

Maria Lindomárcia Leonardo da Costa

**Concentrações séricas de retinol e minerais em potros na seca e composição
de fenos de estilosantes durante o armazenamento**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Zootecnia.

Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal
Orientadora: Dra. Adalgiza Souza Carneiro de Rezende

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

C857c Costa, Maria Lindomárcia Leonardo da, 1983-
Concentrações séricas de retinol e minerais em potros na seca e composição de fenos de
estilosantes durante o armazenamento / Maria Lindomárcia Leonardo da Costa. – 2010.
52 p. : il.

Orientadora: Adalgiza Souza Carneiro de Rezende
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Eqüino – Alimentação e rações – Teses. 2. Vitamina A – Teses. 3. Feno como ração –
Armazenamento – Teses. 4. Nutrição animal – Teses. I. Rezende, Adalgiza Souza Carneiro
de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.


CDD – 636.108 5

BANCA EXAMINADORA

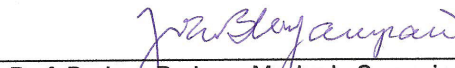
Dissertação defendida e aprovada em 03 de fevereiro de 2010
pela Comissão Examinadora constituída por:




Profa. Dra. Adalgiza Souza Carneiro de Rezende
(Orientadora)



Prof. Dr. José Augusto de Freitas Lima



Prof. Dr. Ivan Barbosa Machado Sampaio



Dra. Vany Perpétua Ferraz

DEDICATÓRIA

À minha mestre das lições da vida, minha avó Francisca Leonarda (*in memoriam*) – pela amizade e por ter me ensinado os valores de dignidade, amor e humildade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu mais sublime agradecimento, por ter concedido mais uma conquista na minha vida mesmo quando tudo parecia impossível.

Aos meus pais (Lindomár e Elías) e meu irmão (Itamar) pelo apoio e por terem acreditado que eu conseguiria.

Ao meu namorado Guilherme pelo seu amor e companheirismo em todos os momentos dessa caminhada e por ser um anjo iluminado em minha vida.

Aos meus avós [*in memoriam*] (Francisca e José Vieira) por terem me ensinado a sonhar e ter coragem de realizar esses sonhos.

Aos meus primos (Marcilio, Micilene e Edson Filho) e tia (Maria) pelo apoio durante essa caminhada.

Aos amigos Alrineide e Vander pelo incentivo e apoio na tomada de decisão para a realização do mestrado.

À minha orientadora Adalgiza, pela confiança, ensinamentos, paciência e oportunidade de trabalhar com alguém tão apaixonada pelos cavalos.

À minha co-orientadora Ângela Quintão pelo suporte estatístico e pela sempre disposição a ajudar.

À família do Sr. João Carlos Penna de Araújo Moreira por abrir as portas de sua fazenda para realização da pesquisa e por ter gentilmente dado as condições para que esse trabalho acontecesse.

Meu agradecimento especial a Dalton Colares pelo apoio, incentivo e confiança.

À Vany Ferraz pelo auxílio nas análises cromatográficas e pelo carinho com o qual me recebeu em seu laboratório.

À Olguita Ferreira (pesquisadora do CETEC) pela paciência e dedicação nas análises de minerais.

Ao professor Ivan Sampaio, pela atenção e preciosa contribuição estatística e auxílio nas etapas finais dessa pesquisa.

Ao Dr. José Augusto de Lima (UFLA) pelas valiosas dicas que enriqueceram o trabalho.

Aos professores do Departamento de Zootecnia – UFMG que contribuíram para o aprendizado durante o mestrado, em especial a Dra. Eloisa Saliba, pela contribuição nessa pesquisa.

Aos funcionários do Haras Catuni – Fazenda Santa Helena, pelo auxílio, paciência, carinho e ensinamentos.

Aos amigos Kélvia, Daniel, Haline e Alexandre pelos momentos de descontração.

Aos colegas do grupo de pesquisa em equinos que contribuíram desde a amizade ao auxílio nessa caminhada.

À Heloísa (secretária) pela amizade, paciência e dedicação.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal pelos ensinamentos.

Aos colegas de mestrado, em especial as colegas Fernanda Simões e Mariana Pompeu.

À Capes pela concessão da bolsa.

À empresa OuroFino por ter cedido gentilmente os vermífugos utilizados nesse experimento.

Aos professores Ernandes Rufino (UFPI), Socorro Carneiro (UFC) e Sônia Pinheiro (UFC) por terem me incentivado a seguir esse caminho.

Aos professores José Mario Girão (UECE) e Hélio Manso Filho (UFRPE) pela amizade e por serem os precursores das primeiras lições com equinos.

Ao Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária/ UFMG, pela oportunidade de estudo e por ter sido a base para a realização dessa conquista.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1. Histórico da vitamina A	11
1.2. Caracterização dos precursores da vitamina A.....	12
1.3. Metabolismo do betacaroteno nos organismos vegetais	12
1.4. Metabolismo do betacaroteno e retinol no organismo animal.....	13
1.5. Hipovitaminose A	13
1.6. Hipervitaminose A	14
1.7. Instabilidade do betacaroteno nas forragens	15
1.8. Exigências de vitamina A para equinos	15
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO II -CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE RETINOL E MINERAIS EM POTROS NA SECA.....	24
RESUMO	24
ABSTRACT	24
1.INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Local e animais	25
2.2. Procedimentos para coleta de material	27
2.3. Metodologia para extração e leitura do retinol.....	27
2.4. Metodologia para extração e leitura do betacaroteno.....	29
2.5. Análise de minerais	30
2.6. Análise estatística	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Concentrações séricas de retinol e minerais	31
3.2. Avaliação do betacaroteno na pastagem	33
3.3. Associação entre retinol, betacaroteno e minerais	35
4. CONCLUSÕES.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO III- COMPOSIÇÃO DE FENOS DE ESTILOSANTES DURANTE O ARMAZENAMENTO	39
RESUMO	39
ABSTRACT.....	39

1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Local do experimento	40
2.2. Metodologia para extração e leitura do betacaroteno.....	41
2.3. Análises bromatológicas	42
2.4. Análise estatística.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4. CONCLUSÕES.....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Exigências nutricionais de vitamina A para as categorias equina.....16

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemiceluloses (HEM), lignina Klason (LIG), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), matéria mineral (MM), Cálcio (Ca), Fósforo (P) e energia bruta (EB) do *Panicum maximum* cv. Tanzânia durante o período experimental.....26

Tabela 2 - Níveis de garantia por kg (base na matéria natural) do sal mineral fornecido aos animais durante o período de junho a outubro.....27

Tabela 3 - Concentrações de *all-trans*- retinol e *all-trans*- acetato de retinol das soluções padrões de trabalho.....28

Tabela 4 - Tabela de Análise de Variância para os dados de retinol e minerais em equinos.....31

Tabela 5 - Tabela de Análise de Variância para os dados de betacaroteno na pastagem.....31

Tabelas 6 - Medianas (mínimas e máximas) das concentrações de retinol sérico em potros Mangalarga Marchador durante o período de junho a outubro.....32

Tabela 7 - Concentrações séricas de zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) de potros Mangalarga Marchador durante o período de junho a outubro.....32

Tabela 8 – Concentrações de betacaroteno no *Panicum maximum* cv. Tanzânia durante o período de junho a outubro.....34

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Tabela de análise de variância para as variedades de fenos e tempo de armazenamento.....43

Tabela 2 - Medianas (mínimas e máximas) das concentrações máximas e mínimas de betacaroteno (mg/kg MS) dos fenos *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento.....43

Tabela 3 - Concentrações de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), Cálcio (Ca) e Fósforo (P) dos fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento.....44

Tabela 4 - Concentrações de proteína bruta (PB) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e energia bruta (EB) dos fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento.....46

Tabela 5 - Concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemiceluloses (HEM) e lignina (LIG) dos fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento.....47

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Estrutura do betacaroteno.....12
- Figura 2 - Estrutura do retinol.....12

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Precipitação pluviométrica registrada no Haras Catuni - MG, durante o período experimental.....25
- Figura 2 - Precipitação pluviométrica acumulada nos intervalos de coletas realizadas no Haras Catuni - MG, durante o período experimental.....26
- Figura 3 - Curva de regressão obtida a partir das diluições dos padrões *all- trans-* retinol e *all- trans-* acetato de retinol.....28
- Figura 4 - Cromatograma dos padrões *all- trans-* retinol e *all- trans-* acetato de retinol.....29
- Figura 5 - Curva de regressão obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans-* betacaroteno.....30
- Figura 6 - Curva de regressão obtida a partir das diluições do padrão externo *all-trans-* betacaroteno adotadas para amostras coletadas aos 135 dias do período experimental.....30
- Figura 7 - Cromatograma do padrão do *all- trans-* betacaroteno.....30
- Figura 8 - Representação gráfica das variáveis estudadas.....35

CAPÍTULO III

- Figura 1 - Curva de regressão 1 obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans-* betacaroteno.....41
- Figura 2 - Curva de regressão 2 obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans-* betacaroteno.....42
- Figura 3 - Curva de regressão 3 obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans-* betacaroteno.....42

RESUMO

O experimento I foi realizado um mês após a estiagem das chuvas, durante os meses de junho a outubro de 2008. Sete potros Mangalarga Marchador foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia, sem qualquer suplementação de volumoso ou concentrado. Em intervalos de 45 dias foram coletadas amostras sanguíneas para determinação de retinol e minerais e realizada amostragem da pastagem para quantificação do betacaroteno. Durante o período estudado as concentrações de retinol decresceram ($P < 0,05$) e foram inferiores aos níveis preconizados como normais pela literatura. Os níveis de zinco, ferro, cálcio e fósforo não diferiram ($P > 0,05$) durante o período estudado. Cobre e magnésio apresentaram níveis decrescentes ($P < 0,05$). Zinco e cálcio foram deficientes quando comparados com os níveis citados como normais. O betacaroteno da pastagem declinou ($P < 0,05$) ao longo do tempo. O estudo da associação entre minerais, retinol e betacaroteno demonstrou que o cobre sérico é o mineral mais associado com o retinol sanguíneo. Existe a necessidade de suplementação com vitamina A em potros criados a pasto, após um período de aproximadamente 30 dias de ausência das chuvas. No experimento II foi avaliada a influência do período de estocagem na concentração de betacaroteno e composição nutricional de fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande durante 225 dias de armazenamento. Os teores de betacaroteno não diferiram ($P > 0,05$) entre os fenos e durante o armazenamento. No comparativo entre as duas variedades, o feno de Mineirão apresentou matéria seca (MS), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), energia bruta (EB), fibra em detergente neutro (FDN) e lignina (LIG) superiores ($P < 0,05$) ao Estilosantes Campo Grande. Durante o armazenamento, ambos os fenos não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) para os teores de MM, P, EB, FDN, FDA, LIG e hemiceluloses. Quando armazenados adequadamente, os fenos de estilosantes preservam o betacaroteno por um período mínimo de 225 dias. Considerando os parâmetros avaliados, as variedades de estilosantes, destacando-se a Campo Grande, apresentam potencial para utilização na alimentação equina.

Palavras-chave: carotenóides, conservação, cultivar, hipovitaminose A, nutrientes

ABSTRACT

The experiment I was realized within dry season, from July to October 2008. Seven Mangalarga Marchador foals remained on *Panicum maximum* cv. Tanzânia pasture. No other supplementation was fed. The each 45 days blood samples were taken to determine retinol and mineral levels in serum, altogether with pasture samples to quantify beta-carotene in grass. During the above period retinol levels varied ($P < 0,05$), being all such levels below standard levels found in literature. Zn, Fe, Ca and P levels did not experience significant variation ($P > 0,05$) within that period. On the other hand, Cu and Mg showed decreasing levels in time ($P < 0,05$). Zn and Ca were insufficient at all times when compared to their standard levels. Beta-carotene in grass showed a decreasing ($P < 0,05$) trend in time. When all these minerals, retinol and beta-carotene were studied in a multivariate analysis, serum Cu came out to be the mineral with higher association to serum retinol levels. Results also suggest that vitamin A supplementation should be provided to foals under present conditions during dry season. In experiment II was evaluated the influence of storage period in beta-carotene concentration and nutritional composition in *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande during 225 days of storage. There was no difference ($P > 0,05$) in beta-carotene concentrations between hays and during storage. In the comparison between hays, *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão showed dry matter (DM), acid detergent insoluble nitrogen (ADIN), gross energy (GE), neutral detergent fiber (NDF) and lignin higher ($P < 0,05$) than Estilosantes Campo Grande hay. There was no difference ($P > 0,05$) for mineral content, calcium (Ca), phosphorus (P), crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF) and hemicelluloses. During the period of storage both hays showed no differences ($P > 0,05$) for mineral content, P, GE, NDF, ADF, hemicelluloses and lignin. The nutritional responses findings indicated that Estilosantes Campo Grande is a legume with potential to be used in feeding horses.

Key-words: carotenoids, conservation, varieties, hypovitaminosis A, nutrients

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os constituintes nutricionais dos alimentos, as vitaminas são requeridas em quantidades mínimas pelos animais. Entretanto, a deficiência desses nutrientes na dieta pode determinar múltiplas disfunções metabólicas no organismo.

O estudo das vitaminas na nutrição de equinos deve ter como objetivo pontual estabelecer os requisitos dietéticos das diferentes categorias dos animais e dessa forma prevenir a ocorrência de deficiência vitamínica no rebanho.

A vitamina A merece especial atenção na alimentação dos equinos, pois suas necessidades apresentam-se mais críticas que as demais, principalmente quando os animais estão em condições de estabulação ou pastejo durante prolongado período de escassez de chuvas.

Nas situações acima mencionadas, as concentrações dos precursores da vitamina A (betacaroteno) contida nos alimentos são baixas, sendo necessária a adição de vitamina A sintética na dieta ou administração injetável diretamente no animal, agregando custos que podem ser representativos na criação de equinos. Contudo, essas despesas podem ser minimizadas através do correto manejo dos alimentos, como adequada produção e estocagem dos fenos.

Em casos onde não existe o suprimento dessa vitamina, os animais podem apresentar seu desenvolvimento comprometido, pois a vitamina A possui intrínseca relação nos processos visuais, reprodutivos e atuação na diferenciação e crescimento dos tecidos epiteliais.

Os objetivos dessa dissertação foram esclarecer as antíteses apresentadas na literatura quanto à capacidade de reserva hepática de vitamina A dos equinos durante a época seca e avaliar os níveis séricos de minerais durante esse período. Também foi avaliada a composição nutricional de fenos de estilosantes, destinado a alimentação de equinos, durante o armazenamento.

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Histórico da vitamina A

Segundo Wolf et al. (1978), o primeiro registro de doença ligada à deficiência de vitamina A foi a nictalopia (cegueira noturna) descrita no Egito, cerca de 1500 anos antes de Cristo. Ainda que naquela época essa doença não tenha sido associada à deficiência dietética, os antigos egípcios já prescreviam o uso tópico do extrato de fígado para a cura da cegueira noturna. Segundo os autores, a provável eficácia desse método estaria na penetração do óleo de fígado pelo ducto lacrimal, possibilitando a penetração dessa fonte de vitamina no organismo do indivíduo.

A observação de que animais alimentados com dietas purificadas perdiam peso e eram levados a óbito ocorreu no final do século XIX. No início do século seguinte, a vitamina A foi descoberta nos Estados Unidos por dois grupos independentes de pesquisadores. McCollum e Davis, em Wisconsin, os quais demonstraram que manteiga e gema de ovo possuíam um fator lipossolúvel necessário ao crescimento de ratos. Em 1915, esses pesquisadores denominaram esse fator de “lipossolúvel A”, atribuindo-o a propriedade de estimulador do crescimento. Concomitantemente, Osborne e Mendel, em Yale, descobriram que óleo de fígado de bacalhau e manteiga atuavam como promotores de crescimento em ratos (Bucker et al., 2001).

Segundo El Beitune (2003) a observação de Steenbock em 1919 de que a “vitamina A” contida nos vegetais variava com o seu grau de coloração confirmava sua natureza química. Em 1929, Moore e Euler demonstraram que o pigmento das plantas era uma fonte rica em vitamina A. Esse pigmento foi chamado de caroteno sendo, na verdade, um *pool* de compostos com a capacidade de se transformarem em vitamina A, entre eles α -caroteno e β -caroteno. A partir de então, os compostos carotenóides foram denominados de provitamina A. Entretanto, somente dois anos depois, a estrutura

química do betacaroteno (figura 1) e da vitamina A ou retinol (figura 2) foram determinados por Karrer.

