

## ESTUDO DOS PIGMENTOS CAROTENÓIDES DO FENO DE CUNHÃ (*Clitoria ternatea* L.) EM QUATRO PERÍODOS DE CORTE \*

Abelardo Ribeiro de Azevedo \*\*  
Juan Francisco Gálvez Morros \*\*\*  
Arnaud Azevêdo Alves \*\*\*\*  
Rafael Caballero García de Arévalo \*\*\*\*\*

### RESUMO

Realizou-se o estudo dos pigmentos carotenóides do feno de cunhã (*Clitoria ternatea* L.) em quatro períodos de corte – 42, 56, 70 e 84 dias, seguindo-se o método de Quacken Busch. A maior quantidade de pigmentos carotenóides totais foi observada no feno colhido aos 42 dias (587, 3 mg/Kg de MS), seguido pelo feno aos 70 dias (432,7 mg/Kg de MS), 84 dias (393,9 mg/Kg de MS) e 56 dias (368,9 mg/Kg de MS). O feno colhido aos 42 dias apresentou mais alto teor dos pigmentos Caroteno (136,2 mg/Kg de MS) e Luteína (306,5 mg/Kg de MS); tendo o mesmo ocorrido para os pigmentos Zeaxantina, Violaxantina e Neoxantina. Houve redução nas concentrações de carotenóides com o aumento nos períodos de corte.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: cunhã, igfeno, pigmentos carotenóides.

\* Parte de Tese apresentada à Universidade Politécnica de Madrid-España, pelo primeiro autor, para obtenção do título de Doctor Ingeniero Agrónomo, com bolsa da CAPES.

\*\* Prof. Adjunto do Departamento de Zootecnia/CCA/UFC.

\*\*\* Prof. Catedrático da Universidade Politécnica de Madrid-España.

\*\*\*\* Eng.<sup>o</sup> Agr.<sup>o</sup>, Aluno Especial do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da UFC.

\*\*\*\*\* Pesquisador do Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA) – Madrid-España.

### SUMMARY

#### STUDY OF CAROTENE PIGMENTS OF CUNHÃ HAY (*Clitoria ternatea* L.) IN FOUR HARVEST PERIODS

The carotene pigments of cunhã hay (*Clitoria ternatea* L.) was studied in four harvest periods, as follow: 42, 56, 70 and 84 days, according with the Quacken Busch's method. The higher quantity of total pigments was observed on hay collected at 42 days (587, 3 mg/Kg of MS), followed by hays of 70 days (432,7 mg/Kg of MS), 84 days (393, 9 mg/Kg of MS), and 56 days (368,9 mg/Kg of MS). Hay collected at 42 days had the highest levels of Carotene (136,2 mg/Kg of MS) and Luteine (306,5 mg/Kg of MS) pigments, also Zeaxantine, Violaxantine and Neoxantine pigments. Is was observed reduction on Carotene levels related with age of cunhã hay.

Key words: cunhã, hay, carotene pigments.

### INTRODUÇÃO

O estudo dos carotenóides dos alimentos utilizados em nutrição animal é de grande importância, devido à reper-

