución para CMB del extracto acuoso (Rios *et al.* 1988). Se preparó una solución madre de 13.0 mg/mL, que se utilizó para preparar diluciones seriadas de 13.0, 6.5, 3.25, 1.63, 0.81, 0.41, 0.2, 0.1, 0.05, 0.03 y 0.01 mg/mL. El inóculo de *E. coli* (ETEC) K88+, *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 se prepararon en medio de cultivo (Caldo Mueller Hinton) a una concentración de aproximadamente  $15 \times 10^7$  UFC/mL en comparación con la densidad óptica teórica (absorbancia de 550 nm) que define el nivel de 0.50 en la escala de McFarland. Luego, se colocaron 200  $\mu$ L/pocillo de cada dilución en microplacas de 96 pocillos y se inocularon 2  $\mu$ L de cada cultivo bacteriano por triplicado, se incubaron durante 12 horas a 37 °C para determinar su absorbancia en un lector de placas (ELISA, BIO-TEK, Synergy HT). La determinación del CMB se realizó por triplicado, 100  $\mu$ L de sobrenadante de aquellos pocillos donde se inhibió el crecimiento bacteriano y se sembraron con una espátula triangular de vidrio estéril en placas de Petri de 90 mm de diámetro con Mueller-Hinton Agar (MHA), y se incubaron durante 12 horas a 37 °C.

*Actividad antioxidante del extracto acuoso.* Para este estudio, se evaluaron hojas de las cuatro plantas con 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH-) (Shen *et al.* 2010), donde se preparó una solución de 0.1 mM de DPPH- en metanol. Posteriormente se tomó 1 mL de esta solución y se mezcló vigorosamente en un vortex con 3 mL de las diferentes concentraciones (10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 1,156, 0.078, 0.039, 0.020 y 0.010 mg/mL) del extracto, y 200  $\mu$ L de cada concentración se colocaron en una microplaca de 96 pocillos. Las soluciones se dejaron reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min y luego se midió la absorbancia a 517 nm con el uso de un lector de placas (marca ELISA, BIO-TEK, Synergy HT). Se utilizó como referencia el hidroxitolueno butilado (BHT). Los valores bajos de absorbancia indican una alta capacidad eliminadora de radicales libres, o una alta capacidad antioxidante, que se calculó utilizando la siguiente fórmula: Efecto antioxidante del DPPH-(% de inhibición) =  $[(A_0 - A_1)/A_0 * 100]$ , donde  $A_0$  es la absorbancia de la reacción control, y  $A_1$  es la absorbancia en presencia de los extractos y la referencia. Luego, se plotó el % de inhibición frente a la concentración y la curva de calibración para BHT fue:  $y = 139.34x + 10.42$ ,  $r^2 = 0.8672$ . Todas las muestras se evaluaron por triplicado y los resultados se promediaron y se mostraron como valores de  $IC_{50}$  (mg/mL).

*Identificación y cuantificación de los principales compuestos de las hojas de las cuatro plantas.* Método de pretratamiento. Las hojas de muestra (alrededor de

*occidentale*, *P. guajava*, *M. citrifolia* and *M. oleifera* were added to 4 mL of extractant consisting in 0.8 mL of EDTA buffer solution + 3.2 mL of methanol, and were shaken under ultrasonic for 30 min. Then, centrifugation for 5 min to take the supernatant and the membrane was done. EDTA buffer solution consisted in 7.10 g of anhydrous sodium hydrogen phosphate, 1.95 g of disodium EDTA and 8.40 g of citric acid, dissolved in 650 mL of water.

**Chromatographic method. ultra-high-performance liquid chromatography-MS/MS conditions.** chromatographic analysis was performed on a waters acquity ultrahigh-performance liquid chromatography system, using an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (3.0 x 150 mm, 1.8  $\mu$ m). Mobile phase A: water (0.1% formic acid and 0.2 mmol/L ammonium acetate), mobile phase B: methanol (0.1% formic acid and 0.2 mmol/L ammonium acetate). Separation gradient (0-1 min: 10 % B, 1-2 min: 10 % B-60 % B, 2-7.5 min: 60 % B-90 % B, 7.5-8.0 min: 90 % B-100 % B, 8.0-8.1 min: 10 % B). The injection volume was 2  $\mu$ L and the flow rate 0.30 mL/min (Fang *et al.* 2007). MS was performed on a Sciex Triple Quad 4500 MS/MS, and electrospray ionization coupled with multiple reaction monitoring (MRM) model. The resulting optimized values were as follows: source temperature 450  $^{\circ}$ C, ion spray voltage 4500 V, collision gas: 9 psi, curtain gas

40 mg) de *A. occidentale*, *P. guajava*, *M. citrifolia* y *M. oleifera* se agregaron a 4 mL de extractante consistente en 0.8 mL de solución tampón EDTA + 3.2 mL de metanol y se agitaron bajo ultrasonido durante 30 min. Luego se centrifugó durante 5 min para tomar el sobrenadante y la membrana. La solución tampón EDTA estuvo compuesta por 7.10 g de fosfato monosódico anhidro, 1.95 g de EDTA disódico y 8.40 g de ácido cítrico, disueltos en 650 mL de agua.

**Método cromatográfico. Condiciones de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento-MS/MS.** El análisis cromatográfico se realizó en un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento Waters Acquity, utilizando una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (3.0 x 150 mm, 1.8  $\mu$ m). Fase móvil A: agua (0.1% de ácido fórmico y 0.2 mmol/L de acetato de amonio), fase móvil B: metanol (0.1% de ácido fórmico y 0.2 mmol/L de acetato de amonio). Gradiente de separación (0-1 min: 10 % B, 1-2 min: 10 % B-60 % B, 2-7.5 min: 60 % B-90 % B, 7.5-8.0 min: 90 % B-100 % B, 8.0-8.1 min: 10 % B). El volumen de inyección fue 2  $\mu$ L y la velocidad de flujo fue de 0.30 mL/min (Fang *et al.* 2007). La MS se realizó en un Sciex Triple Quad 4500 MS/MS y la ionización por electropulverización acoplada a un modelo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Los valores optimizados resultantes fueron los siguientes: temperatura de la fuente 450  $^{\circ}$ C,

Table 1. MRM conditions, retention time parameters for the analytes.