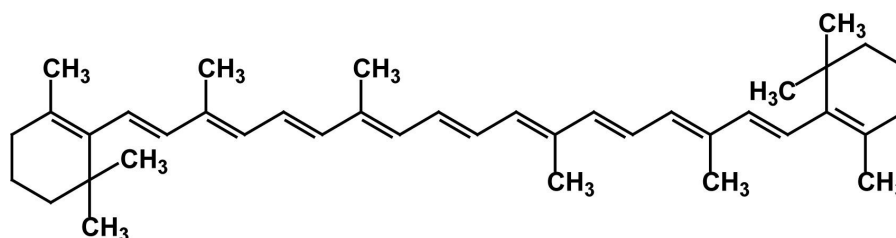


Figura 1 - Estrutura do betacaroteno

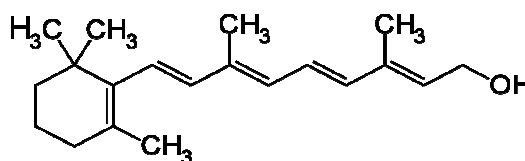


Figura 2 - Estrutura do retinol

1.2. Caracterização dos precursores da vitamina A

Segundo Ambrósio et al. (2006) os carotenóides são tetraterpenóides encontrados nos vegetais e classificam-se em carotenos e xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos poliênicos com graus variados de insaturação e as xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, através de reações de hidroxilação e epoxidação.

Nas plantas, os carotenóides são pigmentos coloridos e lipossolúveis que se encontram embebidos nas membranas dos cloroplastos (tecidos fotossintéticos) e cromoplastos (tecidos não fotossintéticos). Nos cloroplastos, a energia absorvida pode ser transferida para a clorofila, entretanto os carotenóides servem como pigmentos acessórios que captam a radiação luminosa na região do espectro não coberta pela clorofila. Os carotenóides também são essenciais a fotoproteção, pois na sua ausência as plantas sofrem severos danos foto-oxidativos que resultam na morte do vegetal. Nos cromoplastos, os carotenóides são responsáveis pelas cores laranja, amarelo e vermelho de frutos e pétalas das flores, cuja função é atrair animais e insetos polinizadores (Bartley et al., 1995).

Na natureza existem cerca de 400 - 600 carotenóides, porém apenas 50 exercem atividade biológica de provitamina A. Esses compostos possuem um anel β -ionona intacto, sendo o betacaroteno ($C_{40}H_{56}$) o principal precursor *in vivo* qualitativa e quantitativamente, que possui dois anéis β -ionona. O betacaroteno constitui 90% dos carotenóides presentes nas plantas e se encontra associado à clorofila nos cloroplastos dos tecidos fotossintéticos e apresentam 100% de atividade da vitamina A (Bondi e Sklan, 1984; Nunes, 1998).

1.3. Metabolismo do betacaroteno nos organismos vegetais

O primeiro passo na síntese dos carotenóides é a condensação de dois geranylgeranyl difosfato (GGPP) através da enzima fitoeno sintase, dando origem ao fitoeno (carotenóide incolor) que após dessaturação e isomerização transforma-se em licopeno. As enzimas fitoeno dessaturase e zetacaroteno dessaturase catalizam reações de desidrogenação ao introduzir quatro duplas ligações para formar o *cis* - licopeno. Enquanto que, a enzima carotenóide isomerase cataliza a isomerização *cis* - *trans*, tendo como produto final o *all-trans* - licopeno. Com o aumento do número de ligações duplas conjugadas, os carotenóides ganham a cor do zetacaroteno (amarelo pálido) e licopeno (vermelho). Anéis de ciclohexano podem ser formados na molécula; se dois anéis β forem formados, o produto é o betacaroteno; se um anel β e outro γ forem formados, o produto é α -caroteno. Ambos os compostos formados tem coloração laranja (Shewmaker et al., 1999; Penna et al., 2006).

1.4. Metabolismo do betacaroteno e retinol no organismo animal

Quando os equinos ingerem forragens verdes, as moléculas de betacaroteno agregam-se aos glóbulos de gordura (micelas) que se encontram no lúmen intestinal e então são difundidos para as células epiteliais da camada superficial do intestino delgado (Bondi e Sklan, 1984). Cada molécula de betacaroteno é convertida em duas moléculas de retinal através da ação da enzima betacaroteno 15, 15'- dioxigenase (Nagao, 2004). Essa enzima é ativada pelo mineral ferro que atua como cofator na atividade *in vivo* dessa proteína conforme verificado por During et al. (1999). Em seguida, o retinal formado no intestino é reduzido a retinol através da álcool desidrogenase, uma enzima citosólica dependente de zinco. Dessa forma, a vitamina é transportada no sangue ligada a proteína de ligação do retinol (PLR) que também depende de zinco na sua síntese. O retinol pode então ser estocado no fígado na forma de ésteres de retinil (palmitato). Quando necessário, os ésteres são hidrolisados a retinol e transportados no sangue ligado a PLR e assim distribuído para os tecidos alvos, onde ocorre a síntese do ácido retinóico em dois passos: oxidação do retinol a retinal através da enzima álcool desidrogenase e oxidação desse produto a ácido retinóico através da enzima aldeído desidrogenase. Nas células, o ácido retinóico atua no crescimento e diferenciação dos tecidos epiteliais e como ativador dos fatores de transcrição no núcleo celular (Blomhoff et al., 2006).

Nas células visuais, o 11-*cis*-retinal combina-se com a opsina e se transforma em pigmentos fotossensíveis (rodopsina). O 11-*cis*- retinal é derivado do retinol circulante, que é inicialmente oxidado a *all-trans*- retinal, e em seguida isomerizado a 11-*cis*- retinal (Jones et al., 2000). Esse mecanismo configura a importância da vitamina A nos processos visuais.

O mecanismo de transporte da vitamina A na corrente sanguínea, onde o retinol liga-se PLR, complexando-se com a pré-albumina, impede que o complexo retinol - PLR seja excretado pela urina. Entretanto, quando altas doses de vitamina A são administradas no animal, certa proporção sofre excreção sob forma inalterada nas fezes (Collins et al., 1999; Aquino, 2005).

A rota de excreção da vitamina A é a conversão do retinol e ácido retinóico em metabólitos solúveis em água na forma de retinil - β - glicuronídeo, que são produzidos no fígado e excretados através da bile e a partir daí, pelas fezes (Lippel et al., 1968).

As reservas orgânicas de vitamina A encontram-se no fígado, que contém cerca de 50 - 80% do retinol armazenados na forma de ésteres, sendo que a quantidade estocada é influenciada pela ingestão desse nutriente, idade e saúde do animal. As células hepáticas podem estocar vitamina A em quantidades suficientes quando os animais estão submetidos a dietas ricas nessa vitamina, podendo suprir suas necessidades orgânicas durante períodos de escassez desse nutriente (Bondi e Sklan, 1984).

Blakley e Bell (1994) avaliaram a influência da idade e do sexo nas concentrações plasmáticas de vitamina A em equinos de diferentes regiões do Canadá. Os autores verificaram níveis inferiores dessa vitamina em potros quando comparado a animais adultos, entretanto nenhuma diferença foi observada entre sexos.

Entretanto, Ed Kane (2004) afirmou que alguns fatores podem influenciar na absorção dos carotenóides, tais como: diferenças de pH, motilidade intestinal e formação de micelas, bem como a variação no tipo e quantidade da gordura dietética.

Castenmiller et al. (1998) afirmaram que a lecitina pode aumentar a absorção de triacilgliceróis, facilitando a formação de micelas e absorção de ácidos graxos de cadeia longa, o que consequentemente aumentam a absorção das vitaminas lipossolúveis. Os autores enfatizaram que uma quantidade mínima de gordura é necessária na dieta para que ocorra a absorção dos carotenóides. Entretanto, Kienzle et al. (2003) não encontraram diferença na utilização de óleo como veículo para fontes de vitamina A e concluíram que apenas 2% de lipídios na dieta são suficientes para absorção dessa vitamina.

1.5. Hipovitaminose A

A vitamina A apresenta inúmeras funções na fisiologia do organismo, sendo fundamental para a visão, reprodução, manutenção dos epitélios, crescimento e saúde do animal (Rezende, 1982). A hipovitaminose A provoca efeitos adversos no crescimento e na reprodução dos equinos, além de aumentar o risco de acometimento dos animais por doenças infecciosas. É também requerida para o

desenvolvimento do tecido ósseo. Defeitos congênitos, degeneração neural, infertilidade, perda de peso, cegueira noturna e problemas de aprumos também são observados na sua deficiência (Garcia et al., 2006).

Segundo Jones et al. (2000) a deficiência de vitamina A também pode provocar malformação de esqueleto e dentes, aumentar a pressão do fluido cérebro - espinhal e favorecer o aparecimento de anomalias do desenvolvimento e câncer. Esses autores apontaram a cegueira noturna como o primeiro sinal de hipovitaminose A, o que também foi verificado pelo NUTRIENT... (2007) que denominou esse sintoma como clássico na deficiência de vitamina A em equinos.

As células visuais contêm proteínas conhecida como opsinas, que combinadas ao 11-*cis*-retinal, transformam-se em pigmentos fotossensíveis: rodopsina, nas células dos bastonetes e três diferentes iodopsinas nas células dos cones. O 11-*cis*-retinal é derivado do retinol circulante, que é primeiramente oxidado a *all-trans*-retinal, e em seguida isomerizado a 11-*cis*-retinal. Quando a rodopsina é exposta a luz, ocorre uma série de eventos que reduzem essa substância à *all-trans*-retinal e opsina, sendo em seguida emitido um sinal nervoso através das vias visuais. Durante a adaptação ao escuro, praticamente todo *all-trans*-retinal é convertido a retinol; uma pequena parte da substância é reutilizada, contudo grande parte do retinol se perde, o que exige uma fonte contínua de retinol circulante (Jones et al., 2000).

Guilbert et al. (1939) ao submeterem cavalos da raça Percheron à dietas deficientes em vitamina A, observaram sintomas tais como a cegueira noturna, lacrimejamento excessivo, xeroftalmia, sangramento pelas narinas, fraqueza e perda de peso.

Howell et al. (1941) verificaram o nascimento de potros normais, filhos de éguas submetidas a deficiência de vitamina A durante a gestação. Entretanto, os potros sobreviveram durante apenas 3 dias. Quando realizada a necropsia, os pesquisadores não encontraram vitamina A nos tecidos hepáticos dos animais.

Fonnesbeck e Symons (1967) encontraram níveis de retinol considerados deficientes (<10 µg/dl) em garanhões alimentados com feno de diferentes espécies forrageiras. Entretanto, os animais não apresentaram sintomas de deficiência. Contrariamente, Donoghue et al. (1981) observaram sintomas de hipovitaminose A em equinos alimentados com dietas deficientes em vitamina A. Os autores constataram perda de peso e pêlos visualmente mais escuros nesses animais quando comparados a àqueles saudáveis.

Greiwe-Crandell et al. (1995) avaliaram a influência de diferentes dietas nas concentrações séricas de retinol em éguas, verificando que animais que não tiveram acesso a pasto e foram alimentados com feno e concentrado apresentaram deficiência de vitamina A após dois meses de submissão a dieta.

Pereira (2000) relatou que éguas com baixas concentrações séricas de retinol pariram potros com deformidade na conformação dos membros locomotores, o que corrobora com Meyer (1995) que apontou a importância da vitamina A na formação óssea.

1.6. Hipervitaminose A

Na hipervitaminose A ocorre destruição das placas cartilaginosas do crescimento, que ficam adelgadas e sofrem degeneração irregular e prematura. Esse processo permite com que uma parte da placa cresça e a outra atrofie, o que causa deformação e encurtamento dos ossos, levando ao nanismo. Ocorre uma expansão das metáfises, tuberosidades tibiais e trocânter do fêmur; enquanto que as tuberosidades umerais ficam alongadas. Podem também ocorrer rotações das epífises. Também fica evidente a redução na formação de tecido ósseo do crânio, que podem se tornar adelgados e suas suturas podem fechar-se prematuramente, resultando no aumento da pressão intracraniana (Jones et al., 2000).

Donoghue et al. (1979) estudaram diferentes níveis de vitamina A sintética em ovelhas e observaram hiperplasia epitelial das células abdominais nos animais que haviam recebido níveis considerados de média e severa toxicidade.

Donoghue et al. (1981) avaliaram diferentes níveis de suplementação de vitamina A sintética em equinos e verificaram que os animais alimentados com concentração equivalente a 12000 µg

retinol/ kg PV/ dia, apresentaram perda de tônus muscular, depressão, alopecia, ulceração da epiderme e posicionamento em decúbito lateral.

1.7. Instabilidade do betacaroteno nas forragens

Alguns fatores interferem na estabilidade dos carotenóides, como a presença de insaturações (ligações duplas) que torna-os sensíveis a luminosidade, temperatura, acidez e reações de oxidação. Portanto, a composição isomérica *cis* aumenta com o processamento dos alimentos, particularmente com a elevação da temperatura, sendo a quantidade formada diretamente relacionada com a severidade e extensão do tratamento ao calor (Castenmiller et al., 1998; Ambrósio et al., 2006).

Para Rodriguez-Amaya (1997), a cadeia poliênica dos carotenóides constitui a causa da instabilidade, contribuindo para a susceptibilidade desses compostos à oxidação que pode ser considerada a principal causa de perdas dos carotenóides.

O betacaroteno é progressivamente deteriorado nos fenos e outros alimentos estocados, assim como nas pastagens durante a estação seca do ano. Nos fenos as principais causas da variação do conteúdo de caroteno está relacionada com o estágio de maturidade e espécie da forrageira, assim como a exposição à luminosidade, precipitação pluviométrica e condições de secagem (Cunha et al., 1980; Schryver e Hintz, 1983; McDowell, 1989).

Diversas pesquisas demonstraram a deteriorização dos precursores da vitamina A nos alimentos (Waite e Sastry, 1949; Aiken e Hankin, 1970; Schryver e Hintz, 1983; Bondi e Sklan, 1984).

Waite e Sastry (1949) utilizaram espécies de gramíneas perenes adaptadas a clima frio (*Lolium perenne* e *Phleum pretense*) em máquina de secagem elétrica testando diferentes tempos e temperaturas que variaram de 20 minutos até 6 horas e 95°C até 165°C, respectivamente, concluindo que as perdas de betacaroteno aumentaram com a extensão desses fatores. Posteriormente, Aitken e Hankin (1970) afirmaram que os processos de desidratação das gramíneas seriam responsáveis pelas perdas do betacaroteno.

Entretanto, Schryver e Hintz (1983) responsabilizaram a duração do período de estocagem como fator determinante na degradação do betacaroteno dos fenos, enquanto Bondi e Sklan (1984) afirmaram que as concentrações de caroteno nas plantas verdes podem variar de 200-800 mg/kg de matéria seca e que são fortemente influenciadas pelas condições de crescimento e idade da planta. Esses autores concluíram que o declínio na concentração de betacaroteno durante a secagem ocorre devido à ação da enzima lipoxidase, sendo a extensão dessa perda dependente do tempo e temperatura na qual essa enzima pode agir. Os autores inferiram que os processos de emurchecimento e secagem a campo em dias quentes não devem exceder 3 horas, pois dessa forma a redução do betacaroteno não ultrapassaria 15 a 20% do conteúdo inicial da gramínea fresca.

1.8. Exigências de vitamina A para equinos

Rasmussen et al. (1944) analisaram os níveis de caroteno e vitamina A no plasma de éguas durante o período de brotação e crescimento das pastagens e verificaram que a medida que a pastagem cresceu, o nível de caroteno no plasma dos animais aumentou de $34,6 \pm 24,6$ para $134,9 \pm 71,0$ µg/ dl, entretanto para os níveis de vitamina A, os valores foram $12,8 \pm 3,6$ e $12,5 \pm 3,4$ µg/ dl nos respectivos períodos avaliados o que pode ser explicado pela ineficiência dos cavalos em converter carotenóides em vitamina A. Posteriormente, Ullrey (1972) afirmou que a coloração amarela no plasma sanguíneo e na gordura corporal de equinos submetidos a dietas ricas em carotenóides caracterizavam a extensão de como os carotenóides são absorvidos e podem permanecer inalterados nessa espécie.