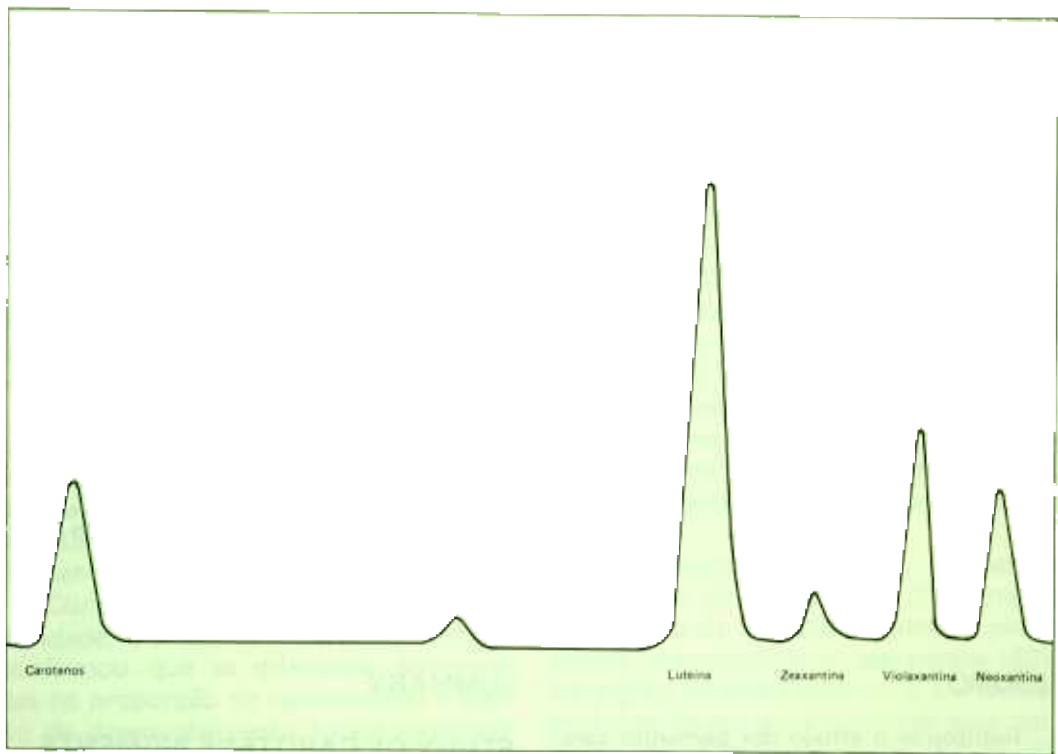


Figura 1 – Gráfico dos diferentes pigmentos dos carotenóides totais do ferro de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.) colhida aos 42 dias, separado por cromatografia em capa fina.

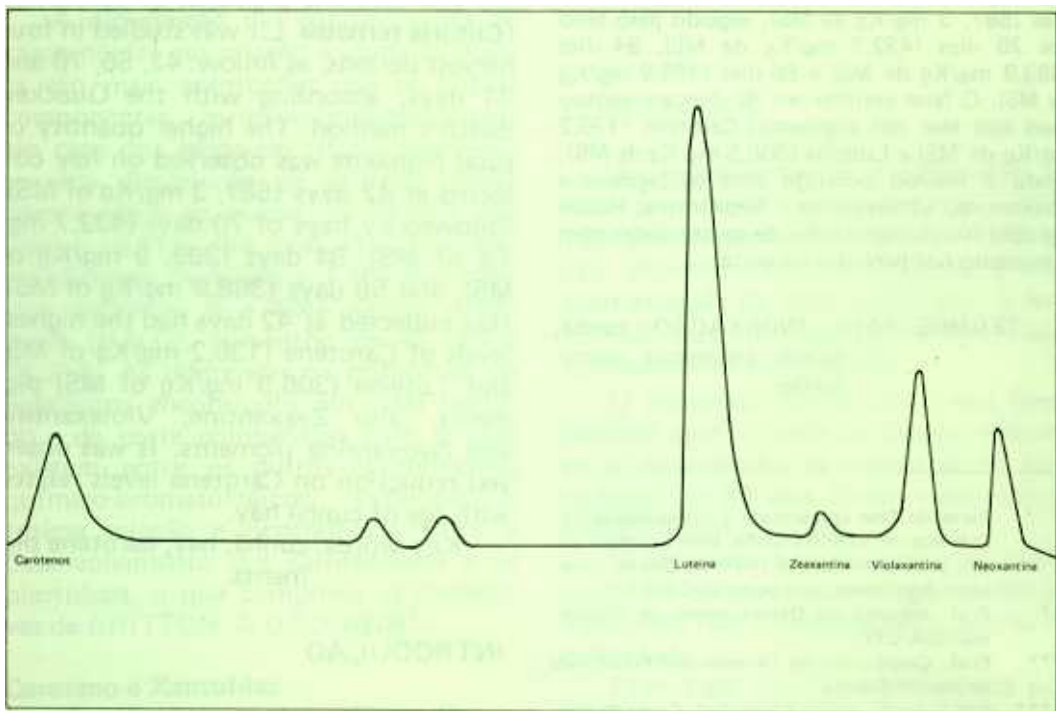


Figura 2 – Gráfico dos diferentes pigmentos dos carotenóides totais do ferro de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L) colhida aos 56 dias, separados por cromatografia em capa fina.