Number	CAS#	Compound	Ret Time (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	DP (V)	CE (V)	Polarity
1	18016-58-5	Quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside	4.66	611.0	303.0	187	30	Positive
					129.0	192	35	
2	28338-59-2	Cyanidin 3-O-rutinoside	4.08	594.9	286.7	111	90	Positive
					449.3	128	30	
3	520-27-4	3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavone 7-rutinoside	4.80	607.2	339.0	32	36	Negative
					299.0	153	38	
4	70831-56-0	Cichoric acid	3.97	473.1	314.9	79	40	Negative
					200.9	44	53	
5	16290-07-6	Kaempferol-7-O-glucoside	4.51	447.0	284.0	233	51	Negative
					151.0	240	63	
6	522-12-3	Quercitrin	4.98	447.0	271.0	273	56	Negative
					300.0	273	37	
7	331-39-5	Caffeic acid	4.17	181.0	89.0	72	42	Positive
					117.0	68	30	
8	104-46-1	cis-Anethol	6.10	147.1	77.0	54	28	Negative
					62.1	17	42	
9	140-67-0	4-Allylanisole	6.10	146.8	77.1	68	30	Negative
					116.9	54	45	
10	87-66-1	Pyrogallol	2.34	127.0	81.0	53	27	Positive
					53.0	48	33	
11	621-82-9	Cinnamic Acid	6.07	146.8	77.0	66	28	Negative
					103.0	71	16	

10 psi, ion source gas (GS 1) 18 psi, and ion source gas (GS 2) 0 psi. The corresponding declustering potential (DP) and collision energy (CE) are presented in table 1.

*Statistical analysis.* All analyzes are performed in triplicate. For the quantification of secondary metabolites, descriptive statistics were made. Also, for the antioxidant test, data were processed by simple classification ANOVA in a completely randomized design. Before this, the normality of the data was verified using the Kolmogorov (1941) and Smirnov (1948) test, and for uniformity of variance, the Bartlett test (1939). In necessary cases, means using Duncan (1955) test at the significance level of  $P < 0.05$  were separated. All analyzes were carried out in accordance with the IBM® SPSS® Statistics, version 22.0 (2013) (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results and Discussion

*Principal compounds from A. occidentale and P. guajava leaves.* The content of principal compounds from *A. occidentale* and *P. guajava* leaves are shown on table 2, where it is observed the higher concentration of quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, kaempferol-7-O-glucoside, quercetin, caffeic acid and cinnamic acid from *A. occidentale* leaves compared to *P. guajava*.

voltaje de pulverización de iones 4500 V, gas de colisión: 9 psi, gas de cortina 10 psi, gas de fuente de iones (GS 1) 18 psi y gas de fuente de iones (GS 2) 0 psi. El potencial de desagrupación (DP) y la energía de colisión (CE) correspondientes se presentan en la tabla 1.

*Análisis estadístico.* Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se hizo estadística descriptiva para la cuantificación de metabolitos secundarios. Además, para la prueba de antioxidantes, los datos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple en un diseño completamente al azar. Anteriormente, la normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov (1941) y Smirnov (1948), y la prueba de Bartlett (1939) se utilizó para la uniformidad de la varianza. En los casos necesarios, se separaron las medias utilizando la prueba de Duncan (1955) al nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron de acuerdo con IBM® SPSS® Statistics, versión 22.0 (2013) (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

## Resultados y Discusión

*Principales compuestos de las hojas de A. occidentale y P. guajava.* El contenido de compuestos principales de las hojas de *A. occidentale* y *P. guajava* se muestra en la tabla 2, donde se observa la mayor concentración de quercetina 3-O-glucósido-7-O-ramnósido, kaempferol-7-O-glucósido,

Table 2. Quantification of majority compounds from leaves of *A. occidentale* and *P. guajava*

Compounds	<i>A. occidentale</i> (µg/g)	<i>P. guajava</i> (µg/g)
Quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside	0.54±0.03	0.12±0.01
Chicoric acid	0.62±0.04	1.3±0.08
Kaempferol-7-O-glucoside	1.95±0.12	<0
Quercetin	10.25±0.9	<0
Caffeic acid	0.22±0.01	<0
Cinnamic acid	0.25±0.02	0.07±0.00

Data expressed as mean (n=3) ± standard deviation.

Polyphenols are the major secondary metabolites distributed in all plants, with higher emphasis on isoflavonoids, anthocyanins, flavonols, and flavones in *A. occidentale* and *P. guajava*. The quantification of the main secondary metabolites in these two plants such as quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, chicoric acid, kaempferol-7-O-glucoside, caffeic acid, and cinnamic acid could support the antibacterial and antioxidant effects found in this study. Theoretically, authors such as Roepke and Bozzo (2013) have mentioned that 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside is a rare secondary metabolite in plants with proven antioxidant and antimicrobial properties against *E. coli*. Furthermore, caffeic and chicoric acids have potential as antidiabetic agents, demonstrated by Mukhtar *et al.* (2004) who found a reduction in glucose concentration in laboratory

quercetina, ácido cafeico y ácido cinámico en las hojas de *A. occidentale* en comparación con *P. guajava*.

Los polifenoles son los principales metabolitos secundarios distribuidos en todas las plantas, con mayor énfasis en los isoflavonoides, antocianinas, flavonoles y flavonas en *A. occidentale* y *P. guajava*. La cuantificación de los principales metabolitos secundarios de estas dos plantas, como la quercetina 3-O-glucósido-7-O-ramnósido, el ácido chicórico, el kaempferol-7-O-glucósido, el ácido cafeico y el ácido cinámico, podría respaldar los efectos antibacterianos y antioxidantes que se encontraron en este estudio. Teóricamente, autores como Roepke y Bozzo (2013) mencionaron que el 3-O-glucósido-7-O-ramnósido es un metabolito secundario poco común en las plantas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas comprobadas contra *E. coli*. Además, Mukhtar *et al.* (2004) demostraron

mice when they used extracts of *A. occidentale* and *P. guajava*, respectively. In addition, the flavonoid kaempferol-7-O-glucoside was identified and quantified in the leaves of *A. occidentale*, which is a phytochemical widely studied for its antimicrobial properties (Singh *et al.* 2011).