Fonnesbeck e Symons (1967) estudaram os níveis de vitamina A em garanhões alimentados com fenos de diferentes espécies forrageiras em dois ensaios experimentais e verificaram que em ambos os experimentos, o feno de alfafa mostrou-se mais eficiente em manter os níveis de vitamina A plasmático quando comparado com os fenos de gramíneas, mesmo quando sua ingestão foi inferior as demais forrageiras em estudo. Os autores concluíram que existem diferenças na disponibilidade do caroteno entre espécies de forrageiras que podem ser atribuídas à colheita, estocagem e atividade

biológica do caroteno. Rodriguez-Amaya (1997) atribuiu as diferenças na concentração de caroteno entre fenos de diferentes espécies a fatores como textura das folhas, estabilidade no emurhecimento e fotossensibilidade da planta.

Resultados semelhantes àqueles encontrados por Fannesbeck e Symons (1967) foram verificados por Crozier et al. (1997) que determinaram o consumo voluntário e a concentração sérica de vitamina A em garanhões árabes alimentados com fenos de alfafa (*Medicago sativa*), tall fescue (*Festuca arundinacea*) e caucasian bluestem (*Bothriochloa caucasica*). Esses autores encontraram diferenças superiores ($p < 0,01$) nos níveis séricos de vitamina A em animais alimentados com feno de alfafa.

Donoghue et al. (1981) estudaram a influência de vitamina A sintética nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de potros e verificaram que 60-200 UI retinol/ kg PV maximizaram o crescimento, otimizaram o metabolismo hepático e a hematopoiese. Entretanto, o NUTRIENT... (2007) preconizou 45 UI retinol/ kg PV para animais em crescimento.

Sklan e Donoghue (1982) avaliaram diferentes níveis de suplementação de vitamina A sintética em potros de 18 meses de idade durante 40 semanas e observaram que as concentrações de retinol e ésteres de retinil no plasma e tecidos aumentaram com a ingestão de vitamina A. No plasma dos animais com ingestão normal de vitamina A, a forma encontrada foi retinol - PLR e ésteres de retinil. Entretanto, nos animais que consumiram altos níveis de vitamina A foram observados aumento nas concentrações de ésteres de retinil, o que foi caracterizado pelos autores como hipervitaminose A.

Pereira (2000) avaliou mensalmente a concentração sérica de retinol em éguas gestantes sem suplementação concentrada na Região Metalúrgica e Norte de Minas Gerais durante o período seco, e encontraram níveis deficientes de retinol sérico após o terceiro mês de escassez de chuvas. Resultados contrários foram constatados por Garcia et al. (2006) ao estudarem as concentrações séricas de retinol em éguas gestantes sem suplementação concentrada nos meses de maio a novembro nas regiões Vale do Rio Doce e Sul de Minas Gerais. Esses pesquisadores observaram que embora tenha ocorrido ausência total de chuvas durante dois meses do período experimental, os animais não apresentaram deficiência dessa vitamina nas regiões estudadas. Os autores justificaram que as gramíneas utilizadas na pastagem estavam adaptadas as condições de solo e climáticas da região, que juntamente com a baixa taxa de lotação dos pastos conferiram maior oferta de forragem aos animais que estocaram vitamina A no fígado, suprimindo suas necessidades orgânicas no período de escassez de fonte de betacaroteno.

A tabela 1 apresenta as necessidades de vitamina A (UI/ kg PV) dos equinos para todas as categorias animal segundo o NUTRIENT... (2007).

Tabela 1 – Exigências nutricionais de vitamina A para as categorias equina

Categoria animal	Exigência (UI/kg PV)
Mantença	30
Crescimento	45
Gestação	60
Lactação	60
Trabalho	45
Reprodução	60

UI – unidade internacional

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, F.C.; HANKIN, R.G. Vitamins in feeds for livestock. Bucksburn, Aberdeen - Scotland. Commonwealth Bureau of Animal Nutrition. *Technical Communication*, n.25, 1970.

AMBRÓSIO, C.L.B.; CAMPOS, F.A.C.S.; FARO, Z.P. Carotenóides como alternativa contra hipovitaminose A. *Revista de Nutrição de Campinas*, v.19, n.2, p.333-43, 2006.

- AQUINO, R.C.P. *Avaliação das concentrações hepáticas e séricas de retinol em bovinos e do consumo habitual de fígado por gestantes*. 2005. 56f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.
- BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Plant Carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*, v.7, p.1027-1038, 1995.
- BLAKLEY, B.R.; BELL, R.J. The vitamin A and vitamin E status of horses raised in Alberta and Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*, p.297-300, 1994.
- BLOMHOFF, R.; BLOMHOFF, H.K. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology*, v.66, n.7, p.606-630, 2006.
- BONDI, A.; SKLAN, D. Vitamin A and Carotene in Animal Nutrition. *Progress in Food & Nutrition Science*, v.8, p.165-191, 1984.
- BUCKER, R.B.; SUTTIE, J.W.; McCORMICK, D.B.; MACHLIN, L.J. *Handbook of Vitamins*. 3ed. New York: Marcel Dekker, 2001. 616p.
- CASTENMILLER, J.J.M.; WEST, C.E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, v.18, p.19-38, 1998.
- COLLINS, M.D.; MAO, G.E. Teratology of Retinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.39, p.399-430, 1999.
- CROZIER, J.A.; ALLEN, V.G.; JACK, N.E.; FONTENOT, J.P.; COCHRAN, M.A. Digestibility, Apparent Mineral Absorption and Voluntary Intake by Horses Fed Alfafa, Tall Fescue and Caucasian Bluesten. *Journal of Animal Science*, v.75, p.1651-1658, 1997.
- CUNHA, T.J. *Horse feeding and nutrition*. 2.ed. California: Academic Press, 1980. 445 p.
- DONOGHUE S.; KRONFELD, D.S.; RAMBERG, C.F. Plasma retinol transport and clearance in hipervitaminosis A. *Journal of Dairy Science*, v.62. p.326-332, 1979.
- DONOGHUE, S.; KRONNFELD, D.S.; BERKOWITZ; S.J.; COPP, R.L. Vitamin A nutrition in the equine: Grown, serum biochemistry and hematology. *Journal of Nutrition*, v.111, n.2, p.365-374, 1981.
- DURING, A.; FIELDS, M.; LEWIS, C.G.; SMITH, J.C. β -carotene 15, 15'dioxygenase activity is responsive to copper and iron concentrations in rat small intestine. *Journal of the American College of Nutrition*, v.18, p.309-315, 1999.
- ED KANE. Beta-carotene: An essential nutrient for horses. In: KENTUCKY EQUINE RESEARCH NUTRITION CONFERENCE, 2004, Versailles. *Proceedings...* Versailles, 2004, p.86-94.
- EL BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MORAES, E.N.; FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; VANNUCCHI, H. Deficiência de vitamina A e associações clínicas: revisão. *Archivos Latinoamericanos de Nutritión*, v. 53, n.4 p.5-15, 2003.
- FONNESBECK, P.V.; SYMONS, L.D. Utilization of the carotene of hay by horses. *Journal of Animal Science*, v.26, n.5, p.1030-1038, 1967.
- GARCIA, T.R.; REZENDE, A.S.C.; SAMPAIO, I.B.M.; LANA, A.M.Q; MOURA, R.S. Concentrações séricas de retinol em éguas gestantes em haras do Vale do Rio Doce e Sul de Minas Gerais. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.6, p.1174-1180, 2006.

- GREIWE-CRANDELL, K.M.; KRONFELD, D.S.; GAY, L.A.; SKLAN, D. Seasonal vitamin A depletion in grazing horses is assessed better by the relative dose response test than by serum retinol concentration. *Journal of Nutrition*, v.125, p.2711-2716, 1995.
- GUILBERT, H.R.; HOWELL, C.E.; HART, G.H. Minimum vitamin A and carotene requirements of mammalian species. *Journal of Nutrition*, v.19, p.91-103, 1939.
- HOWELL, C.E.; HART, G.H.; ITTNER, N.R. Vitamin A in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v.2, n.7, p.60-74, 1941.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária*. 1.ed. São Paulo: Editora Manole. 2000. 1415p.
- KIENZLE, E.; KADEN, C.; HOPPE, P.P.; OPITZ, B. Serum β - carotene and α - tocopherol in horses fed β - carotene via grass meal or a synthetic beadlet preparation with and without added dietary fat. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.87, p.174- 180, 2003.
- LIPPEL, K.; OLSON, J.A. Biosynthesis of β - glicuronides of retinal and retinoic acid *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Lipid Research*, v.9, p.158-175, 1968.
- MCDOWELL, L.R. *Vitamins in Animal Nutrition*. San Diego: Academic Press. 1989. 486p.
- MEYER, H. Alimentação de cavalos. São Paulo: São Paulo. 1995. 303p.
- NAGAO, A. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *Journal of Nutrition*, v.134, p.237-250, 2004.
- NUNES, I.J. *Nutrição animal básica*. Belo Horizonte: FEPMVZ. 1998. 388p.
- NUTRIENT Requirement of Horses. 6 ed. Washington: National Academy Press, 2007. 341p.
- PENNA, D.D.; POGSON, B.J. Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, v.57. p.711-738, 2006.
- PEREIRA, F.N. *Avaliação da concentração de retinol em éguas gestantes a pasto durante o período de seca em duas regiões de Minas Gerais*. 2000. 36 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- RASMUSSEN, R.A.; COLE, C.L.; MILLER, M.J. Carotene, vitamin A and ascorbic acid in mare's plasma. *Journal of Animal Science*, v.3. p. 346-350, 1944.
- REZENDE, A.S.C. Vitamina A na alimentação de equídeos, 1982. In: Seminário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS.
- RODRIGUEZ - AMAYA, D.B. *Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods*. Arlington, 1997, 93p.
- SCHRYVER, H.F.; HINTZ, H.F. *Current Therapy in Equine Medicine*. Philadelphia: Saunders, 1983.
- SHEWMAKER, C.K.; SHEEHY, J.A.; DALEY, M.; COLBURN, S.; YANG KE, D. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: Increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal*, v.20, n.4, p.401-412, 1999.
- SKLAN, D.; DONOGHUE, S. Serum and intracellular retinol transport in the equine. *British Journal of Nutrition*, v.47, n.2, p.273-280, 1982.

ULLREY, D.E. Biological availability of fat - soluble vitamins: vitamin A and carotene. *Journal of Animal Science*, v.35. p.648-657, 1972.

WAITE, R.; SASTRY, K.N.S. The carotene content of dried grass. *Journal of Agriculture Science*, v.39, p.174, 1949.

WOLF, G.; PHIL, D.A. historical note on the model of administration of vitamin A for the cure of night blindness. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.31, p.290-292, 1978.

CAPÍTULO II

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE RETINOL E MINERAIS EM POTROS NA SECA

RESUMO

Esta pesquisa foi realizada um mês após a estiagem das chuvas, durante os meses de junho a outubro de 2008. Sete potros Mangalarga Marchador foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia, sem qualquer suplementação de volumoso ou concentrado. Em intervalos de 45 dias foram coletadas amostras sanguíneas para determinação de retinol e minerais e realizada amostragem da pastagem para quantificação do betacaroteno. Durante o período estudado as concentrações de retinol decresceram ($P<0,05$) e foram inferiores aos níveis preconizados como normais pela literatura. Os níveis de zinco, ferro, cálcio e fósforo não diferiram ($P>0,05$) durante o período estudado. Cobre e magnésio apresentaram níveis decrescentes ($P<0,05$). Zinco e cálcio foram deficientes quando comparados com os níveis citados como normais. O betacaroteno da pastagem declinou ($P<0,05$) ao longo do tempo. O estudo da associação entre minerais, retinol e betacaroteno demonstrou que o cobre sérico é o mineral mais associado com o retinol sanguíneo. Concluiu-se que existe a necessidade de suplementação com vitamina A em potros criados a pasto, após um período de aproximadamente 30 dias de ausência das chuvas.

Palavras-chave: carotenóides, hipovitaminose A, nutrientes

RETINOL AND MINERAL LEVELS IN SERUM OF FOALS DURING DRY SEASON

ABSTRACT

This research was realized within dry season, from July to October 2008. Seven Mangalarga Marchador male foals remained on *Panicum maximum* cv. Tanzânia pasture. No other supplementation was fed. The each 45 days blood samples were taken to determine retinol and mineral levels in serum, altogether with pasture samples to quantify beta-carotene in grass. During the above period retinol levels varied ($P<0,05$), being all such levels below standard levels found in literature. Zn, Fe, Ca and P levels did not experience significant variation ($P>0,05$) within that period. On the other hand, Cu and Mg showed decreasing levels in time ($P<0,05$). Zn and Ca were insufficient at all times when compared to their standard levels. Beta-carotene in grass showed a decreasing ($P<0,05$) trend in time. When all these minerals, retinol and beta-carotene were studied in a multivariate analysis, serum Cu came out to be the mineral with higher association to serum retinol levels. Results also suggest that vitamin A supplementation should be provided to foals under present conditions during dry season.

Key-words: carotenoids, hipovitaminosis A, nutrients

1. INTRODUÇÃO

Equinos mantidos a pasto têm como única fonte nutricional de vitamina A as forragens frescas. Contudo, durante o período seco do ano quando as pastagens apresentam baixo valor nutricional e consequentemente as concentrações de betacaroteno decrescem, os animais tornam-se susceptíveis a deficiência dessa vitamina.

Ainda que os equinos possam armazenar retinol no fígado, não se sabe com precisão o tempo máximo de estocagem no qual os animais conseguem manter os níveis séricos dentro daqueles preconizados como normais pela literatura.

Bondi e Sklan (1984) afirmaram que os níveis séricos de vitamina A não refletem a condição nutricional do animal, exceto em condições de severa hipo e hipervitaminose. Entretanto, para Bucker et al. (2001), as concentrações séricas de retinol refletem o estado nutricional de vitamina A do animal, particularmente quando as reservas corporais estão limitadas, pois segundo esses autores, os níveis séricos são homeostaticamente controlados e não declinam até que as reservas hepáticas estejam significativamente comprometidas. Essa afirmação foi consolidada pelo NUTRIENT... (2007) o qual enfatizou que as concentrações séricas de retinol devem ser utilizadas como indicador de deficiência de vitamina A.

Em acréscimo ao relevante papel desempenhado pela vitamina A, deve ser ressaltada sua interação com os minerais no metabolismo animal. Segundo o NUTRIENT... (2007) os minerais exercem funções importantes no organismo, pois estão envolvidos no balanço ácido - base, formação de componentes estruturais, co-fatores enzimáticos e transferência de energia.

Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi determinar as concentrações séricas de retinol e minerais (zinco, ferro, cobre, cálcio, fósforo e magnésio) em potros Mangalarga Marchador mantidos a pasto durante o período seco e verificar se existe a necessidade de suplementação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e animais

O experimento foi conduzido no Haras Catuni, Fazenda Santa Helena, município de Montes Claros - Minas Gerais durante o período de junho a outubro de 2008.

A cidade de Montes Claros está localizada nas coordenadas 16°44'06" latitude sul e 43°51'42" longitude oeste e integra o Polígono da Seca; apresenta altitude de 648 metros acima do nível do mar e temperatura média anual de 24,2°C. O clima da região é quente e seco com precipitação média anual de 1082,3 mm distribuídos no período de outubro a março.

Durante o período experimental, os índices de precipitação pluviométrica da propriedade (figura 1) foram registrados através da utilização de pluviômetro¹.

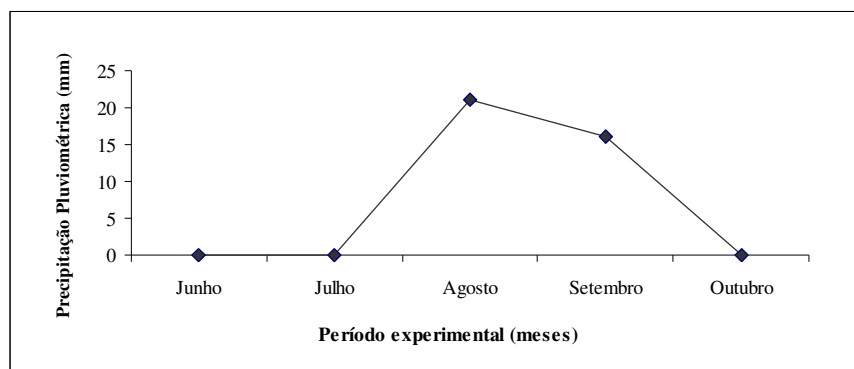


Figura 1 - Precipitação pluviométrica registrada no Haras Catuni - MG, durante o período experimental

¹ HD 307

A figura 2 representa os índices pluviométricos acumulados nos intervalos de cada coleta: dias 1, 45, 90 e 135, correspondentes aos meses de junho, julho, setembro e outubro, respectivamente.