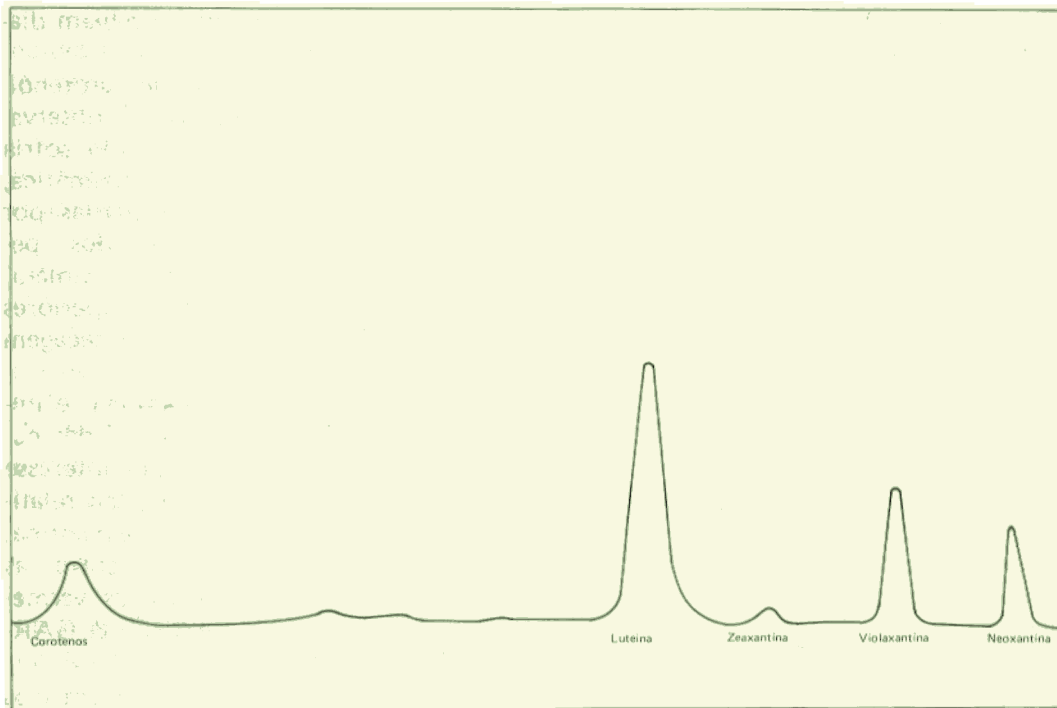


Figura 3 – Gráfico dos diferentes pigmentos dos carotenóides totais do feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.) colhida aos 70 dias, separados por cromatografia de capa fina.

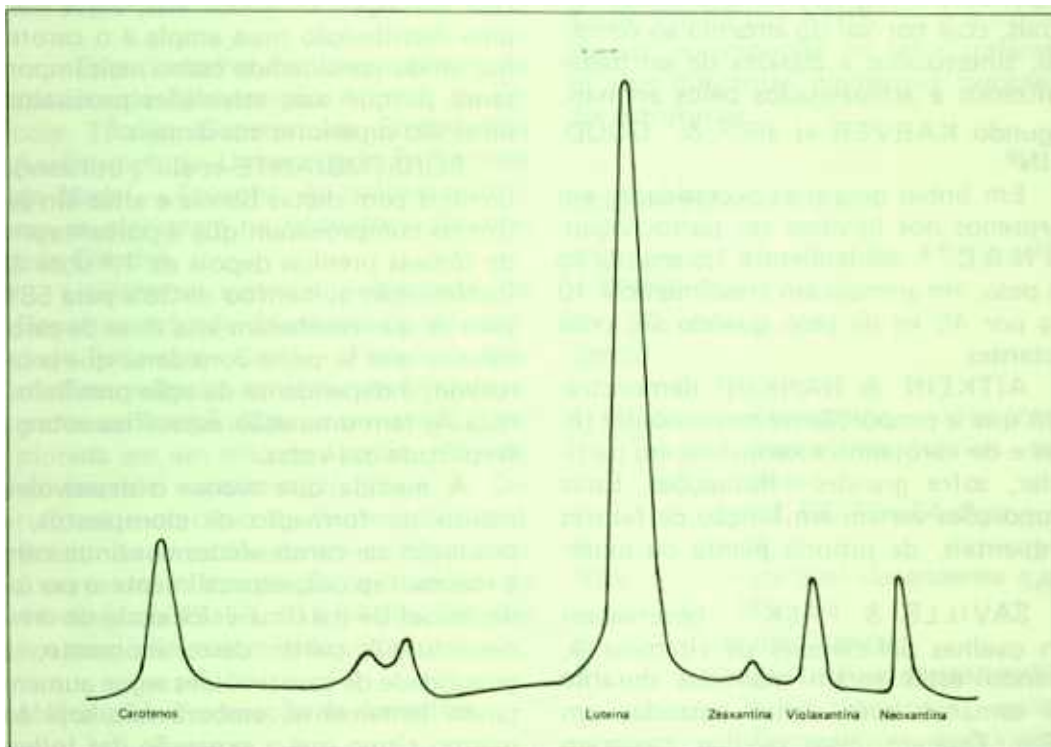


Figura 4 – Gráfico dos diferentes pigmentos dos carotenóides totais do feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.), colhida aos 84 dias, separados por cromatografia em capa fina.

cussão dos mesmos na coloração dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano, tendo em conta que a cor destes produtos conduz a diferente aceitação pelas distintas populações do mundo. Um alimento pode ser considerado como bom por um determinado grupo de pessoas, e rejeitado por outras, por acreditar que este produto não apresenta a pigmentação desejada.