Moreover, cinnamic acid is an organic acid that occurs naturally in many medicinal plants and quantified in both *A. occidentale* and *P. guajava*. This acid has low toxicity and a wide spectrum of functional activities, such as antibacterial, antiviral and antifungal properties (Sova 2012), which supports the antimicrobial effect found in the leaves of the plant in study (tables 3 and 4). Although positive results have been found for the secondary metabolites quantified in the leaves of the plant under study (mainly *A. occidentale*), in farm animals, they are not conclusive. Thus, these results could contribute to understand how medicinal plants (mainly leaves of *A. occidentale* and *P. guajava* and their extracts), due to their antimicrobial and antioxidant function, can completely replace growth-promoting antibiotics in farm animals, as demonstrated by Martínez *et al.* (2013), Más *et al.* (2016), Aroche *et al.* (2017), Salazar *et al.* (2017) and Aroche *et al.* (2018) in poultry and pigs.

*Antimicrobial activity of leaves powder and aqueous extract.* The MBC of the leaf powder from the plants against six strains of pathogenic bacteria is showed in table 3. Leaf powder of *A. occidentale* showed the greatest bactericidal effect in the study, mainly against *S. aureus* ATCC 25923 and 43300 and *S. Typhimurium* ATCC 14028, however, against *E. coli* K88+ concentration of 4 mg/mL was needed to inhibit the growth. Likewise, the leaf powder of *P. guajava* showed a bactericidal effect by reducing the growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria, with the lowest concentration (1.0 mg/mL) for *S. aureus* ATCC 43300 and the highest concentration (11 mg/mL) for *E. coli* K88+. Also, the leaves of *M. citrifolia* and *M. oleifera* only showed bactericidal activity against the strains of *S. aureus* ATCC 43300 and ATCC 25923 although with higher doses (8 and 16 mg/mL respectively) than the inhibitory effects of the leaves of *A. occidentale* and *P. guajava*.

que los ácidos cafeico y chicórico tienen potencial como agentes antidiabéticos, y encontraron una reducción en la concentración de glucosa en ratones de laboratorio cuando utilizaron extractos de *A. occidentale* y *P. guajava*, respectivamente. Además, se identificó y cuantificó el flavonoide kaempferol-7-O-glucósido en las hojas de *A. occidentale*, el cual es un fitoquímico ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas (Singh *et al.* 2011).

Además, el ácido cinámico es un ácido orgánico que se encuentra naturalmente en muchas plantas medicinales y se cuantifica en *A. occidentale* y en *P. guajava*. Este ácido tiene baja toxicidad y un amplio espectro de actividades funcionales, como propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas (Sova 2012), lo que respalda el efecto antimicrobiano encontrado en las hojas de la planta en estudio (tablas 3 y 4). Aunque se han encontrado resultados positivos para los metabolitos secundarios cuantificados en las hojas de la planta en estudio (principalmente *A. occidentale*), no son concluyentes en animales de granja. Así, estos resultados podrían contribuir a comprender cómo las plantas medicinales (principalmente hojas de *A. occidentale* y *P. guajava* y sus extractos), por su función antimicrobiana y antioxidante, pueden sustituir completamente a los antibióticos promotores del crecimiento en animales de granja, como demuestran Martínez *et al.* (2013), Más *et al.* (2016), Aroche *et al.* (2017), Salazar *et al.* (2017) y Aroche *et al.* (2018) en aves y cerdos.

*Actividad antimicrobiana del polvo de hojas y extracto acuoso.* La CMB del polvo de hojas de las plantas contra seis cepas de bacterias patógenas se muestra en la tabla 3. El polvo de hojas de *A. occidentale* mostró el mayor efecto bactericida en el estudio, principalmente contra *S. aureus* ATCC 25923 y 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 14028. Sin embargo, contra *E. coli* K88+ se necesitó una concentración de 4 mg/mL para inhibir el crecimiento. Asimismo, el polvo de hoja de *P. guajava* mostró efecto bactericida al reducir el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas, siendo la concentración más baja (1.0 mg/mL) para *S. aureus* ATCC 43300 y la más alta (11 mg /mL) para *E. coli* K88+. Además, las hojas de *M. citrifolia* y *M. oleifera* sólo mostraron actividad bactericida frente a las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 y ATCC 25923 aunque con dosis superiores

Table 3. MBC of the leaf powder of four plants against six bacterial strains (mg/mL).

Bacteria	AO <sup>1</sup>	PG <sup>2</sup>	MC <sup>3</sup>	MO <sup>4</sup>
<i>E. coli</i> K88+	4.0	11.0	NI <sup>5</sup>	NI
<i>E. coli</i> ATCC 1515	4.0	5.0	NI	NI
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1.0	1.0	8.0	16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5	5.0	15.0	NI
<i>S. enteritidis</i> ATCC 3377	4.0	4.0	NI	NI
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	2.0	2.0	NI	NI

<sup>1</sup>*A. occidentale*. <sup>2</sup>*P. guajava*. <sup>3</sup>*M. citrifolia*. <sup>4</sup>*M. oleifera*. <sup>5</sup>No inhibition.

Data were obtained by triplicated (n = 3).

MIC and MBC of the aqueous extract of the leaves of the four plants in study are shown in table 4. Similar to the fine powder of the leaves, the aqueous extracts of *A. occidentale* and *P. guajava* had the highest bactericidal activity. It should be noted that MIC and MBC to inhibit the growth of *E. coli* K88+ is the same in both medicinal plants (6.5 mg/mL).

(8 y 16 mg/mL, respectivamente) que los efectos inhibidores de las hojas de *A. occidentale* y *P. guajava*.

La CMI y CMB del extracto acuoso de las hojas de las cuatro plantas estudiadas se muestran en la tabla 4. Al igual que el polvo fino de las hojas, los extractos acuosos de *A. occidentale* y *P. guajava* tuvieron la mayor actividad bactericida. Cabe señalar que la CMI y la CMB

Table 4. MIC and MBC of the aqueous extract of the leaves of the plants (mg/mL).