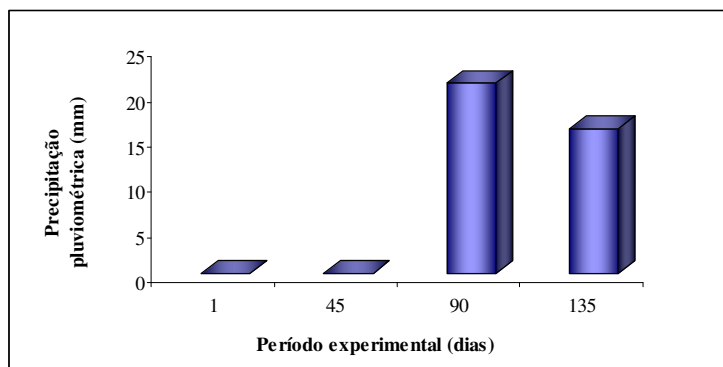


Figura 2 - Precipitação pluviométrica acumulada nos intervalos de coletas realizadas no Haras Catuni - MG

Foram utilizados sete equinos, do sexo masculino e da raça Mangalarga Marchador, com média de 11 meses de idade e peso vivo inicial $224,42 \pm 46,29$ kg. Os animais tomaram banho carrapaticida² e foram vermifugados³ no início do experimento. Os potros foram desparasitados em intervalo de dois meses até o final do período experimental.

Os animais permaneceram soltos em piquete numa área de 5 hectares constituído de pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia (tabela 1), sem qualquer suplementação volumosa ou concentrada. Os animais tiveram acesso a água e sal mineral⁴ *ad libitum* (tabela 2).

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemiceluloses (HEM), lignina Klason (LIG), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), matéria mineral (MM), Cálcio (Ca), Fósforo (P) e energia bruta (EB) do *Panicum maximum* cv. Tanzânia durante o período experimental

Nutrientes ¹	Período Experimental (dias)			
	1	45	90	135
MS (%)	40,83	42,80	38,45	87,83
PB (%) ²	7,94	5,59	6,00	5,98
FDN (%) ²	68,92	65,61	72,20	80,57
FDA (%) ²	39,34	36,91	41,90	50,20
HEM (%) ²	29,58	28,70	30,31	30,37
LIG (%) ²	14,44	11,67	12,61	13,15
NIDA (%) ²	3,28	2,57	2,23	2,08
MM (%) ²	14,34	12,93	10,57	11,03
Ca (%) ²	0,75	0,61	0,53	0,54
P (%) ²	0,13	0,15	0,16	0,12
EB (Mcal/ kg) ²	4,78	4,07	4,10	3,98

¹Dados obtidos no Laboratório de Nutrição Animal/ Departamento de Zootecnia/ Escola de Veterinária/ UFMG através das técnicas descritas por Silva e Queiroz (2002).

²Dados com base na matéria seca.

² Butox

³ Ivermectina Gel Composto - Ourofino

⁴ Equinosal - Tecnutri

Tabela 2 - Níveis de garantia por kg (base na matéria natural) do sal mineral fornecido aos animais durante o período de junho a outubro

Minerais	Concentração
Cálcio – g	140
Fósforo – g	75
Sódio – g	137
Magnésio – g	14
Enxofre – g	14
Ferro – mg	1200
Manganês – mg	1200
Zinco – mg	3000
Cobre – mg	1250
Cobalto – mg	60
Iodo – mg	130
Selênio – mg	30
Flúor – mg (máximo)	750

2.2. Procedimentos para coleta de material

Amostras de sangue dos potros e forragem da área de pastejo foram coletadas em intervalos de 45 dias: 1, 45, 90 e 135 dias do período experimental.

O procedimento para amostragem sanguínea foi realizado através de punção na veia jugular utilizando tubos tipo *Vacutainer*⁵ de 10 ml (sem anticoagulante) que foram imediatamente acondicionados em caixa de isopor protegida da luminosidade com papel alumínio a fim de evitar a oxidação do retinol. Ao término de cada coleta, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rotações por minuto (RPM) para separação da fração sérica sanguínea. As amostras dos soros obtidos de cada animal foram então pipetadas e acondicionadas em tubos criogênicos âmbar⁶ 1,5ml e embalados em papel alumínio, resfriados e congelados a -20°C até o momento em que foram descongelados para análise de retinol.

Amostras da forrageira foram obtidas segundo a técnica descrita por Gardner (1986) que consistiu em coletar manualmente o capim, em pontos distribuídos uniformemente na área da pastagem, simulando o hábito de pastejo dos equinos. A amostra da gramínea foi acondicionada em sacos plásticos pretos e em seguida cortada com tesoura, em ambiente protegido da luminosidade. O material foi então embalado em diversas camadas de plástico preto, envolto em papel alumínio e congelado a -20°C para análise de betacaroteno.

As extrações de retinol e betacaroteno foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária - UFMG enquanto que a determinação das concentrações de ambos os parâmetros foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Ciências Exatas – UFMG.

2.3. Metodologia para extração e leitura do retinol

A extração do retinol foi realizada conforme procedimento descrito por Pesce e Kaplan (1987) e evitando exposição à luminosidade durante toda a execução da análise.

Uma alíquota de 200µl de soro foi transferida para tubo criogênico âmbar e adicionado 200µl do padrão interno *all-trans*- acetato de retinol⁷ e agitados em vórtex durante 10 segundos. Em seguida foi acrescentado 200µl de hexano⁸ a essa solução, que em seguida foi agitada durante 45 segundos. Posteriormente a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 RPM. Uma alíquota de

⁵ Venoject

⁶ ST- 050- SS - Biosystem

⁷ Sigma 46958

⁸ Vetec

100µl do sobrenadante foi transferida para outro tubo criogênico âmbar e evaporado o solvente sob nitrogênio. Em seguida, o retinol foi dissolvido em 100µl de metanol⁹ grau UV/HPLC, agitado em vórtex e então foram injetados 20µl da solução no cromatógrafo.

O aparelho utilizado foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca *Shimadzu*, bomba LC - 20 AT, detector de ultravioleta UV – VIS modelo SPD - 20A. Empregou-se uma coluna analítica *ODS Hypersil*, 60 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno e granulometria 3 µm.

A fase móvel utilizada para eluição dos constituintes foi composta por 5% água e 95% metanol grau UV/HPLC em fluxo de 1ml/min. A amostra foi injetada com injetor *Hamilton* e a detecção do retinol foi realizada em comprimento de onda 280nm. O software utilizado para aquisição e gerenciamento de dados foi o *LC Solution*.

Para obtenção das curvas dos padrões foram preparadas soluções estoque padrão de concentração 1 mg/L (100 µg/ dl) do *all- trans-* retinol¹⁰ e *all- trans-* acetato de retinol. As soluções foram sonicadas durante 5 minutos, armazenadas em vidros escuros, envoltos de papel alumínio e mantidos a -20°C.

A figura 3 representa a curva de regressão dos padrões com concentrações de retinol 0,68; 1,6; 3,2; 4,8; 6,4 e 16 µg/dl, obtidas a partir de soluções padrões de trabalho como demonstradas na tabela 3. As soluções padrões de trabalho foram derivadas das soluções estoque padrão.

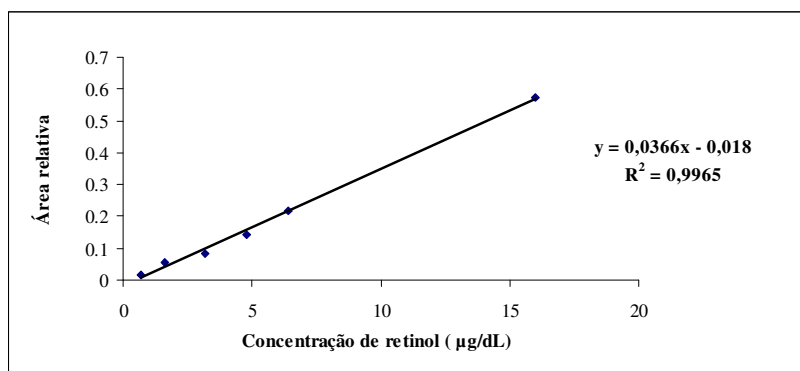


Figura 3 - Curva de regressão obtida a partir dos padrões *all- trans-* retinol e *all- trans-* acetato de retinol

Tabela 3 - Concentrações de *all- trans-* retinol e *all- trans-* acetato de retinol das soluções padrões de trabalho

Soluções Padrões	Retinol (µg/dl)	Acetato de retinol (µg/dl)
1	0,17	25
2	0,40	25
3	0,80	25
4	1,2	25
5	1,6	25
6	8,0	50

O tempo de retenção do *all- trans-* retinol e *all- trans-* acetato de retinol foram de 1 minuto e 8 segundos e 2 minutos e 5 segundos respectivamente, no tempo de corrida de 7 minutos. A figura 4 demonstra um cromatograma do padrão de concentração 0,8: 25 µg/dl (*all- trans-* retinol: *all- trans-* acetato de retinol).

⁹ Vetec

¹⁰ Sigma 7632

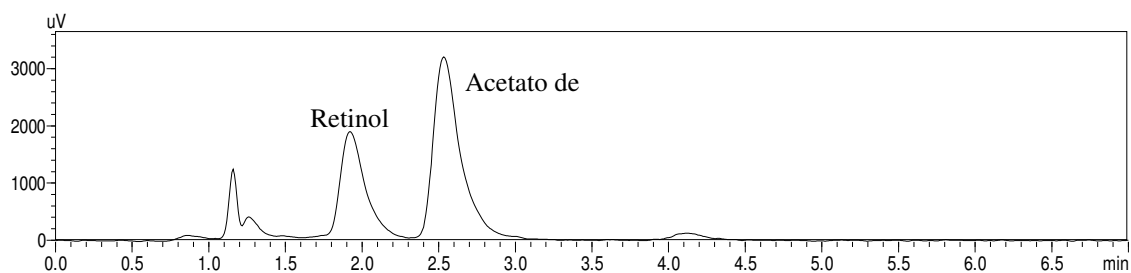


Figura 4 - Cromatograma dos padrões *all- trans*- retinol e *all- trans*- acetato de retinol

Para determinação do índice de recuperação realizou-se a análise em triplicata de uma amostra, como descrito: Foram pipetados 200µl de soro em tubo criogênico âmbar e adicionados 200µl do padrão interno *all- trans*- acetato de retinol. A amostra foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida foram acrescentados 200µl do padrão externo *all- trans*- retinol e 200µl de hexano. Novamente a solução foi agitada durante 45 segundos. Posteriormente a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 RPM. Uma alíquota de 100µl do sobrenadante foi transferida para outro tubo criogênico âmbar e evaporado o solvente sob nitrogênio. A amostra foi recuperada com 100µl de metanol grau UV/HPLC e imediatamente agitada em vórtex e em seguida injetou-se 20µl no cromatógrafo. Foi obtido um índice de recuperação da amostra de 95,14%.

2.4. Metodologia para extração e leitura do betacaroteno

A metodologia adotada para extração do betacaroteno nas amostras da gramínea *Panicum maximum* cv. Tanzânia foi realizada de acordo com CAROTENES IN FRESH PLANT... (1995).

Em tubos do tipo falcon, foram pesados aproximadamente 0,5 gramas da amostra úmida da gramínea previamente cortada com tesoura. Em seguida foram adicionados 4 ml de acetona¹¹, 6 ml de hexano e 10 mg de carbonato de magnésio (MgCO₃)¹². Os tubos foram embalados em papel alumínio e submetidos ao banho ultrassônico durante 10 minutos. Posteriormente, transferiu-se a parte líquida para um funil de separação e lavou-se duas vezes o resíduo da amostra do tubo com 2 ml de acetona e em seguida, uma vez com 2 ml de hexano, sempre transferindo o lavado para o funil de separação. O extrato obtido foi lavado cinco vezes com 10 ml de água ultrapura para retirada da acetona, descartando em cada lavagem a fase inferior. Em seguida, a camada superior foi transferida para um balão volumétrico de 10 ml, contendo 1 ml de acetona. Completou-se então o volume do balão com hexano. Uma alíquota de 20µl do extrato foi injetada no cromatógrafo.

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca *Shimadzu*, bomba LC - 20 AT, detector de ultravioleta UV - VIS modelo SPD - 20A. Empregou-se uma coluna analítica *ODS Hypersil*, 60 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno e granulometria 3 µm.

A fase móvel foi constituída de 100% metanol grau UV/HPLC com fluxo de 1 ml/min. A amostra foi injetada com injetor *Hamilton* e a detecção realizada em comprimento de onda 450nm. O software utilizado para aquisição e gerenciamento de dados foi o *LC Solution*.

As figuras 5 e 6 representam as curvas de regressão utilizadas para adequação das concentrações de betacaroteno a partir de diferentes diluições do padrão externo *all- trans*-betacaroteno¹³.

¹¹ Vetec

¹² Vetec

¹³ Sigma C9750

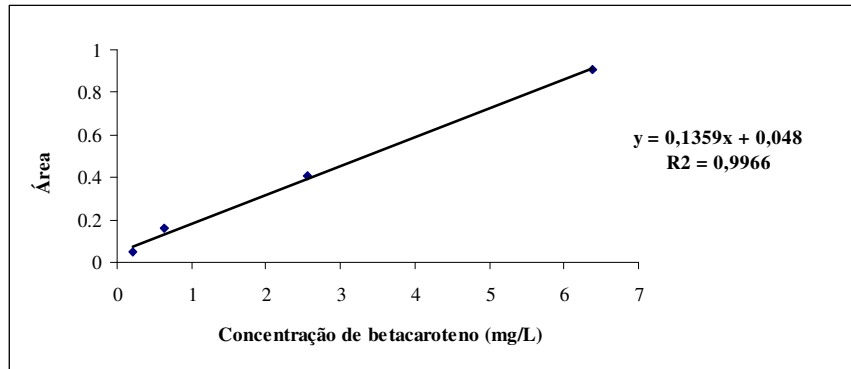


Figura 5 - Curva de regressão obtida a partir das diluições do padrão externo *all-trans*- betacaroteno

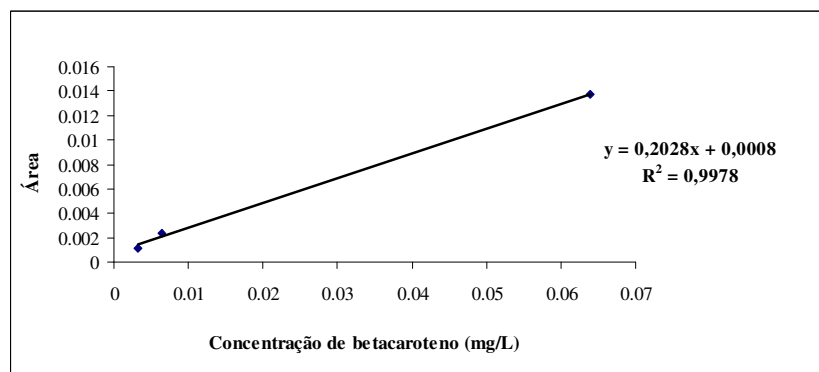


Figura 6 - Curva de regressão obtida a partir das diluições do padrão externo *all-trans*- betacaroteno adotadas para amostras coletadas aos 135 dias do período experimental

O tempo de retenção para o betacaroteno foi 6 minutos e 7 segundos num tempo de corrida de 9 minutos como representado na figura 7.

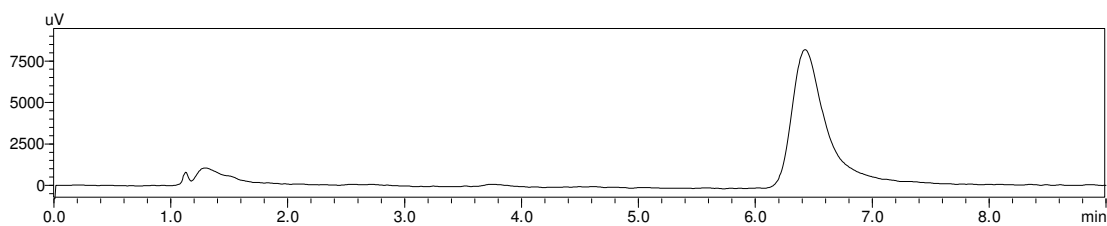


Figura 7 - Cromatograma do padrão do *all-trans*- betacaroteno

2.5. Análise de minerais

A determinação dos minerais foi realizada na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC.