Os fenos e ensilados, preparados em condições técnicas adequadas, representam uma fonte muito rica em carotenos. Os fenos mal conservados ou expostos à intempérie perdem a maior parte do seu valor em caroteno.

A conversão do caroteno em vitamina A, verificada no intestino dos animais, não se realiza com a mesma eficácia nas diversas espécies e raças. É conhecido que entre as raças leiteiras, a Guernsey se distingue por apresentar baixa capacidade de conversão, tendo em conta que suas necessidades em vitamina A são as mesmas.

O nome geral dos carotenóides corresponde a um grupo de pigmentos naturais, cuja cor vai do amarelo ao vermelho, sintetizados e capazes de ser metabolizados e armazenados pelos animais, segundo KARVER et alii<sup>10</sup> & GOODWIN<sup>9</sup>.

Em linhas gerais, as necessidades em carotenos dos bovinos em pasto, segundo N.R.C.<sup>12</sup> oscilam entre 1,5 mg por kg de peso, em animais em crescimento e 10 mg por 45 kg de peso quando são crias lactantes.

AITKEIN & HANKIN<sup>1</sup> demonstraram que a proporção de carotenóides totais e de carotenos e xantofilas em particular, sofre grandes flutuações. Estas proporções variam em função de fatores ambientais, da própria planta ou externos.

SAVILLE & FALK<sup>14</sup> observaram em ovelhas deficiências de vitamina A, quando estas foram mantidas durante 55 semanas com dietas baseadas em grãos. Quando essas ovelhas passaram ao pasto, o nível de vitamina A, subiu no plasma até 23,53 + 5,7 mg/100 ml.

Entretanto, antes este nível era de 6,1 + 5,7 mg/100 ml quando recebiam dietas apenas de grãos.

Com respeito à perda de carotenóide, BRITON & GOODWIN<sup>7</sup> observaram que o material armazenado sofria perdas devido à atividade enzimática, embora se aprecie maiores perdas por processo não enzimático, ativadas pela radiação solar. A luz ultravioleta, igualmente, produz perdas superiores a 70% de caroteno durante a secagem num período de 48 horas.

Em nutrição avícola, também é importante o estudo dos carotenóides como pigmento. As xantofilas, de interesse pigmentário na gema do ovo, são relativamente poucas: luteína, zeaxantina, criptoxantina, fluxoxantina, entre as amarelas e capxantina entre as vermelhas, segundo BOTTEY SERRA & GARCIAFITE<sup>6</sup>.

Mc DONALD et alii<sup>13</sup> citam entre os carotenóides os carotenos (alfa, beta e gama) e a criptoxantina, que existe nas plantas superiores e a mixoxantina, contida em algas. De todos eles, o que tem uma distribuição mais ampla é o caroteno, sendo considerado como mais importante porque suas atividades provitamínicas são superiores aos demais.

BONSEMBIANTE et alii<sup>5</sup>, utilizando bovinos com dietas baixas e altas em caroteno comprovaram que a porcentagem de fêmeas prenhas depois da 1.<sup>a</sup> dose de inseminação aumentou de 38% para 58% para as que receberam alta dose de caroteno, o que se pode considerar que o caroteno, independente da ação provitamínica A, tem uma ação específica sobre a fertilidade das vacas.

A medida que avança o desenvolvimento da formação de cloroplastos, a produção de carotenóides continua com a mesma rapidez, especialmente o período inicial de máxima velocidade de crescimento. A partir deste momento, a quantidade de carotenóides segue aumentando lentamente, embora não seja ao mesmo ritmo que a expansão das folhas (formação de matéria seca), pela qual sua concentração diminui de maneira muito

acentuada; as folhas jovens têm portanto, uma maior concentração de carotenóides que as folhas maduras; em consequência, uma planta em estado de desenvolvimento avançado, pode conter uma maior quantidade de carotenóides em valor absoluto, do que uma planta em período jovem de crescimento ativo, embora a concentração, nesta, seja uns 50% superior, segundo BRITTON & GOODWIN<sup>7</sup>.