Extracts	<i>E. coli</i> K88+		<i>S. aureus</i> 43300		<i>S. Typhimurium</i> 14028	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
AO <sup>1</sup>	6.5	6.5	0.81	0.81	3.25	3.25
PG <sup>2</sup>	6.5	6.5	0.81	1.63	6.50	6.50
MC <sup>3</sup>	NI <sup>5</sup>	NI	6.5	NI	NI	NI
MO <sup>4</sup>	NI	NI	NI	NI	NI	NI

<sup>1</sup>*A. occidentale*. <sup>2</sup>*P. guajava*. <sup>3</sup>*M. citrifolia*. <sup>4</sup>*M. oleifera*. <sup>5</sup>No inhibition.

Data were obtained by triplicated (n = 3).

Likewise, a higher concentration of the aqueous extract of *P. guajava* (compared to the aqueous extract of *A. occidentale* leaves) is necessary to inhibit and eliminate *S. Typhimurium* ATCC 14028, similar occurred for the bactericidal effect of this product against *S. aureus* ATCC 43300. The aqueous extract of *M. citrifolia* only inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 43300 at doses of 6.5 mg/mL, however, it did not show bactericidal activity at the concentrations studied (maximum concentration of 13 mg/mL). Also, the *M. oleifera* extract did not show inhibitory or bactericidal activity.

*A. occidentale* is known for its antibacterial properties, mainly in its flowers, bark and leaves (da Silva *et al.* 2016). In addition, it has been used in the prevention and treatment of oral diseases (being the first contact of the digestive system with the food) by inhibiting the bacteria in this cavity and therefore the formation of biofilm (Anand *et al.* 2015). Also, Melo Menezes *et al.* (2014) found that both crude extract and isolated tannins of *A. occidentale* have inhibitory activity against microorganisms that are part of the composition of oral biofilm. Therefore, they hypothesized that the mechanisms of the antimicrobial action of tannins, the enzymatic inhibition, the modification of cellular metabolism by its action on the membranes and binding with metal ions, decrease the access to metabolism to the microorganisms that are outside the biofilm. The present study results showed a potent antimicrobial and antioxidant activity, which is related to the high content of polyphenols and flavonoids contained in its leaves, in addition to other medicinal compounds (Siracusa *et al.* 2020).

Souza *et al.* (2017) observed the antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro* in *A. occidentale* leaves extract when used in RAW 264.7 macrophage cells due to the lower oxidative damage of these cells and the decrease in inflammatory parameters induced

para inhibir el crecimiento de *E. coli* K88+ es la misma en ambas plantas medicinales (6.5 mg/mL).

Asimismo, es necesaria una mayor concentración del extracto acuoso de *P. guajava* (en comparación con el extracto acuoso de hojas de *A. occidentale*) para inhibir y eliminar la *S. Typhimurium* ATCC 14028. Algo similar ocurrió para el efecto bactericida de este producto contra *S. aureus* ATCC 43300. El extracto acuoso de *M. citrifolia* solo inhibió el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300 con dosis de 6.5 mg/mL, pero no mostró actividad bactericida en las concentraciones estudiadas (concentración máxima de 13 mg/mL). Además, el extracto de *M. oleifera* no mostró actividad inhibitoria ni bactericida.

*A. occidentale* es conocida por sus propiedades antibacterianas, principalmente en sus flores, corteza y hojas (da Silva *et al.* 2016). Además, se ha utilizado en la prevención y tratamiento de enfermedades bucales (siendo el primer contacto del sistema digestivo con los alimentos) al inhibir las bacterias de esta cavidad y por tanto la formación de biopelícula (Anand *et al.* 2015). De igual manera, Melo Menezes *et al.* (2014) encontraron que el extracto crudo y los taninos aislados de *A. occidentale* tienen actividad inhibitoria contra los microorganismos que forman parte de la composición de la biopelícula oral. Por tanto, plantearon la hipótesis de que los mecanismos de acción antimicrobiana de los taninos, la inhibición enzimática, la modificación del metabolismo celular por su acción en las membranas y la unión con iones metálicos, disminuyen el acceso de los microorganismos que se encuentran fuera de la biopelícula al metabolismo. Los resultados del presente estudio mostraron una potente actividad antimicrobiana y antioxidante, la cual se relaciona con el alto contenido de polifenoles y flavonoides en sus hojas, además de otros compuestos medicinales (Siracusa *et al.* 2020).

Sousa *et al.* (2017) observaron la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* en extracto de hojas de *A. occidentale* cuando se usa en células de macrófagos RAW



by lipopolysaccharides stimulation. Additionally, Brito *et al.* (2020), pointed out that pentagalloyl hexoside, a precursor to the formation of hydrolyzed tannins such as ellagitannins and gallotannins, was found in all the organs of *A. occidentale*, these chemical compounds are responsible for several functional properties, with higher emphasis on the antimicrobial activity. Thus, the present study showed that *A. occidentale* was the plant with the highest antimicrobial and antioxidant capacity compared to the other three plants studied.

Regarding the effect of *A. occidentale* in animal production, specifically in poultry and pig production, Aroche *et al.* (2017) found that dietary supplementation with 1.0 % of a mixed powder made from 40 % of *A. occidentale* leaves powder increased growth performance and decreased the diarrhea incidence in weaned piglets. Furthermore, Más *et al.* (2016) showed that the dietary inclusion in low concentrations of *A. occidentale* and *P. guajava* leaves powder promoted growth and reduced dehydration in pigs before and after weaning. In this sense, Aroche *et al.* (2018) showed positive results in feed efficiency and IgG production when they added 0.5 % of a mixture of plants representing 60 % of *A. occidentale* in broiler diets.

*P. guajava* has also shown strong bactericidal activity on its leaves and aqueous extract, as it requires a small amount to eliminate bacteria such as *E. coli*, *S. aureus*, and *Salmonella*. Similarly, Salihu Abdallah *et al.* (2019) verified that the aqueous and methanolic extracts of *P. guajava* leaves have antimicrobial activity against *S. aureus* and *S. typhi*. The aqueous extract was effective with MIC of 12.5 mg/mL for both bacteria and MBC between 25 and 50 mg/mL for *S. aureus* and *S. Typhimurium* respectively. In this study, the concentrations of aqueous extract necessary to obtain MIC and MBC against these bacteria were lower than those, which may be due to the variety of the plant used, the origin, the extraction methods, among other factors. Also, Chero-Nepo and Ruiz-Barrueto (2016) determined that the alcoholic extract of *P. guajava* inhibits the growth of *Streptococcus mutans* due to its bactericidal power.