As concentrações sorológicas de zinco foram quantificadas, pois esse mineral desempenha função no transporte intra e intercelular do retinol e atua na rota metabólica dessa vitamina, conforme citado por Rahman et al. (2002). Também foram determinadas as concentrações sorológicas de ferro, cobre, cálcio, fósforo e magnésio.

Para determinação desses minerais foi adotada a técnica empregada por Rocha et al. (2009). O procedimento consistiu na diluição de 500µl do soro dos animais em balões de 10 ml contendo Triton¹⁴ X-100 (0,1%). Em seguida, essas amostras foram analisadas no equipamento de espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

¹⁴ Merck

2.6. Análise estatística

Para os dados do retinol e minerais, o delineamento estatístico utilizado foi blocos ao acaso com quatro tratamentos. Os animais constituíram os blocos, sendo os mesmos as repetições ($n = 7$) e os tratamentos foram os diferentes tempos de avaliação: 1, 45, 90 e 135 dias (tabela 4).

As concentrações de retinol não apresentaram normalidade e homocedasticidade, tendo seus desvios - padrões apresentado comportamento errático. Portanto, foi aplicado o teste de Friedman a 5% de probabilidade do erro, utilizando o software GRAPHPAD... (2003).

Para análise das médias das concentrações de minerais adotou-se o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade de erro empregando o software SAEG (2006).

Tabela 4 - Tabela de análise de variância para os dados de retinol e minerais em equinos

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Total	27
Blocos	6
Tratamentos	3
Erro	18

Para análise do betacaroteno da pastagem de *Panicum maximum cv Tanzânia*, o delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, no qual os tempos (1, 45, 90 e 135 dias) foram os tratamentos, sendo que cada tempo teve quatro repetições (tabela 5). Foi adotado o teste SNK a 5% de probabilidade de erro, para comparação entre as médias, empregando o software SAEG (2006).

Tabela 5 - Tabela de análise de variância para os dados de betacaroteno na pastagem

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Total	15
Tratamentos	3
Erro	12

Análise multivariada foi empregada para estudo da associação entre retinol e minerais séricos, e betacaroteno da pastagem através da utilização do Programa InfoStat.

O protocolo desse estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal – CETEA, da Universidade Federal de Minas Gerais, que apreciou e emitiu parecer favorável com o número de registro 194/08 sobre a pertinência ética para com os animais experimentais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Concentrações séricas de retinol e minerais

Durante o período de escassez de chuvas (figuras 1 e 2) houve diferença ($P < 0,05$) nas concentrações de retinol no soro dos potros, como pode-se observar na tabela 6. Os níveis de retinol decresceram e permaneceram inferiores àqueles preconizados como normais por Lewis (2000) que considerou como deficientes os valores séricos abaixo de 10 $\mu\text{g/dl}$. Portanto, os animais do presente estudo apresentaram hipovitaminose A e provavelmente estavam mobilizando suas reservas hepáticas para manter os níveis de retinol sérico, concordando com Ball (1998) o qual afirmou que as concentrações séricas diminuem somente quando as reservas de vitamina A no fígado estão próximas da depleção.

Tabelas 6 - Medianas (mínimas e máximas) das concentrações de retinol sérico em potros Mangalarga Marchador durante o período de junho a outubro

Tempo (dias)	Retinol (µg/dl)	Retinol (UI vit.A)
1	2,87 (2,24 - 11,4) a	9,57 (7,47 – 38,00) a
45	3,08 (2,06 - 4,92) a	10,27 (6,87 – 16,40) a
90	1,99 (1,34 - 6,15) b	6,63 (4,47 – 20,50) b
135	1,97 (1,46 - 7,15) b	6,57 (4,87 – 23,83) b

Médianas seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Friedman (P<0,05)
UI – Unidade Internacional

Resultados contrários a presente pesquisa foram encontrados por Garcia et al. (2006) que não verificaram diferença (P>0,05) nas concentrações séricas de retinol em éguas gestantes mantidas a pasto durante o período seco nas regiões do Vale do Rio Doce e Sul de Minas Gerais. Contudo, os animais utilizados por Garcia et al. (2006) não apresentaram concentrações deficientes, o que possivelmente pode ser explicado pela diferença pluviométrica entre as regiões.

O fígado esgota sua reserva hepática após período de um a três meses de deficiência de vitamina A (Torres e Jardim, 1987) ou de seus precursores na dieta, o que fundamenta a hipótese de que os animais do presente trabalho provavelmente estavam mobilizando seus estoques hepáticos antes do início do período experimental, o que pode ter ocorrido pelo fato de que, cerca de trinta dias antes do início do experimento não houve precipitação pluviométrica na propriedade o que limitou a disponibilidade do betacaroteno da pastagem.

Outro fator relevante nos resultados obtidos se refere à categoria utilizada nesse experimento, pois animais jovens possuem pouca reserva hepática, o que os tornam mais susceptíveis a deficiência de vitamina A, quando comparados a animais adultos, isso porque o fígado, segundo Taipina (2001), atinge seu pico de armazenamento de vitamina A somente na idade adulta.

Os animais do presente experimento, por serem muito jovens, provavelmente possuíam reserva hepática reduzida e foram mais susceptíveis ao período de escassez de betacaroteno na forragem. Essa afirmação se consolidou no estudo de Mäenpää et al. (1988) os quais analisaram as concentrações séricas de éguas gestantes e potros na Finlândia durante um ano e verificaram que no verão, quando os animais eram mantidos a pasto, a concentração de retinol duplicava quando comparados àqueles mantidos estabulados durante o inverno e alimentados com feno, aveia e concentrado vitamínico-mineral sem adição de vitamina A. Os autores encontraram concentração de retinol abaixo de 10 µg/dl em 10% das éguas e 15% dos potros, e menores que 15 µg/dl em 50% das éguas e 90% dos potros.

Na tabela 7 estão demonstrados os níveis sorológicos de zinco, que não apresentaram diferença (P>0,05) durante o período experimental. Contudo, os valores séricos de zinco foram deficientes segundo Santarém (2004) citado por Silva et al. (2007), que consideraram como níveis normais os valores no intervalo de 172,75 a 270,69 µg/dl e Wichert et al. (2002) que preconizaram níveis entre 60 e 120 µg/dl. Ainda que o sal mineral tenha sido fornecido *ad libitum*, a deficiência de zinco foi verificada no soro dos animais. Pode-se inferir que o sal apresentava baixa palatabilidade, o que pode ter limitado o consumo desse suplemento pelos animais.

Tabela 7 - Concentrações séricas de Zinco (Zn), Ferro (Fe), Cobre (Cu), Cálcio (Ca), Fósforo (P) e Magnésio (Mg) de potros Mangalarga Marchador durante o período de junho a outubro

Tempo (dias)	Concentrações					
	Zn (µg/dl)	Fe (µg/ dl)	Cu (µg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Mg (mg/dl)
1	39,56 a	94,02 a	97,76 a	10,64 a	10,34 a	2,86 a
35	38,21 a	85,18 a	79,54 b	10,41 a	9,53 a	2,77 a
90	34,10 a	63,24 a	79,56 b	10,37 a	9,51 a	2,18 b
135	35,30 a	66,83 a	77,56 b	9,90 a	10,53 a	2,21 b
CV	20,73	26,63	10,18	6,36	9,58	12,32

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste SNK (P<0,05)

Portanto, os animais desse experimento, além de estarem sob condição de hipovitaminose A, também estavam deficientes de zinco, sendo esse mineral importante regulador do metabolismo da vitamina A no organismo.

Rahman et al. (2002) ao avaliarem diferentes proporções de suplementação de vitamina A e zinco em humanos, concluíram que existe efeito sinérgico entre o zinco e a vitamina A nos níveis de retinol do organismo. Os autores ressaltaram que a distribuição do retinol para os tecidos no organismo é dependente do zinco porque a proteína de ligação do retinol contém esse mineral. O zinco também participa na síntese da proteína de ligação do retinol citosólica, que é essencial para o transporte intracelular do retinol dentro dos hepatócitos. Portanto, o zinco é responsável pelo transporte intra e intercelular da vitamina A.

As concentrações de ferro não apresentaram diferença ($P>0,05$), porém apresentou tendência ao declínio (tabela 7) o que implicou em níveis deficientes desse mineral no final do experimento, visto que o intervalo de referência das concentrações de ferro para equinos está compreendido entre 73-140 mcg/dl. Porém, vale ressaltar que problemas relacionados à deficiência de ferro não apresenta ocorrência comum em cavalos.

Os níveis séricos de cobre diminuíram ($P<0,05$) ao longo do tempo, sendo a maior concentração observada no início do experimento (tabela 7). Contudo, mesmo com esse declínio, os animais não atingiram concentrações consideradas deficientes por autores como Lewis (2000) e Wichert et al. (2002) que preconizaram como normais concentrações encontradas no intervalo de 56,8 a 170,2 µg/dl e 50 a 150 µg/dl, respectivamente.

Não houve diferença ($P>0,05$) nas concentrações séricas de cálcio como pode ser observado na tabela 7. Contudo, os valores apresentados são inferiores ao intervalo de 10,8 a 13,5 mg/dl citado como normal por Garcia-Lopez et al. (2001). Segundo o NUTRIENT... (2007), concentrações séricas de cálcio inferiores àquelas preconizadas normais predispõem os animais a problemas esqueléticos e podem induzir a osteopenia (diminuição da densidade mineral dos ossos) nos animais em desenvolvimento. Resultados semelhantes a essa pesquisa foram citados por Mundim et al. (2004) ao estudarem os parâmetros bioquímicos em cavalos mestiços de trabalho em Uberlândia-MG. Os pesquisadores encontraram concentrações de cálcio de $10,01 \pm 0,83$ mg/dl.

O fósforo não apresentou diferença ($P>0,05$), contudo os valores apresentados na tabela 7, estão acima daqueles encontrados por Bogin et al. (1989) e Mundin et al. (2004) de 3,2 a 5,2 mg/dl e $4,21 \pm 1,2$ mg/dl para cavalos do Jóquei Clube de São Paulo e de trabalho, respectivamente. Bogin et al. (1989) também consideraram normais valores de fósforo encontrados no intervalo entre 2,3 e 5,4 mg/dl. Os altos níveis de fósforo detectados na presente pesquisa podem ser explicados pela categoria em estudo, pois segundo o NUTRIENT... (2007) ao nascimento os animais possuem altas concentrações de fósforo que decrescem ao longo dos meses até atingirem os valores preconizados como normais na idade adulta.

Foi verificada diferença ($P<0,05$) nos níveis de magnésio (tabela 7) que mesmo apresentando declínio aos 90 dias do período experimental, ainda permaneceram acima do intervalo estabelecido como normal pelo NUTRIENT... (2007), que preconizou como normais os valores entre 1,6 e 2,0 mg/dl. Contudo, resultados semelhantes a presente pesquisa foram citadas por Mundin et al. (2004) que obtiveram concentrações séricas de magnésio de $2,4 \pm 0,49$ mg/dl em equinos de trabalho.

3.2. Avaliação do betacaroteno na pastagem

Houve diferença ($P<0,05$) na concentração de betacaroteno na pastagem ao longo do tempo avaliado (tabela 8).

Tabela 8 – Concentrações de betacaroteno no *Panicum maximum* cv. Tanzânia durante o período de junho a outubro

Tempo (dias)	Betacaroteno (mg/kg MS)
1	38,53 a
45	12,75 c
90	22,17 b
135	0,09 d
CV (%)	30,88

Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste SNK (P<0,05)

Nesse estudo, em função da escassez de chuvas, a qualidade nutricional da forrageira *Panicum maximum* cv. Tanzânia declinou, inclusive a concentração de betacaroteno (tabela 8), o que limitou a disponibilidade desse nutriente para os animais.

Após o início do período experimental, quando houve maior ocorrência de chuvas, verificada aos 90 dias (figuras 1 e 2), rapidamente as plantas responderam com aumento no teor da provitamina A (tabela 8), ainda que não tenha provocado respostas nos níveis séricos de retinol dos animais (tabela 6). Essa ocorrência pode ser explicada pelo baixo índice pluviométrico que não permitiu a brotação de forma homogênea na área de pastejo, o que não disponibilizou quantidades suficientes desse nutriente para os animais. Outro fator relevante consiste na baixa eficiência de conversão dos equinos em transformar apenas 33% do betacaroteno ingerido em retinol (Bondi e Sklan, 1984) o que certamente limitou a utilização desse nutriente pelos animais.

Aos 135 dias do período experimental foi verificada a menor concentração de betacaroteno na pastagem e ainda que tenha ocorrido precipitação de 16 mm nesse período, essa não foi suficiente para provocar número de brotações suficientes para que os animais pudessem se alimentar. Vale ressaltar que nessa etapa experimental, a área de pastejo estava constituída quase que completamente por forragem de baixo valor nutricional (tabela 1) e reduzida concentração de betacaroteno (tabela 8). Essa constatação também foi relatada por Meyer (1995) o qual afirmou que em pastos com vegetação velha (lignificada e parcialmente morta) o teor de caroteno se reduz drasticamente.

Contudo, Garcia et al. (2006) não encontraram declínio no teor de betacaroteno em pastagens na região Sul de Minas Gerais; os autores justificaram que as gramíneas utilizadas na pastagem (*Melinis minutiflora*, *Paspalum notatum*, *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria radicans*) estavam adaptadas as condições de solo e climáticas da região. É possível que a gramínea utilizada no presente experimento (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) apresente maior necessidade de água e solo fértil para aumentar a concentração do betacaroteno ou que o índice pluviométrico da região de Montes Claros seja inferior a região estudada por Garcia et al. (2006).

Resultados semelhantes a nossa pesquisa foram encontrados por Atkeson et al. (1937) ao avaliarem durante um ano o conteúdo de betacaroteno de diversas espécies de forrageiras no estado do Kansas - EUA. Os autores concluíram que espécies como *Buffalo grass* e *Big blue stem* continuaram secas e destituídas de betacaroteno mesmo com as primeiras precipitações pluviométricas da estação chuvosa; portanto os autores concluíram que houveram diferenças na capacidade de rebrota e recuperação do betacaroteno entre as espécies.

Durante todo o período experimental da presente pesquisa, o *Panicum maximum* cv. Tanzânia apresentou concentrações de betacaroteno consideradas deficientes (tabela 8) por Bondi e Sklan (1984) que consideraram valores normais aqueles compreendidos entre 200 - 800 mg/kg de matéria seca. Em acréscimo, os autores ressaltaram que os níveis de betacaroteno na forragem são influenciados pelo estágio de crescimento e idade da planta. Essa afirmação está de acordo com os dados encontrados na presente pesquisa, visto que a gramínea já apresentava idade avançada.

A ingestão insuficiente de betacaroteno associada a baixa qualidade nutricional da forrageira (tabela 1) durante o período experimental, resultou em perda de peso dos animais que diminuíram de 224,42 ± 46,29 para 197,14±35,65 kg de peso vivo. Esses dados corroboram com Blakley e Bell (1994) quando afirmaram que a deficiência de vitamina A pode provocar diminuição de peso. No entanto, no presente trabalho apesar da deficiência de vitamina A, os animais estavam pastando forragem de baixo valor nutricional (tabela 1), o que certamente foi o principal fator que determinou a redução de peso dos animais.

3.3. Associação entre retinol, betacaroteno e minerais

A análise de multivariada englobou os resultados das concentrações séricas dos sete potros nas diferentes situações de disponibilidade de pasto, que retrataram os diferentes níveis de betacaroteno (tabela 8) na forragem devido a degradação do mesmo com a escassez de chuvas durante o período avaliado (junho a outubro). Os parâmetros sanguíneos avaliados foram Zn, Fe, Cu, Ca, P, Mg e retinol. O elemento cálcio apresentou baixa variação (CV = 7,2%), tendo por esse motivo, sido retirado da análise. A análise multivariada dos componentes principais justificou, com as demais variáveis consideradas, 71% da inércia total do sistema, permitindo as seguintes conclusões (figura 8):

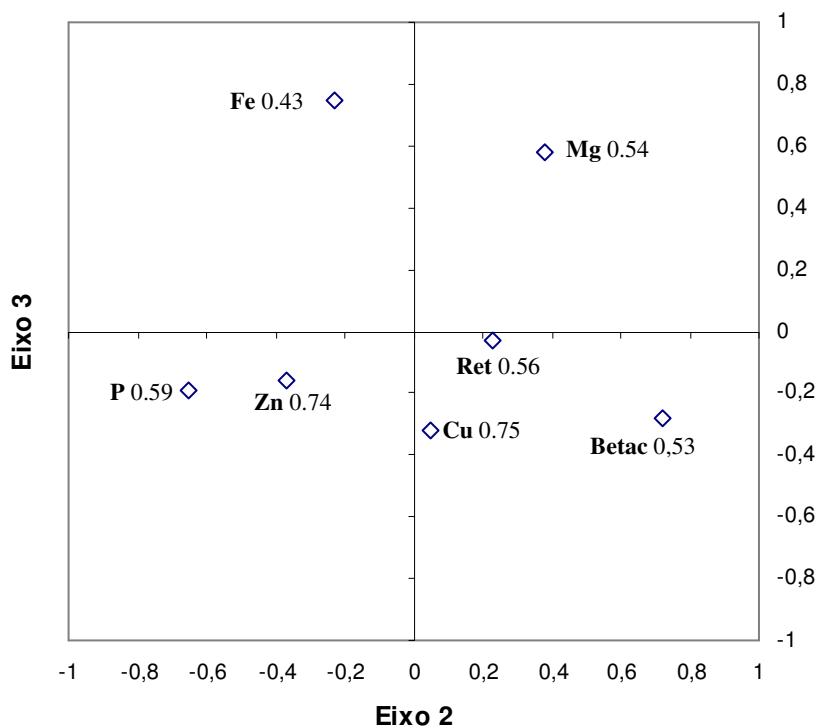


Figura 8 - Representação gráfica tridimensional das variáveis estudadas (Zinco-Zn; Ferro-Fe; Cobre-Cu; Fósforo-P; Magnésio-Mg; Retinol-Ret e Betacaroteno no pasto-Betac;), segundo os eixos 2 e 3, com inércia de 71%. A coordenada de cada variável no eixo 1 está registrada abaixo de sua localização

- O elemento sanguíneo (dos estudados), o mais associado com o retinol foi o cobre, contrariamente aquele apontado pela literatura (Zn).
- O empobrecimento do pasto, em termos de diminuição do betacaroteno provoca uma diminuição do cobre sanguíneo, e conseqüentemente (e mais flagrante) dos níveis de retinol sanguíneo.
- Os níveis de ferro sanguíneo variam inversamente com os níveis de betacaroteno no pasto, ou seja, quanto maiores os níveis de betacaroteno no pasto, menores são os níveis de ferro no sangue.
- Os níveis de fósforo sanguíneo parecem não sofrer muita influência da qualidade da pastagem, mas acompanham as variações de zinco no sangue, ou seja, altos níveis de fósforo estão associados com altos níveis de zinco.

Para Castenmiller et al. (1998) os níveis de zinco no organismo afetam a síntese de proteína de ligação do retinol e a conversão do betacaroteno à retinol. A correlação entre esses nutrientes foram apresentados por Ahn et al. (1995) citado por Rahman et al. (2002) ao estudarem ratos fêmeas adultas, nas quais a deficiência induzida de zinco diminuiu os níveis de retinol sanguíneo.

Contudo, na presente pesquisa, o mineral apontado como principal componente correlacionado positivamente com o retinol foi o cobre. Resultados semelhantes foram obtidos por Root et al. (1999) que encontraram correlação positiva entre as concentrações séricas de retinol e cobre em mulheres de regiões da China, nas quais a principal fonte de vitamina A foram provenientes de betacaroteno dos vegetais da dieta.

Simpson et al. (2004) listaram as proteínas hepáticas que sofrem influência do cobre em ovelhas submetidas a dietas com diferentes concentrações de cobre. Os autores verificaram aumento da expressão da enzima aldeído desidrogenase (cataliza a reação da oxidação do retinal a ácido retinóico) e proteína de ligação do retinol que teve sua atividade aumentada de 1,5 a 2 vezes com a elevação dos níveis de cobre na dieta. Os autores enfatizaram que a aldeído desidrogenase se liga ao retinal livre e a proteína de ligação de retinol ligada ao retinal.

Considerando que os animais da presente pesquisa estavam mobilizando o retinol hepático para manter a homeostase e que para exercer suas funções metabólicas o retinol estocado necessita ser oxidado a retinal e deste ao ácido retinóico, sendo esse passo bioquímico mediado pela influência do cobre, explica-se a associação encontrada nesse estudo, contrariando a teoria de que o zinco é o mineral mais importante no metabolismo da vitamina A. É verdade que esse mineral desempenha papel fundamental na rota metabólica dessa vitamina, principalmente no seu transporte na corrente sanguínea. Contudo para que a vitamina A desempenhe seu papel nos tecidos epiteliais e na transcrição celular existe a necessidade da etapa bioquímica influenciada pelo cobre.

4. CONCLUSÕES

Considerando os resultados do presente estudo pode-se concluir que na região de Montes Claros, no norte de Minas Gerais, é necessária a suplementação com vitamina A em potros criados a pasto, após um período de aproximadamente 30 dias de estiagem das chuvas.

Dentre todos os minerais estudados o cobre foi aquele que apresentou forte associação com os níveis de retinol.

Deve-se avaliar periodicamente o consumo da mistura mineral pelos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J.; KOO, S.I. Effects of zinc and essential fatty acid deficiencies on the lymphatic absorption of vitamin A and secretion of phospholipids. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v.6, p.595-603, 1995.

ATKESON, F.W.; PETERSON, W.J.; ALDOUS, A.E. Observations on the carotene content of some typical pasture plants. *Journal of Dairy Science*, v.20, p.557-562, 1937.

BALL, G. *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. London: Chapman & Hall, 1998, 563p.

BLAKLEY, B.R.; BELL, R.J. The vitamin A and vitamin E status of horses raised in Alberta and Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*, p.297-300, 1994.

BOGIN, E.; OTTO, F.; IBÁÑEZ, A. *Patología Clínica Veterinária*. Asunción, Paraguai. Instituto Interamericano de cooperação para a agricultura, 1989, v.2, 192 p.

BONDI, A.; SKLAN, D. Vitamin A and Carotene in Animal Nutrition. *Progress in Food & Nutrition Science*, v.8, p.165-191, 1984.

BUCKER, R.B.; SUTTIE, J.W.; McCORMICK, D.B.; MACHLIN, L.J. *Handbook of Vitamins*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. 616p.

CAROTENES in Fresh Plant Materials and Silage. AOAC, Official methods of analysis of the AOAC International. 16ed. Washington: AOAC. 1995. Chapter 45, p.4.

CASTENMILLER, J.J.M.; WEST, C.E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18. p.19-38, 1998.

GARCIA, T.R.; REZENDE, A.S.C.; SAMPAIO, I.B.M.; LANA, A.M.Q; MOURA, R.S. Concentrações séricas de retinol em éguas gestantes em haras do Vale do Rio Doce e Sul de Minas Gerais. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.6, p.1174-1180, 2006.

GARCIA-LOPEZ, J.M.; PROVOST, P.J.; RUSH, J.E.; ZICKER, S.C.; BURMASTER, H.; FREEMAN, L.M. Prevalence and prognostic importance of hypomagnesemia and hypocalcemia in horses that have colic surgery. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, n.1, p.7-12, 2001.

GARDNER, A.L. *Técnicas de pesquisa em pastagens e aplicabilidade de resultados em sistemas de produção*. Brasília: IICA/Embrapa. 1986. 197p.

GRAPHPAD InStat version 3.06 for Windows 95, GraphPad Software. San Diego. Disponível em www.graphpad.com. Acessado em 15 de janeiro de 2010.

LEWIS, L.D. *Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000, 720p.

MÄENPÄÄ, P.H.; KOSKINEN, T.; KOSKINEN, E. Serum profiles of vitamins A, E and D in mares and foals during different seasons. *Journal of Animal Science*, v.66, p.1418-1423, 1988.

MEYER, H. *Alimentação de cavalos*. Livraria Varela, São Paulo, 1995, 303p.

MONTES Claros – Dados Gerais. Disponível em: <http://www.brasilchannel.com.br> > Acessado em 10 de janeiro de 2010.

MUNDIM, A.V.; TEIXEIRA, A.A.; GALO, J.A.; CARVALHO, F.S.R. *Bioscience Journal*, v.20, n.1, p.135-142, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient Requirements of Horses*. 6 ed. Washington: National Academy Press, 2007. 341p.

PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. *Methods in clinical chemistry*. Washington: C. V. Mosby. 1987. p.587-590.

RAHMAN, M.M.; WAHED, M.A.; FUCHS, G J.; BAQUI, A.H.; ALVAREZ, J.O. Synergistic effect of zinc and vitamin A on the biochemical indexes of vitamin A nutrition in children. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.75, p.92-98, 2002.

ROCHA, O.G.F.; MOURA, R.S.; COSTA, M.L.L.; REZENDE, A.S.C.; MELO, M.M. Metodologia analítica para determinação de cobre, zinco e ferro em soro equino por espectrometria de emissão por plasma indutivamente acoplado. *Revista Brasileira de Toxicologia (suplemento)*, v.22, 2009.

ROOT, M.M.; HU, J.; STEPHERNSON, L.S.; PARKER, R.S.; CAMPBELL, C. Determinants of Plasma Retinol Concentrations of Middle-Aged Women in Rural China. *Nutrition*, v.15, p.101-107, 1999.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2006.

SANTARÉM, C.L. Valores séricos de macro e microminerais de equinos da raça puro sangue inglês (PSI), do nascimento até aos seis meses de idade. 2004. 116f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Botucatu.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002. 235p.

SILVA, M.A.M.L.; FILHO, R.M.P.; FILHO, A.C.R.; MACIEL, C.C.; DORETTO, J.S.; SILVA, H.L. Determinação das concentrações séricas de cobre e zinco séricos de equinos da região de Espírito Santo o Pinhal. *Boletim de Medicina Veterinária*, v.3, n. 3, p.24- 34, 2007.

SIMPSON, D.M; BEYNON, R.J.; ROBERTSON, D.H.L.; LOUGHRAN, M.J.; HAYWOOD, S. Copper-associated liver disease: A proteomics study of copper challenge in a sheep model. *Proteomics*, v.4, p. 524-536, 2004.

TAIPINA, M.S. Efeito da radiação sobre a vitamina A e o betacaroteno de fígado bovino e suíno, 2001, p.56 (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energética e Nuclear – Universidade de São Paulo, São Paulo.

TORRES, D.P.A.; JARDIM, R.W. *Criação do cavalo e outros equinos*. São Paulo: Nobel, 1987. 654p.

WICHERT, B.; FRANK, T.; KIENZLE, E. Zinc, copper and selenium intake and status of horses in Bavaria. *Journal of Nutrition*, v.132, p.1776 -1777, 2002.

CAPÍTULO III

COMPOSIÇÃO DE FENOS DE ESTILOSANTES DURANTE O ARMAZENAMENTO

RESUMO

Neste experimento foi avaliada a influência do período de estocagem na concentração de betacaroteno e composição nutricional de fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande durante 225 dias de armazenamento. Os teores de betacaroteno não diferiram ($P>0,05$) entre os fenos e durante o armazenamento. No comparativo entre as duas variedades, o feno de Mineirão apresentou matéria seca (MS), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), energia bruta (EB), fibra em detergente neutro (FDN) e lignina (LIG) superiores ($P<0,05$) ao Estilosantes Campo Grande. Durante o armazenamento, ambos os fenos não apresentaram diferenças ($P>0,05$) para os teores de MM, P, EB, FDN, FDA, LIG e hemiceluloses. Quando armazenados adequadamente, os fenos de estilosantes preservam o betacaroteno por um período de 225 dias. Considerando os parâmetros avaliados, as variedades de estilosantes, principalmente a Campo Grande é uma leguminosa com potencial para ser utilizada na alimentação dos equinos.

Palavras-chave: carotenóides, composição química, conservação, cultivares

NUTRITIONAL COMPOSITION OF ESTILOSANTES HAYS DURING STORAGE

ABSTRACT

This research was evaluated the influence of storage period in beta-carotene concentration and nutritional composition in *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande during 225 days of storage. There was no difference ($P>0,05$) in beta-carotene concentrations between hays and during storage. In the comparison between hays, *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão showed dry matter (DM), acid detergent insoluble nitrogen (ADIN), gross energy (GE), neutral detergent fiber (NDF) and lignin higher ($P<0,05$) than Estilosantes Campo Grande hay. There was no difference ($P>0,05$) for mineral content, calcium (Ca), phosphorus (P), crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF) and hemicellulose. During the period of storage both hays showed no differences ($P>0,05$) for mineral content, P, GE, NDF, ADF, hemicelluloses and lignin. The nutritional responses findings indicated that Estilosantes Campo Grande is a legume with potential to be used in feeding horses.

Keywords: carotenoid, chemical composition, conservation, varieties

1. INTRODUÇÃO

O sistema brasileiro de criação de equinos está fundamentado na criação extensiva dos animais, com suplementação de concentrado para as categorias mais exigentes no próprio piquete e armazenamento de volumosos para utilização no período mais seco do ano (Carvalho e Haddad, 1987).

A fenação consiste num dos melhores processos de conservação de forragens, pois segundo Reis et al. (2001) desde que adequadamente armazenado, o feno conserva seu valor nutricional com pequenas alterações ao longo do tempo e conseguem atender os requisitos nutricionais de diferentes espécies e categorias animais. Os autores acrescentaram que fenos podem ser produzidos a partir de um grande número de espécies forrageiras e sua produção ocorre em grande ou pequena escala, podendo ser colhido, armazenado e fornecido aos animais manualmente ou em processo inteiramente mecanizado.

O feno de alfafa (*Medicago sativa*) é tradicionalmente utilizado na alimentação dos equinos, contudo, devido o seu alto custo e limitada produção na maior parte do território nacional, existe a necessidade de buscar fontes alternativas de leguminosas que atendam as necessidades nutricionais desses animais a custos reduzidos (Costa et al., 2009).

Ladeira (2001) apontou a possibilidade da utilização de leguminosas tropicais, dentre elas, as espécies do gênero *Stylosanthes* como alternativa ao processo de fenação. Posteriormente, Jerba et al. (2006) considerou o gênero *Stylosanthes*, o mais importante entre as leguminosas forrageiras das regiões tropical e subtropical do mundo.

Resende et al. (2008) afirmaram que as forrageiras do gênero *Stylosanthes* destacam-se pela sua alta adaptação aos solos fracos e ácidos dos Cerrados, alta capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio, tolerância a seca e elevada produtividade.

Em 1993, a Embrapa Gado de Corte após seleção baseada na avaliação de ecótipos e identificação dos acessos mais adaptados e com alta resistência a antracnose (causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*) lançou a cultivar *Stylosanthes guianensis* var. *Vulgaris* denominada Mineirão. Em 2000, a mesma empresa lançou a cultivar Campo Grande, que é uma mistura física de sementes com 80% (em peso) de linhagens de *S. capitata* e 20% de linhagens de *S. macrocephala* (Grof et al., 1997; Grof et al., 2001).

Essas duas cultivares tem-se destacado em programas nutricionais de ruminantes (Andrade et al., 2000; Almeida et al., 2001; Walle et al., 2001). Entretanto poucos trabalhos avaliaram a qualidade nutricional dos estilosantes para a alimentação dos equinos (Silva et al., 2009).

Diante do promissor destaque da forrageira *Stylosanthes* e da necessidade de encontrar leguminosas adaptadas as condições tropicais para utilização na alimentação de equinos durante o período seco, objetivou-se nesse trabalho avaliar a composição nutricional de duas variedades dessa leguminosa (*Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*S. capitata* e *S. macrocephala*)) durante 225 dias de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido no Haras Catuni, Fazenda Santa Helena, município de Montes Claros - Minas Gerais, durante o período de abril a novembro de 2008.

As leguminosas *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) foram plantadas em uma área de 1,5 hectares no mês de dezembro de 2007 e colhidas aos 127 de idade. Foram adotados os processos de fenação propostos por Carvalho e Haddad (1987) e Tosi (1989), no qual as forrageiras foram cortadas 5 cm acima do nível do solo. Em seguida, foram trituradas ainda verdes em máquina, a fim de minimizar as perdas das folhas e então foram desidratadas ao sol até alcançarem o “ponto de feno” que consistiu no momento em que as forrageiras atingiram aproximadamente 12 a 15% de umidade.