**Antioxidant activity of aqueous extract.** Table 5 shows the IC<sub>50</sub> of the aqueous extract of the leaves of the four plants. *A. occidentale* plant with the highest free radical trapping activity compared to the other three plants, as it reflects the lower IC<sub>50</sub>, being even lower (P<0.001) than the positive control BHT. Furthermore, *P. guajava* did not show (P>0.05) statistical differences with *A. occidentale* and BHT. However, *M. oleifera* and *M. citrifolia* had the lowest results in antioxidant activity,

264.7 debido al menor daño oxidativo de estas células y a la disminución de los indicadores inflamatorios inducidos por la estimulación de lipopolisacáridos. Además, Brito *et al.* (2020), señalaron que el hexósido de pentagalloyl, precursor de la formación de taninos hidrolizados como elagitaninos y galotaninos, se encontró en todos los órganos de *A. occidentale*. Estos compuestos químicos son responsables de varias propiedades funcionales, con mayor énfasis en la actividad antimicrobiana. Así, el presente estudio demostró que *A. occidentale* fue la planta con mayor capacidad antimicrobiana y antioxidante comparada con las otras tres plantas estudiadas.

Respecto al efecto de *A. occidentale* en la producción animal, específicamente en la producción avícola y porcina, Aroche *et al.* (2017) encontraron que la suplementación dietética con 1.0 % de un polvo mixto elaborado con 40 % de polvo de hojas de *A. occidentale* aumentó el comportamiento del crecimiento y disminuyó la incidencia de diarrea en lechones destetados. Además, Más *et al.* (2016) demostraron que la inclusión en la dieta de bajas concentraciones de polvo de hojas de *A. occidentale* y *P. guajava* promovió el crecimiento y redujo la deshidratación en cerdos, antes y después del destete. En este sentido, Aroche *et al.* (2018) mostraron resultados positivos en la eficiencia alimenticia y la producción de IgG cuando adicionaron 0.5 % de una mezcla de plantas que representa el 60 % de *A. occidentale* en dietas para pollos de ceba.

*P. guajava* también ha mostrado fuerte actividad bactericida en sus hojas y extracto acuoso, ya que requiere una pequeña cantidad para eliminar bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella*. De manera similar, Salihu Abdallah *et al.* (2019) comprobaron que los extractos acuoso y metanólico de hojas de *P. guajava* tienen actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. typhi*. El extracto acuoso fue efectivo con CMI de 12.5 mg/mL para ambas bacterias y CMB entre 25 y 50 mg/mL para *S. aureus* y *S. Typhimurium*, respectivamente. En este estudio, las concentraciones de extracto acuoso necesarias para obtener la CMI y CMB frente a estas bacterias fueron inferiores a aquellas, lo que puede deberse a la variedad de planta utilizada, el origen, los métodos de extracción, entre otros factores. Además, Chero-Nepo y Ruiz-Barrueto (2016) determinaron que el extracto alcohólico de *P. guajava* inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans* debido a su poder bactericida.

**Actividad antioxidante del extracto acuoso.** En la tabla 5 se muestra la IC<sub>50</sub> del extracto acuoso de las hojas de las cuatro plantas. El *A. occidentale* tuvo la mayor actividad atrapadora de radicales libres en comparación con las otras tres plantas, ya que refleja

Table 5. IC<sub>50</sub> of the aqueous extract of the leaves of the four plants

	AO <sup>1</sup>	PG <sup>2</sup>	MC <sup>3</sup>	MO <sup>4</sup>	BTH	SEM±	P-value
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.028 <sup>a</sup>	0.069 <sup>ab</sup>	6.269 <sup>d</sup>	0.603 <sup>c</sup>	0.093 <sup>b</sup>	0.65	<0.001

<sup>1</sup>*A. occidentale*. <sup>2</sup>*P. guajava*. <sup>3</sup>*M. citrifolia*. <sup>4</sup>*M. oleifera*. IC<sub>50</sub>: Extract concentration required to inhibit the DPPH–reaction by 50 %. Data are mean (n = 3). Values followed by different letters within a row are significantly different (P<0.05) according to the Duncan (1955). BHT used as a positive control.

as they require the highest concentration to inhibit the DPPH- reaction.

Regarding the antioxidant activity, Flores *et al.* (2015) identified the chemical composition of seven cultivars of *P. guajava* and founded a high content of flavonoids, in addition of anthocyanins, proanthocyanins, triterpenes and other compounds. Likewise, Feng *et al.* (2015) and Flores *et al.* (2015) showed that there is high correlation between flavonoid content and the antioxidant capacity of the plant, which agree with our findings, where *P. guajava* was the second plant to show a high antioxidant power.

On the other hand, *M. oleifera* is a multipurpose plant with multiple nutritional benefits, but also has been studied for its antimicrobial and antioxidant effects, since its use in human and animal nutrition is increasingly popular (Wang *et al.* 2018). Likewise, *M. citrifolia* has innumerable health benefits, however, when these two plants are compared with *A. occidentale* and *P. guajava*, they may be at a disadvantage due to the lower content of secondary metabolites responsible for the aforementioned activity. This research demonstrated the marked difference for antimicrobial and antioxidant effect of both the leaves and the aqueous extract of *A. occidentale* and *P. guajava* compared to *M. citrifolia* and *M. oleifera*.

However, in the case of *M. oleifera*, researchers such as Siddhuraju and Becker (2003), determined that this plant presents high antioxidant power in its ethanolic and methanolic extracts, which was related to abundant flavonoid content, especially quercetin and kaempferol. Shih *et al.* (2011) found high antioxidant activity in the ethanolic extract of various parts of this plant, where the leaves showed the highest activity, with an  $IC_{50}$  of 0.287 mg/mL, which is less than that found in this study (0.603 mg/mL). This difference could be due to the difference on the extraction (aqueous) method used this study. In relation to animal production, authors such as Zhang *et al.* (2018) found positive effects of *M. oleifera* on performance of fattening pigs, with a marked effect due to increased activity of the enzyme superoxide dismutase and decreased serum malondialdehyde concretion.

*M. citrifolia* only inhibited the growth of staphylococcal strains, in both forms, as fine powder and as aqueous extract, however, did not show any antimicrobial effect with the other bacterial strains. These results agree with Almeida *et al.* (2019), who reported several studies that probe the antimicrobial and antioxidant properties of *M. citrifolia* based on its chemical compounds in the plant parts. Also, antibacterial activity was found by Pandiselvi *et al.* (2019), specifically with *Staphylococcus aureus*. The difference in terms of the least antimicrobial effect in this study could be due to the use of methanolic extract. The antioxidant activity of the leaves of *M. citrifolia* was the lowest of among the

la menor  $IC_{50}$ , siendo incluso menor ( $P < 0.001$ ) que el control positivo BHT. Además, *P. guajava* no mostró ( $P > 0.05$ ) diferencias estadísticas con *A. occidentale* y BHT. Sin embargo, *M. oleifera* y *M. citrifolia* tuvieron los resultados más bajos en la actividad antioxidante, ya que requieren la concentración más alta para inhibir la reacción DPPH-.

En cuanto a la actividad antioxidante, Flores *et al.* (2015) identificaron la composición química de siete cultivares de *P. guajava* y encontraron un alto contenido de flavonoides, además de antocianinas, proantocianinas, triterpenos y otros compuestos. Asimismo, Feng *et al.* (2015) y Flores *et al.* (2015) demostraron que existe una alta correlación entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante de la planta, lo que concuerda con los hallazgos del presente estudio, donde *P. guajava* fue la segunda planta en mostrar un alto poder antioxidante.

Por otro lado, *M. oleifera* es una planta multipropósito con múltiples beneficios nutricionales, pero también se ha estudiado por sus efectos antimicrobianos y antioxidantes, ya que su uso en la nutrición humana y animal es cada vez más popular (Wang *et al.* 2018). De la misma manera, la *M. citrifolia* tiene innumerables beneficios para la salud, sin embargo, cuando se comparan estas dos plantas con *A. occidentale* y *P. guajava*, pueden estar en desventaja debido al menor contenido de metabolitos secundarios responsables de la actividad antes mencionada. Esta investigación demostró la marcada diferencia en el efecto antimicrobiano y antioxidante de las hojas y del extracto acuoso de *A. occidentale* y *P. guajava* en comparación con *M. citrifolia* y *M. oleifera*.

Sin embargo, en el caso de *M. oleifera*, investigadores como Siddhuraju y Becker (2003), determinaron que esta planta presenta un alto poder antioxidante en sus extractos etanólico y metanólico, lo que se relacionó con abundante contenido de flavonoides, especialmente quercetina y kaempferol. Shih *et al.* (2011) encontraron alta actividad antioxidante en el extracto etanólico de varias partes de esta planta, donde las hojas mostraron la mayor actividad, con un  $IC_{50}$  de 0.287 mg/mL, menor al encontrado en este estudio (0.603 mg/mL). Esta diferencia podría deberse a la diferencia en el método de extracción (acuoso) utilizado en este estudio. En relación con la producción animal, autores como Zhang *et al.* (2018) encontraron efectos positivos de la *M. oleifera* en el rendimiento de cerdos de engorde, con un efecto marcado debido al aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la disminución de la concreción de malondialdehído sérico.

*M. citrifolia* sólo inhibió el crecimiento de cepas de estafilococos, en ambas formas, como polvo fino y como extracto acuoso, sin embargo, no mostró ningún efecto antimicrobiano con las otras cepas bacterianas. Estos resultados concuerdan con Almeida *et al.* (2019), quienes informaron sobre varios estudios que investigan las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de *M. citrifolia* a partir de sus compuestos químicos en las partes de la planta. Además, Pandiselvi *et al.* (2019),

four plants. Very little literature has been published about the antioxidant capacity of the leaves of this plant. However, there are several investigations that show this quality in its fruits (Senthilkumar *et al.* 2016 and Thorat *et al.* 2017). Sunder *et al.* (2016) demonstrated the multiple uses of *M. citrifolia* in livestock and poultry as a natural growth promoter due to its immunomodulatory, antioxidant, and hypocholesterolemic properties.

### Conclusions

It is concluded that *A. occidentale* and *P. guajava* are the plants with the highest antimicrobial and antioxidant activity in their leaves and aqueous extract. *M. oleifera* has good antioxidant *in vitro* activity, although it does not have high antimicrobial power, and *M. citrifolia* is the plant that showed the least antioxidant activity in its aqueous extract.

### Acknowledgments

We would like to thank Dr. Yan Zhao from Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products of CAAS for the assistance of analysis of major compounds from leaves.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest between them.

#### Authors contribution

R. Aroche: Data curation, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft

X. Jiang: Data curation, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft

R. Rodríguez: Conceptualization, Investigation, Writing – original draft

X. Li: Investigation, Formal analysis

Mavir Carolina Avellaneda: Writing – original draft

Y. Martínez: Conceptualization, Data curation, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft

encontraron actividad antibacteriana, específicamente con *Staphylococcus aureus*. La diferencia en términos del menor efecto antimicrobiano en este estudio podría deberse al uso de extracto metanólico. La actividad antioxidante de las hojas de *M. citrifolia* fue la más baja de las cuatro plantas. Se ha publicado muy poca literatura sobre la capacidad antioxidante de las hojas de esta planta. Sin embargo, existen varias investigaciones que demuestran esta cualidad en sus frutos (Senthilkumar *et al.* 2016 y Thorat *et al.* 2017). Sunder *et al.* (2016) demostraron los múltiples usos de *M. citrifolia* en ganado y aves de corral como promotor natural del crecimiento debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes e hipocolesterolémicas.

### Conclusiones

Se concluye que *A. occidentale* y *P. guajava* son las plantas con mayor actividad antimicrobiana y antioxidante en sus hojas y extracto acuoso. *M. oleifera* tiene buena actividad antioxidante *in vitro*, aunque no tiene alto poder antimicrobiano, y *M. citrifolia* es la planta que menor actividad antioxidante mostró en su extracto acuoso.

### Agradecimientos

Gracias al Dr. Yan Zhao del Instituto de Estándares de Calidad y Tecnología de Pruebas para Agroproductos de CAAS por la ayuda en el análisis de los principales compuestos de las hojas.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses entre ellos.