Os fenos produzidos foram acondicionados em sacos plásticos pretos de 200 litros que ficaram abertos na porção superior e foram perfurados em toda sua extensão para facilitar a aeração. Durante todo o período de armazenados foram mantidos sobre estrados de madeira em galpão de alvenaria com 16 m². Um termo-higrômetro foi mantido no local e nos dias de coleta foram registradas temperaturas máximas e mínimas e, umidade relativa do ar (Anexo).

Durante o período experimental o material estocado foi amostrado em três ou quatro pontos diferentes dos fenos de cada variedade da forrageira, em intervalos de 45 dias. A partir de cada amostra obtida, parte do material foi embalado em diversas camadas de plástico preto, envoltos em papel alumínio, identificados e congelados a -20°C para análise de betacaroteno; enquanto a outra fração da amostragem destinada as análises bromatológicas foi acondicionada em saco plástico transparente, identificadas e armazenadas a temperatura ambiente até o momento em que foram trituradas em moinho tipo Willey com peneira de crivos de 1mm.

As extrações de betacaroteno e as análises bromatológicas das leguminosas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária - UFMG, enquanto que a determinação das concentrações de betacaroteno foi realizada no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Ciências Exatas - UFMG.

2.2. Metodologia para extração e leitura do betacaroteno

A metodologia adotada para extração do betacaroteno nas amostras das variedades da leguminosa foi realizada de acordo com CAROTENES AND XANTHOPHYLLS... (1995).

As amostras dos fenos foram trituradas em moinho, pesada 1g e colocada em frasco de 50 ml. Pipetaram-se 15 ml da solução extratante constituída de 5 ml de hexano: 3,5 ml de acetona: 3 ml de álcool e 3,5 ml de tolueno. A solução foi agitada durante 1 minuto em vórtex. Em seguida foram adicionados 500 µl de água ultrapura e novamente agitada. Acrescentou-se 1 ml de KOH 40% na solução e deixou-a em descanso por 16 horas em ambiente escuro. Após esse período, foram adicionados 15 ml de hexano, agitados durante 1 minuto e completado o frasco para 50 ml com Na₂SO₄ 10%, agitados vigorosamente e deixados em repouso durante 1 hora no escuro. Em seguida, a solução foi transferida para tubos criogênicos âmbar e somente uma alíquota de 20 µl do extrato foi injetada no cromatógrafo.

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca *Shimadzu*, bomba LC - 20 AT, detector de ultravioleta UV - VIS modelo SPD - 20A. Empregou-se uma coluna analítica *ODS Hypersil*, 60 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno e granulometria 3 µm.

A fase móvel foi constituída de 100% metanol grau UV/HPLC em fluxo de 1 ml/min. A amostra foi injetada com injetor *Hamilton* e a detecção realizada em comprimento de onda 450nm. O software utilizado para aquisição e gerenciamento de dados foi o *LC Solution*.

As figuras 1, 2 e 3 representam as curvas de regressão utilizadas para adequação das concentrações de betacaroteno a partir de diferentes diluições do padrão externo *all- trans*-betacaroteno. O tempo de retenção para o betacaroteno foi 6 minutos e 7 segundos num tempo de corrida de 9 minutos.

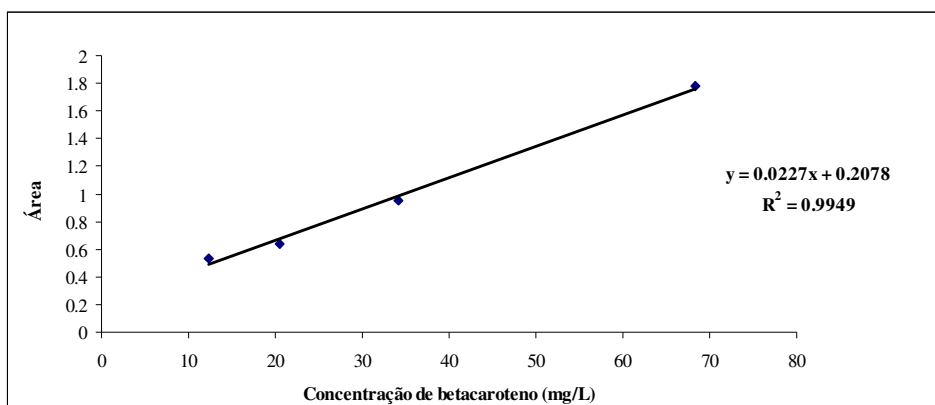


Figura 1 - Curva de regressão 1, obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans*-betacaroteno.

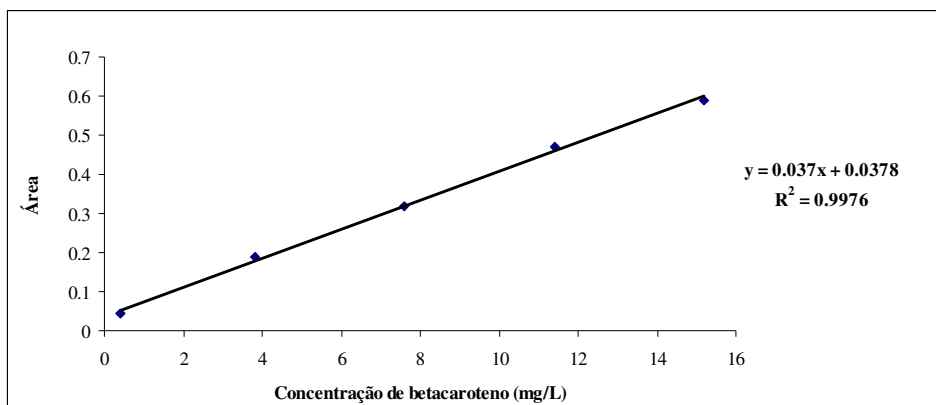


Figura 2 - Curva de regressão 2, obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans-* betacaroteno.

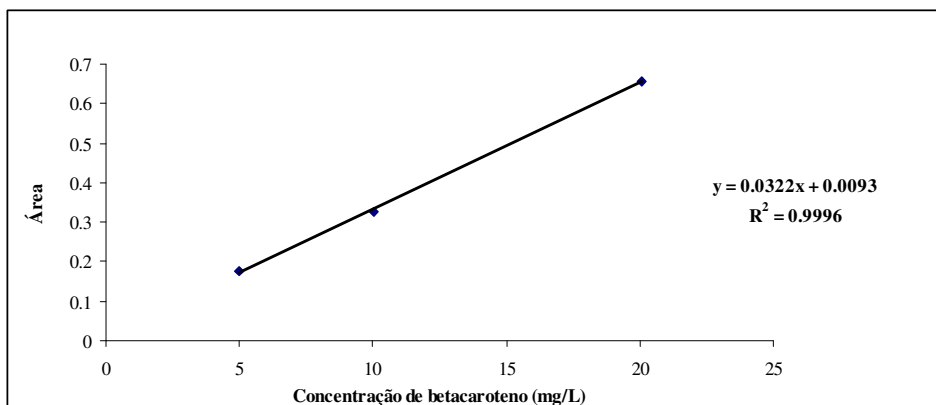


Figura 3 - Curva de regressão 3, obtida a partir das diluições do padrão externo *all- trans-* betacaroteno.

2.3. Análises bromatológicas

A avaliação da composição bromatológica dos fenos foi constituída pela determinação de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldhal e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) segundo OFFICIAL... (1995); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram obtidos de acordo com Van Soest et al., (1991). Matéria mineral (MM), Cálcio (Ca), Fósforo (P), lignina Klason (LIG), hemiceluloses (HEM) e energia bruta (EB) foram obtidas segundo metodologias preconizadas por Silva e Queiroz (2002).

2.4. Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi em parcelas subdivididas. As parcelas foram constituídas pelos fenos *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande; enquanto as subparcelas foram compostas pelos diferentes tempos de armazenamento (0, 45, 90, 135, 180 e 225 dias) com três repetições por tempo de avaliação (tabela 1).

Tabela 1 - Tabela de análise de variância para as variedades de fenos e tempo de armazenamento

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Total	5
Fenos	1
Erro a	4
Total	35
Tempos	5
Fenos x Tempos	5
Erro b	20

Os dados das concentrações de betacaroteno não apresentaram normalidade e homocedasticidade. Portanto, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade do erro obtido através do software GRAPHPAD... (2003).

Para o estudo das variáveis bromatológicas, foi utilizado teste t para comparação entre as duas variedades de fenos e o teste de Tukey para a avaliação dos fenos ao longo do tempo. Ambos os testes apresentaram 5% de probabilidade de erro e foram obtidos através do software SISVAR® segundo Ferreira... (2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No comparativo entre as variedades, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) para as concentrações de betacaroteno (tabela 2), o que pode ser explicado pelo fato de ambas cultivares pertencerem ao mesmo gênero (*Stylosanthes*). Park et al. (1983) verificaram diferenças de até 50% na capacidade de estocagem de betacaroteno de diferentes espécies forrageiras (*Bromus inermis*, *Phalaris arundinacea*, *Agropyron repens*).

O período de armazenamento não alterou ($P > 0,05$) as concentrações de betacaroteno dos fenos (tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Bruhn e Oliver (1978) para fenos de alfafa (*Medicago sativa* L.) produzidos com 89,2% de matéria seca e armazenados durante 126 dias. Esses autores encontraram declínio ($P < 0,01$) na concentração do betacaroteno de fenos produzidos com 91% de matéria seca e ressaltaram a importância dessa variável na conservação da provitamina A. Na presente pesquisa, as duas variedades estudadas apresentaram teores de matéria seca inferiores a 91% (tabela 3) o que contribuiu para a conservação do betacaroteno. Além do teor de matéria seca, uma provável explicação para não ter ocorrido diferenças nas concentrações do betacaroteno, ao longo do tempo, consistiu na utilização dos sacos pretos nos quais os fenos estavam acondicionados, o que limitou a oxidação da provitamina A, pois segundo Nozière et al. (2006) a degradação do betacaroteno ocorre principalmente pela exposição da forragem a luminosidade e radiação solar.

Tabela 2 - Medianas (mínimas e máximas) das concentrações de betacaroteno (mg/kg MS) dos fenos *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento

Fenos	Tempos de Armazenamento (dias)					
	1	45	90	135	180	225
Mineirão	1083,6	461,13	364,16	430,20	288,18	258,34
	(1040,1- 1093,4)	(318,19- 480,68)	(351,04- 481,52)	(332,73- 433,23)	(229,02- 288,67)	(202,52- 315,13)
Campo Grande	660,20	404,26	318,92	324,03	287,24	242,51
	(653,90- 672,00)	(167,47- 447,43)	(294,09- 352,16)	(286,19- 353,57)	(269,33- 302,03)	(234,78- 245,37)

Medianas iguais pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$)

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam a composição bromatológica dos fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande. Não houve interação ($P>0,05$) entre as variedades de fenos e os tempos de armazenamento para todas as variáveis bromatológicas avaliadas (MS, MM, Ca, P, PB, NIDA, EB, FDN, FDA, HEM e LIG). Portanto, ambos os fenos apresentaram comportamento semelhante durante o armazenamento.

Na tabela 3 pode-se observar que houve diferença ($P<0,05$) no comparativo quanto ao teor de MS entre as duas variedades de fenos. A variedade *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão apresentou teor de MS superior ao Estilosantes Campo Grande, que embora tenha apresentado valor inferior (89,75%), mostrou MS superior a 80%, o que representa menor perda de conteúdo celular e consequentemente menor perda de valor nutricional segundo o NUTRIENT... (2007).

Tabela 3 – Concentrações de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), cálcio (Ca) e fósforo (P) dos fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento (dias)

Composição	Armazenamento	Mineirão	Campo Grande	Média
MS (%)	0	89,07	88,52	88,79 b
	45	90,19	90,74	90,46 a
	90	90,27	89,88	90,08 a
	135	89,90	89,53	89,72 a
	180	90,01	89,83	89,92 a
	225	90,65	89,98	90,32 a
	Média	90,02 A	89,75 B	
	CV		0,45	
MM (%)	0	9,39	8,63	9,01 a
	45	9,32	8,62	8,97 a
	90	8,86	8,50	8,68 a
	135	8,77	8,08	8,43 a
	180	8,58	8,09	8,34 a
	225	8,79	8,00	8,40 a
	Média	8,95 A	8,32 A	
	CV		4,53	
Ca (%)	0	1,78	1,69	1,74 a
	45	1,50	1,53	1,52 b
	90	1,53	1,54	1,54 b
	135	1,54	1,55	1,54 b
	180	1,48	1,56	1,52 b
	225	1,51	1,57	1,54 b
	Média	1,56 A	1,57 ^a	
	CV		5,27	
P (%)	0	0,31	0,27	0,29 a
	45	0,27	0,27	0,27 a
	90	0,26	0,26	0,26 a
	135	0,26	0,25	0,26 a
	180	0,25	0,26	0,26 a
	225	0,28	0,25	0,27 a
	Média	0,27 A	0,26 ^a	
	CV		7,03	

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

O tempo de estocagem alterou ($P<0,05$) os teores de MS dos fenos (tabela 3), contudo esse comportamento já foi anteriormente descrito por Raymond et al. (1978) os quais afirmaram que fenos possuem característica higroscópica (absorvendo e perdendo água para o ambiente) como consequência da umidade relativa do ar que pode influenciar o teor de umidade da forragem

armazenada. Portanto, pode-se inferir que as diferenças no teor de matéria seca dos fenos dessa pesquisa ocorreram em resposta às condições climáticas do local onde foi realizada a estocagem durante o período experimental.

Os resultados encontrados na presente pesquisa são semelhantes aos descritos por Bruhn et al. (1978) que verificaram aumento significativo no teor de MS do feno de alfafa de diferentes cortes durante 196 dias de armazenamento. Enoh et al. (2005) avaliaram os fenos de *Brachiaria ruziziensis* e do pasto nativo da região de Adamawa - África durante 140 dias de armazenamento. Esses autores verificaram a elevação da MS de 88 para 88,9% aos 84 dias de armazenamento, que permaneceram constantes até o final do período experimental.

As duas variedades de fenos apresentaram teores de matéria mineral semelhantes ($P>0,05$) como pode-se observar na tabela 3. Entretanto, os valores encontrados nesse estudo foram inferiores ao citado por Vilela (2007) que encontrou 10% de MM para o feno de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão produzido com 60 dias de crescimento. A diferença encontrada entre a matéria mineral da presente pesquisa e o resultado apresentado por Vilela (2007) pode ser explicada pela diferença de idade das leguminosas utilizadas nas duas pesquisas, já que as variedades *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande nesse trabalho apresentavam 127 dias de crescimento. Essa hipótese corrobora com Underwood (1981) o qual afirmou que as concentrações de minerais das forrageiras decrescem com o avançar do estágio de crescimento em função do aumento da proporção da relação haste: folha.

O tempo de armazenamento não influenciou ($P>0,05$) os teores de MM dos fenos estudados, o que está de acordo com o NUTRIENT... (2007) o qual citou que durante o armazenamento, os fenos mantêm o conteúdo mineral estável.

Ainda na tabela 3, pode-se observar que as variedades dos fenos estudados não apresentaram diferença ($P>0,05$) para a concentração de cálcio. Contudo os valores desse mineral analisados no *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e no Estilosantes Campo Grande foram de 1,56 e 1,57% respectivamente; esses valores foram próximos daquele encontrado por Vilela (2007) de 1,55% de cálcio para o feno de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão. No entanto, quando os valores encontrados nessa pesquisa para as duas variedades de estilosantes foram comparados com àquele citado por Filho (2000) para o feno de alfafa (1,2% de cálcio) verificou-se uma superioridade na concentração desse mineral nas duas espécies estudadas, o que valoriza essas forrageiras, por esse mineral ser limitante na dieta de potros.

No entanto, ao longo do tempo os fenos apresentaram diferenças ($P<0,05$) no teor de cálcio, pois a maior concentração desse mineral foi constatada no início do período de armazenamento (tabela 3), mostrando que deve-se estar atento para a composição desse mineral na dieta de potros alimentados com fenos armazenados.

Na tabela 3 observa-se também que os níveis de fósforo não variaram ($P>0,05$) entre as duas variedades de fenos e durante todo o período de armazenamento. Os valores encontrados foram próximos daquele citado por Filho (2000) que encontrou 0,22% de fósforo para essa mesma leguminosa.

Na tabela 4, pode-se observar que os teores de PB foram semelhantes entre os fenos ($P>0,05$). Entretanto, esses valores foram inferiores aos citados por Vilela (2007) e Silva et al. (2009) para o *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão que encontraram respectivamente 16,7 e 16,2% de PB e foram superiores aos relatados por Ladeira et al. (2002) de 9,4% de PB para o feno de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão em estágio de maturidade avançado.