#### Contribución de los autores

R. Aroche: Curación de datos, Investigación, Análisis formal, Escritura – borrador original

X. Jiang: Curación de datos, Investigación, Análisis formal, Escritura – borrador original

R. Rodríguez: Conceptualización, Investigación, Escritura – borrador original

X. Li: Investigación, Análisis formal

Mavir Carolina Avellaneda: Escritura – borrador original

Y. Martínez: Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Análisis formal, Escritura – borrador original

### References

- Almeida, É.S., Oliveira, D. de & Hotza, D. 2019. "Properties and Applications of *Morinda citrifolia* (Noni): A Review". Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(4): 883–909, ISSN: 1541-4337. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12456>.
- Anand, G., Ravinathan, M., Basaviah, R. & Shetty, V. 2015. "*In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care". Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 7(1): 69–74, ISSN: 0976-4879. <http://doi.org/10.4103/0975-7406.148780>.
- Aroche, R., Martínez, Y., Ayala, L., Rodríguez, R. & Rodríguez, Y. 2017. "Comportamiento productivo e incidencia de diarrea en cerdos posdestete suplementados con polvo mixto de hojas de plantas con propiedades nutraceuticas". Revista Ciencia y Agricultura, 14(2): 19–26, ISSN: 0122-8420. <http://doi.org/10.19053/01228420.v14.n2.2017.7145>.
- Aroche, R., Martínez, Y., Ruan, Z., Guan, G., Waititu, S., Nyachoti, C. M., Más, D. & Lan, S. 2018. "Dietary Inclusion of a Mixed Powder of Medicinal Plant Leaves Enhances the Feed Efficiency and Immune Function in Broiler Chickens". Journal of Chemistry, 2018: 1–6, ISSN: 2090-9063. <http://doi.org/10.1155/2018/4073068>.

- Bartlett, M. S. 1939. "A note of significance in multivariate analysis". *Proceedings, Cambridge Philosophical Society*, 35: 180–185.
- Brito, E., Mendes, L., Garruti, D., Zocolo, G. & Lima, M. 2020. "Structure Astringency Relationship of Anacardic Acids from Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.)". *ChemRxiv*, ISSN: 2573-2293. <http://doi.org/10.26434/chemrxiv.12336704>.
- Ceballos-Francisco, D., Castillo, Y., De La Rosa, F., Vásquez, W., Reyes-Santiago, R., Cuello, A., Cuesta, A. & Esteban, M. Á. 2020. "Bactericidal effect on skin mucosa of dietary guava (*Psidium guajava* L.) leaves in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*)". *Journal of Ethnopharmacology*, 259: 112838, ISSN: 0378-8741. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112838>.
- Chero-Nepo, D.A. & Ruiz-Barrueto, M.Á. 2016. "Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* (guayaba) y *Medicago sativa* (alfalfa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175". *Revista de Salud & Vida Sipanense*, 3(2): 6–12, ISSN: 2313-0369.
- da Silva, R. A., Liberio, S. A., do Amaral, F. M. M., Fernandes do Nascimento, F. R., Brandão Torres, L. M., Monteiro Neto, V. & Meireles Guerra, R. N. 2016. "Antimicrobial and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* L. flowers in comparison to bark and leaves extracts". *Journal of Biosciences and Medicines*, 4: 87–99, ISSN: 2327-5081. <http://dx.doi.org/10.4236/jbm.2016.44012>.
- Dhakad, A.K., Ikram, M., Sharma, S., Khan, S., Pandey, V.V. & Singh, A. 2019. "Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam". *Phytotherapy Research*, 33(11): 2870–2903, ISSN: 1099-1573. <http://doi.org/10.1002/ptr.6475>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple range and multiple F tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 1541-0420. <http://doi.org/10.2307/3001478>.
- Fang, F., Li, J., Pan, Q.-H. & Huang, W.-D. 2007. "Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging". *Food Chemistry*, 101(1): 428–433, ISSN: 0308-8146. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.036>.
- Feng, X., Wang, Z., Meng, D.-L. & Li, X. 2015. "Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25: 2193–2198, ISSN: 0968-0896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.058>.
- Fieser, L. 2004. *Experiments of organic chemistry*. Reverté editorial, first edition, pp. 269–275.
- Flores, G., Wu, S.-B., Negrin, A. & Kennelly, E. J. 2015. "Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits". *Food Chemistry*, 170: 327–335, ISSN: 0308-8146.
- Hernández, A., Pérez, J. M., Bosch, D. & Castro, N. 2019. "La clasificación de suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015". *Cultivos Tropicales*, 40(1): 31, ISSN: 0258-5936.
- Karásková, K., Suchý, P. & Straková, E. 2015. "Current use of phytogenic feed additives in animal nutrition: a review". *Czech Journal of Animal Science*, 60(12): 521–530, ISSN: 1212-1819. <http://doi.org/10.17221/8594-CJAS>.
- Kolmogorov, A. N. 1941. "On a logarithmic normal distribution law of the dimensions of particles under pulverization". *Doklady Akademii Nauk Tadjhikskoi SSSR*, 31(2): 99–101.
- Martínez, Y., Martínez, O., Liu, G., Ren, W., Rodríguez, R., Fonseca, Y., Olmo, C., Isert, M., Aroche, R., Valdiviá, M. & Nyachoti, C. M. 2013. "Effect of dietary supplementation with *Anacardium occidentale* on growth performance and immune and visceral organ weights in replacement laying pullets". *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(3 & 4): 1352–1357, ISSN: 1459-0255.
- Más, D., Martínez, Y., Rodríguez, R., Salazar, I., Aroche, R., López, B. & Marcella, D. 2016. "Efecto de la suplementación dietética con polvos de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y marañón (*Anacardium occidentale*) en el comportamiento productivo y la incidencia de diarrea en cerdos antes y después del destete". *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 23(2): 106–113, ISSN: 1026-9053.
- Melo Menezes, K., Vieira Pereira, J., de Medeiros Nóbrega, D. R., Ramos de Freitas, A. F., Vieira Pereira, M. do S. & Vieira Pereira, A. 2014. "Antimicrobial and anti-adherent *in vitro* activity of tannins isolated from *Anacardium occidentale* Linn. (Cashew) on dental biofilm bacteria". *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic*, 14(3): 191–198, ISSN: 1519-0501. <http://dx.doi.org/10.4034/PBOCI.2014.143.03>.
- Mukhtar, H., Ansari, S., Ali, M., Naved, T. & Bhat, Z. 2004. "Effect of water extract of *Psidium guajava* leaves on alloxan-induced diabetic rats". *Die Pharmazie*, 59(9): 734–735, ISSN: 0031-7144.
- Oanh, N. C., Thu, C. T. T., Hong, N. T., Giang, N. T. P., Hornick, J. L., & Dang, P. K. 2023. "Growth performance, meat quality, and blood characteristics of finisher crossbred pigs fed diets supplemented with different levels of green tea (*Camellia sinensis*) by-products". *Veterinary World*, 16(1), ISSN: 2231-0916. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.27-34>.
- Pandiselvi, P., Manohar, M., Thaila, M. & Sudha, A. 2019. *Pharmacological activity of Morinda citrifolia* L (Noni). In: *Pharmacological benefits of natural products*, First edition ed., India: JPS Scientific Publications, pp. 213–237, ISBN: 978-81-934054-2-0.
- Ramírez, M. I., Dranguet, D. & Morales, J. A. 2020. "Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales". *Redel: Revista Granmense de Desarrollo Local*, 16: 320–332, ISSN: 2664-3065.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A. 1988. "Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of literature". *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2-3): 127–149, ISSN: 0378-8741. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3).
- Roepke, J. & Bozzo, G. 2013. "Biocatalytic Synthesis of Quercetin 3-O-Glucoside-7-O-Rhamnoside by Metabolic Engineering of *Escherichia coli*". *Chembiochem: European journal of chemical biology*, 14(18): 2418–2422, ISSN: 1439-7633. <http://doi.org/10.1002/cbic.201300474>.
- Salazar, I., Martínez, Y., Rodríguez, R., Olmo, C., Aroche, R., Pupo, G., Rosabal, O. & Más, D. 2017. "Efecto de la suplementación dietética con polvo mixto de plantas medicinales en la productividad y calidad del huevo de gallinas

- ponedoras". *Revista de Producción Animal*, 29(3): 1–5, ISSN: 2224-7920.
- Salihu Abdallah, M., Nas, F. & Ali, M. 2019. "Antibacterial Activity of *Psidium guajava* Leaf and Stem Bark Extracts against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*". *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 6(5): 11–17, ISSN: 2394-5893.
- Senthilkumar, S., Deepa, K., Suganya, T., Janakarajan, M., Muralidharan, J. & Vasanthakumar, P. 2016. "Therapeutic properties of noni (*Morinda citrifolia*) and its products". *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(3): 1496–1502, ISSN: 2278-3687.
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X. & Li, P. 2010. "Antioxidant activity *in vitro* of selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01". *Anaerobe*, 16: 380–386, ISSN: 1075-9964. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.006>.
- Shih, M.C., Chang, C.M., Kang, S.M. & Tsai, M.L. 2011. "Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*". *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9): 6077–6088, ISSN: 1422-0067. <http://doi.org/10.3390/ijms12096077>.
- Siddhuraju, P. & Becker, K. 2003. "Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8): 2144–2155, ISSN: 0021-8561. <http://doi.org/10.1021/jf020444>.
- Singh, D., Sharma, S., Rani, R., Mishra, S. & Sharma, R. A. 2011. "Kaempferol-7-o-glucoside and their antimicrobial screening isolate from *Cassia renigera* wall". *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(2): 30–34, ISSN: 0975-1556.
- Siracusa, R., Fusco, R., Peritore, A. F., Cordaro, M., D'Amico, R., Genovese, T., Gugliandolo, E., Crupi, R., Smeriglio, A., Mandalari, G., Cuzzocrea, S., Di Paola, R. & Impellizzeri, D. 2020. "The Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Anacardium occidentale* L. Cashew Nuts in a Mouse Model of Colitis". *Nutrients*, 12(3): 834, ISSN: 2072-6643, <http://doi.org/10.3390/nu12030834>.
- Skoufos, I., Bonos, E., Anastasiou, I., Tsinas, A., & Tzora, A. 2020. "Effects of phytobiotics in healthy or disease challenged animals". *Feed Additives: aromatic plants and herbs in animal nutrition and health*, 311-337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00018-2>.
- Smirnov, N. 1948. "Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions". *Annals of mathematical statistics*, 19(2): 297–281, ISSN: 2168-8990. <http://doi.10.1214/amos/1177730256>.
- Souza, N. C., de Oliveira, J. M., Morrone, M. da S., Albanus, R. D., Amarante, M. do S. M., Camillo, C. da S., Langassner, S. M. Z., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F., Dalmolin, R. J. S. & Pasquali, M. A. de B. 2017. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Anacardium occidentale* Leaf Extract". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2017: 8, ISSN: 1741-427X. <http://doi.org/10.1155/2017/2787308>.
- Sova, M. 2012. "Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8): 749–767, ISSN: 1875-5607. <http://doi.org/10.2174/138955712801264792>.
- Sunder, J., Sujatha, T. & Kundu, A. 2016. "Effect of *Morinda citrifolia* in growth, production and immunomodulatory properties in livestock and poultry: a review". *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(3S): 249–265, ISSN: 2320-8694. [http://doi.org/10.18006/2016.4\(3S\).249.265](http://doi.org/10.18006/2016.4(3S).249.265).
- Thorat, B., Kambale, A. & Patil, K. 2017. "Noni fruit crop is a versatile medicinal plant". *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(5): 247–249, ISSN: 2320-3862.
- Valdiviá, M., Martínez, Y., Mesa, O., Botello, A., Betancur, C. & Velázquez, B. 2020. "Review of *Moringa oleifera* as forage meal (leaves plus stems) intended for the feeding of non-ruminant animals". *Animal Feed Science and Technology*, 260(2020): 114338, ISSN: 0377-8401. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114338>.
- Wang, P., Chen, T., Sun, J., Xu, Q. & Zhang, Y. 2018. "Research Progress in the Application of *Moringa oleifera* in Animal Feed". *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 30(7): 2488–2495, ISSN: 1006-267X. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2018.07.008>.
- Zhang, T., Zhang, B., Si, B., Zhang, N., Tu, Y., Zhou, C. & Diao, Q. 2018. "Effects of Moringa Leaf on Growth Performance, Slaughter Performance, Antioxidant Function and Meat Quality of Finishing Pigs". *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 30(1): 255–261, ISSN: 1006-267X. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2018.01.031>.

**Received: February 8, 2023**

**Accepted: May 29, 2023**