Tabela 4 – Concentrações de proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e energia bruta (EB) dos fenos de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento (dias)

Composição	Armazenamento	Mineirão	Campo Grande	Média
PB (%)	0	14,07	14,68	14,38 a
	45	12,36	12,85	12,61 b
	90	10,94	12,24	11,59 b
	135	11,92	12,07	12,00 b
	180	11,10	11,90	11,50 b
	225	11,68	11,93	11,81 b
	Média	12,01 A	12,61 A	
	CV	7,51		
NIDA (%)	0	4,63	4,44	4,54 a
	45	3,71	2,66	3,19 b
	90	3,31	2,79	3,05 b
	135	3,64	2,85	3,25 b
	180	3,18	1,98	2,58 b
	225	2,89	2,66	2,78 b
	Média	3,57 A	2,89 B	
	CV	11,96		
EB (Mcal/kg)	0	4,43	4,42	4,43 a
	45	4,38	4,31	4,35 a
	90	4,40	4,32	4,36 a
	135	4,41	4,36	4,38 a
	180	4,46	4,37	4,41 a
	225	4,42	4,33	4,38 a
	Média	4,42 A	4,36 B	
	CV	1,0		

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

No presente trabalho, a PB de 12,01 e 12,61% encontradas para *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande estão acima da quantidade mínima recomendada para equinos em manutenção, segundo recomendações do NUTRIENT... (2007). No entanto, estão abaixo das recomendações para potros, o que limita sua utilização como única fonte de proteína na dieta dessa categoria de equinos.

Provavelmente os menores valores de PB observados no presente experimento ocorreram em virtude da idade de corte das leguminosas realizada neste ensaio, pois segundo Van Soest (1994) com o avançar da idade ocorre diminuição do conteúdo celular e conseqüente redução do teor de PB das forragens.

Na presente pesquisa, os teores de PB foram superiores (P<0,05) no primeiro dia de armazenamento quando comparado aos demais períodos avaliados, como pode ser observado na tabela 4. Esses resultados corroboram com Rotz e Abrams (1988) e Nascimento et al. (2000) que observaram declínio da PB nos primeiros 30 dias de armazenamento.

O percentual de NIDA foi superior (P<0,05) no feno de *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão (tabela 4), que de acordo com Van Soest (1994) representa menor disponibilidade da proteína para o animal.

Resultados semelhantes foram observados por Coblenz et al. (2000) que verificaram elevados níveis do NIDA nos primeiros dias do armazenamento do feno de alfafa. Os autores apontaram esse período como o mais crítico na degradação da qualidade da forragem. Buckmaster (1989) explicou que a formação do NIDA está diretamente relacionada com a elevação da temperatura que ocorre em virtude da atividade dos microorganismos nos primeiros dias de armazenamento, o que favorece a ligação da proteína com a porção indigestível da fibra. Resultados contrários foram

observados por Turner et al. (2002) os quais verificaram teores de NIDA inalterados em fenos armazenados.

Houve diferença ($P < 0,05$) para a variável energia bruta entre os fenos. O *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão desse estudo apresentou valores superiores aos verificados no Estilosantes Campo Grande (tabela 4). O valor 4,36 Mcal/kg dessa última variedade foi semelhante a variedade *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão utilizada no experimento de Silva et al. (2009). Contudo o tempo de armazenamento não alterou essa variável ($P > 0,05$) em ambos os fenos estudados durante os 225 dias de armazenamento.

Na tabela 5, nota-se que houve diferença ($P < 0,05$) entre os fenos para a variável FDN. A variedade *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão apresentou valor superior quando comparado ao Estilosantes Campo Grande. Contudo, os valores observados nessa pesquisa foram superiores aos observados por Silva et al. (2009) que encontraram 47,5% de FDN para o *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e foram valores numericamente muito próximos aos resultados encontrados por Ladeira et al. (2002) que encontraram 63,65% de FDN no feno de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão com estágio de maturidade avançado.

Tabela 5 – Concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemiceluloses (HEM) e lignina (LIG) dos fenos de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*) durante o armazenamento (dias)

Composição	Armazenamento	Mineirão	Campo Grande	Média
FDN (%)	0	59,57	57,64	58,61 a
	45	60,12	59,24	59,68 a
	90	62,22	62,30	62,26 a
	135	62,93	60,75	61,84 a
	180	64,76	61,56	63,16 a
	225	61,35	59,25	60,30 a
	Média	61,83 A	60,12 B	
	CV	4,35		
FDA (%)	0	40,28	38,58	39,43 a
	45	39,51	39,56	39,57 a
	90	42,45	42,36	42,41 a
	135	43,34	40,34	41,84 a
	180	44,59	42,00	43,30 a
	225	41,73	40,15	40,94 a
	Média	41,98 A	40,51 A	
	CV	5,43		
HEM (%)	0	19,68	21,11	20,39 a
	45	20,61	19,58	20,10 a
	90	19,77	19,94	19,86 a
	135	19,59	20,41	20,00 a
	180	20,17	19,56	19,87 a
	225	19,61	19,10	19,36 a
	Média	19,91 A	19,95 A	
	CV	6,36		
LIG (%)	0	26,12	23,89	25,01 a
	45	25,99	23,78	24,89 a
	90	25,18	23,03	24,11 a
	135	25,83	22,73	24,28 a
	180	25,06	22,82	23,94 a
	225	24,76	23,75	24,26 a
	Média	25,49 A	23,34 B	
	CV	3,72		

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Entre os fenos foram observadas semelhanças ($P>0,05$) para a variável FDA. Contudo, esses valores foram inferiores àquele encontrado por Ladeira et al. (2002) e superior ao citado por Silva et al. (2009) que determinaram, respectivamente, 50,09 e 33,33% dessa fração fibrosa na variedade *Stylosanthes guianenses* cv. Mineirão.

Ainda na tabela 5, verifica-se que não houve diferença ($P>0,05$) para os teores de hemiceluloses entre as duas variedades de fenos e durante o período de estocagem o que corrobora com Enoh et al. (2005) que também não encontraram diferenças nas concentrações de hemicelulose dos fenos de *Brachiaria ruziziensis* e de pasto nativo da região de Adamawa - África durante 140 dias de armazenamento.

O feno da variedade Estilosantes Campo Grande apresentou menor ($P<0,05$) valor para lignina em relação à variedade Mineirão, o que parece vantajoso, pois segundo Van Soest (1994) a íntima associação física entre lignina e polissacarídeos da parede celular são os principais fatores limitadores do acesso das enzimas microbianas a esse substrato, o que reduzirá a digestibilidade dos carboidratos estruturais diminuindo o valor nutricional da forrageira.

Os teores de FDN, FDA, HEM e LIG não variaram ($P>0,05$) ao longo do tempo, indicando que o processo de fenação foi conduzido adequadamente, o que corrobora com o NUTRIENT... (2007) mostrou que os componentes fibrosos permanecem inalterados durante o armazenamento dos fenos.

Contrariamente aos resultados encontrados nessa pesquisa, Buckmaster et al. (1993) encontraram aumento na concentração dos teores de FDN e FDA no feno de alfafa durante um período de armazenamento de 60 dias, o que também foi observado por Coblenz et al. (1996) que verificaram aumento na fração FDN no feno de alfafa durante os primeiros 22 dias do armazenamento. Turner et al. (2002) também encontraram aumento na concentração de FDN, FDA e LIG em fenos de *bermudagrass* com diferentes teores de umidade (21,9; 26,5 e 30,2%) aos 12 dias de estocagem.

4. CONCLUSÕES

O armazenamento dos fenos de estilosantes quando realizado corretamente mantém sua composição bromatológica e concentração de betacaroteno durante um período mínimo de 225 dias.

As respostas nutricionais encontradas sugeriram que as variedades de estilosantes, destacando-se a Campo Grande, apresentam potencial para serem utilizadas na alimentação equina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.G.A.; NASCIMENTO, JR., D.; EUCLIDES, V.P.B. Pastagens consorciadas de braquiárias com estilosantes, no Cerrado 1. Disponibilidade de forragem, composição botânica e valor nutritivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: SBZ, 2001, p. 62-63.

ANDRADE, R.P.; TAKAU, K. Uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PASTAGENS, 2000, Lavras. *Anais...* Lavras: NEFOR, 2000. p. 273-310.

BRUHN, J.C.; OLIVER, J.C. Effect of storage on tocopherol and carotene concentrations in alfalfa hay. *Journal of Dairy Science*, v.61. p.980- 982, 1978.

BUCKMASTER, D.R.; HEINRICH, A.J. Losses and quality changes during harvest and storage of preservative-treated alfalfa hay of varying moisture content. *Transactions Association of Agricultural Engineers*, v.36, n.2, p.349-353, 1993.

BUCKMASTER, D.R.; ROTZ, C.A.; MERTENS, D.R. A model of alfalfa hay storage. *Transactions Association of Agricultural Engineers*, v. 32, n. 1, p. 30-36, 1989.

CAROTENES and Xanthophylls in dried plant material and mixed feeds. AOAC, Official methods of analysis of the AOAC International. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. Chapter 45, p.5.

CARVALHO, R.T.L.; HADDAD, C.M. *Pastagens e alimentação de equinos*. Piracicaba: FEALQ, 1987. 85p.

COBLENTZ, W.K.; FRITZ, J.O.; BOLSEN, K.K., COCHRAN, R.C. Quality Changes in Alfalfa Hay During Storage in Bales. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.873-885, 1996.

COBLENTZ, W.K.; TURNER, J.E.; SCARBROUGH, D.A.; LESMEISTER, K.E.; JOHNSON, Z.B.; KELLONG, D.W.; COFFEY, K.P.; McBETH, L.J.; WEYERS, J.S. Storage Characteristics and nutritive value changes in bermudagrass hay as affected by moisture content and density of rectangular bales. *Crop Science*, v.40, p.1375-1383, 2000.

COSTA, M.L.; LANA, A.M.Q.; SILVA, V.P.; MOURA, R.S.; MOREIRA, D.C.S.; MOREIRA, G.R.; SILVA, N.A.M.; REZENDE, A.S.C. Composição nutricional de duas variedades de feno de estilosantes durante o armazenamento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 4. 2009. Belo Horizonte, *Anais...* Belo Horizonte: FEMVZ, 2009.1 CD-ROM.

ENOH, M.B.; KIJORA, C.; PETERS, K.J.; TANIA, V.N.; FONKEM, D.; MBANYA, J. Investigation on change of forage quality at harvesting, during hay making and storage of hay harvested at different growth stages in the Adamawa plateau of Cameroon. *Livestock Research for Rural Development*, v.17, 2005.

FERREIRA, D. F. *SISVAR*: Versão 5.0 (Build 71), 2007.

FILHO, S. C. V. *Nutrição, avaliação de alimentos e tabelas de composição de alimentos para bovinos* In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000.

GRAPHPAD InStat version 3.06 for Windows 95, GraphPad Software. San Diego. Disponível em www.graphpad.com. Acessado em 15 de janeiro de 2010.

GROF, B.; FERNANDES, C.D.; ALMEIDA, C.B.; SANTOS, A.V. Development of a multicross of *Stylozanthos spp*. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 18, 1997, Winnipeg, *Proc...* Winnipeg: Saskatoon, 1997. p.4-32.

GROF, B.; FERNANDES, C.D.; FERNANDES, A.T.F. A novel technique to produce polygenic resistance to anthracnose in *Stylozanthos capitata*. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001, São Pedro. *Proc...* Piracicaba: FEALQ, 2001, p.525.

JERBA, V.F.; FERNANDES, C.D.; POTT, A. Relação entre número de estegmata na epiderme foliar e intensidade da antracnose em *Stylozanthos spp*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.1, p.175 - 178, 2006.

LADEIRA, M.M. *Avaliação nutricional do feno de Stylozanthos guianensis*. 2001. 35 f. Doutorado (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

LADEIRA, M.M.; RODRIGUEZ, N.M.; BORGES, I. Balanço de nitrogênio, degradabilidade de aminoácidos e concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen de ovinos alimentados com feno de *Stylozanthos guianensis*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.1, n.6, p.2357-2363, 2002.

NASCIMENTO, J.M.; COSTA, C.; SILVEIRA, A.C.; ARRIGONI, M.B. Influência do método de fenação e tempo de armazenamento sobre a composição bromatológica e ocorrência de fungos no feno

de alfafa (*Medicago sativa*, L. cv. Flórida 77). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.3, p.669-677, 2000.

NOZIÈRE, P.; GRAULET, B.; LUCAS; MARTIN, B.; GROLIER, P.; DOREAU, M. Carotenóides for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, v.131, p.418-450, 2006.

NUTRIENT Requeriments of Horses. 6 ed., Washington: National Academy Press, 2007. 341p.

OFFICIAL methods of analysis of the AOAC International. 16ed. Arlington: AOAC. 1995. 1025p.

PARK, Y.W.; ANDERSON, M.J.; WALTERS, J.L.; MAHONEY, A.W. Effects of Processing Methods and Agronomic Variables on Carotene Contents in Forages and Predicting Carotene in Alfalfa Hay with Near-Infrared-Reflectance Spectroscopy *Journal of Dairy Science*, v.66, p.235-245, 1983.

RAYMOND, F.; SHEPPERSON, G.; WALTHAM, R. *Forage conservation and feeding*. 3.ed., Suffolk: Farming Press, 1978. 208p.

REIS, R.A.; MOREIRA, A.L.; PEDREIRA, M.S. Técnicas para produção e conservação de fenos de forrageiras de alta qualidade. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS. ANAIS DO SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá. *Anais...* Maringá:Universidade Estadual de Maringá, 2001. p.1-39.

RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; LIANA, J. *Melhoramento genético de leguminosas forrageiras*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 117-159.

ROTZ, C.A.; ABRAMS, S.M. Losses and quality changes during alfalfa hay harvest and storage. *Transactions Association of Agricultural Engineers*, v.31, n.2. p.350-354, 1988.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002. 235p.

SILVA, V.P.; ALMEIDA, F.Q.; MORGADO, E.S.; FRANÇA, A.B.; VENTURA, H.T.; RODRIGUES, L.M. Digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos determinada pela técnica dos sacos móveis em equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.1, p.82-89, 2009.

TOSI, H. Forragens conservadas na alimentação de eqüídeos. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQUIDOCULTURA, 5, 1989, Maringá. *Anais...* Maringá: FUEM, 1989, p.236-262.

TURNER, J. E.; COBLENTZ, W. K.; SCARBROUGH, D. A. et al. Changes in Nutritive Value of Bermudagrass Hay during Storage. *Agronomy Journal*, v. 94, p.109-117, 2002.

UNDERWOOD, E.J. *The mineral nutrition of livestock*. 3.ed. New York: CABI Publishing, 1999, 624 p.

VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed, Cornell University Press, 1994, 476p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VILELA, H. Série Leguminosas Tropicais – GÊNERO STYLOZANTHES (*Stylozanthes guianensis*) *Stilozanthes guianensis*. In: Portal Agronomia, 2007. Acessado em 17/01/2010.

WALLE, L. C. S.; SILVA, J. M.; SCHUNKE, R. M. Ganho de peso de bovinos em pastagens de Brachiaria decumbens pura e consorciada com Stylosanthes spp. cv. Campo Grande. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: SBZ, 2001 (CD ROM).

ANEXOS

Anexo 1 - Precipitações pluviométricas mensais do ano de 2008 na Fazenda Santa Helena, Montes Claros - MG

Mês	Precipitação Pluviométrica (mm)
Janeiro	181,5
Fevereiro	152
Março	317,5
Abril	89
Maio	0
Junho	0
Julho	0
Agosto	21
Setembro	16
Outubro	0
Novembro	287,6
Dezembro	388

Anexo 2 - Temperaturas (mínimas e máximas) em graus Celsius e umidade relativa do ar (UR%) registradas nos dias de coletas

Dias	7 horas			12 horas			18 horas		
	Tmáx.	Tmín.	UR(%)	Tmáx.	Tmín.	UR(%)	Tmáx.	Tmín.	UR(%)
1	24,5	21	74	29,5	25	69	26	22	62
45	17,5	14,5	71	24,5	19	59	26	20	50
90	20	14	48	26,5	17	33	25	18	33
135	15	13,5	79	23	19	50	26,5	17	37
180	25	23,5	42	36	23,5	21	33	23	39
225	24	22	83	29	24,5	64	27	24,5	77

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)