CARVALHO et alii<sup>8</sup> fazem referência que os fenos obtidos de plantas cortadas, inclusive na fase de floração, quando desidratada convenientemente, isto é, evitando demasiada exposição ao sol e chuvas ocasionais, conservam um considerável conteúdo de caroteno. Por outro lado, a exposição prolongada do material verde ao sol ou à chuva produz uma perda bastante elevada, ao contrário da desidratação artificial do feno que produz uma pequena perda de caroteno, devido à rapidez do processo desenvolvido.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Cátedra de Alimentação Animal, da Escola Técnica Superior de Engenheiros Agrônomos da Universidade Politécnica de Madri — Espanha. As análises químicas se efetuaram no laboratório da referida Cátedra.

Utilizou-se material procedente do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará — Fortaleza, Brasil. Este material consistiu de feno da leguminosa cunhã (*Clitoria ternatea* L.) explorada em um solo de aluvião, irrigada, na fazenda experimental "Vale do Curu", no município de Pentecoste-Ceará, Brasil. As amostras foram colhidas após o corte de uniformização, a intervalos de 14 dias, aos 42, 56, 70 e 84 dias, fenadas em condições naturais de campo.

### Métodos de Preparação de Amostras

Entre os numerosos métodos para extração dos carotenóides, se elegeu pa-

ra esta pesquisa o método de QUACKENBUSCH, citado por A.O.A.C.<sup>2</sup>

### Separação e Quantificação dos Carotenóides

Esta operação foi feita por cromatografia em camada fina. Para a separação cromatográfica das diferentes xantofilas que formam o total dos carotenóides dos fenos utilizou-se o método de QUACKENBUSCH, proposto pela A.O.A.C.<sup>2</sup>

Dos gráficos obtidos na leitura das placas, escolheu-se o mais representativo de cada período de corte, pois, como se pode observar nas FIGURAS 1, 2, 3 e 4, são muito semelhantes, variando unicamente a altura dos picos que depende das concentrações.

### Análise Estatística

Para o estudo estatístico das diferenças entre os pigmentos carotenóides dos fenos em estudo, utilizou-se a análise de variância de SNEDECOR<sup>15</sup>, a prova de comparação de médias de Newman-Keuls, citada por KIRK<sup>11</sup>, e o modelo abaixo, corresponde ao fator tratamento dos diferentes pigmentos carotenóides estruturais.

Modelo: Fatorial triplo.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + R_k + TR_{ij} + PR_{jk} + TPR_{ijk}$$

Sendo:

	= neoxantina, violaxantina, zeaxantina, luteína, caroteno;
	= 42, 56, 70 e 84 dias;
K	= 4;
Y <sub>ijk</sub>	= variável dependente a analisar;
$\mu$	= média geral;
T <sub>i</sub>	= efeito fixo correspondente aos pigmentos isolados (neoxantina, violaxantina, zeaxantina, luteína, caroteno);

- Pj = efeito fixo correspondente aos períodos de corte;  
 Rk = efeito aleatório devido às repetições;  
 = interação entre pigmentos isolados e período de corte,  
 = interação entre pigmentos isolados e repetições;  
 = interação entre os períodos de corte e repetições;  
 TPrijk = erro residual.

Assim, estabeleceu-se a diferença entre os fatores que determinam a proporção de carotenóides totais cou de carotenos e xantofilas em separado, em cada um dos períodos e as possíveis variações.

### Carotenóides Totais

Os dados de carotenóides totais se encontram na TABELA 1, para os quatro períodos de corte. Observa-se que o período de 42 dias apresenta a maior quantidade de carotenóides totais (587,28 mg/kg de matéria seca – M.S.), seguido do período de 70 dias (432,68 mg/kg de M.S.) e do período de 84 dias (393,93 mg/kg de M.S.). O período de 56 dias apresentou um valor de 368,86 mg/kg de M.S., o que não concorda com os dados da literatura<sup>3</sup>, nos quais se observa uma diminuição quantitativa da proporção de carotenóides totais à medida que aumenta a idade da planta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os resultados encontrados no presente estudo, tanto para carotenóides totais, como para carotenós e xantofilas isolados, visando conhecer a significação dos fatores (estado de desenvolvimento e tipo de pigmento) efetuou-se a análise estatística, mediante o método de análise de variância de SNEDECOR<sup>15</sup>.

Também se comparou a relação entre tipo de pigmento e estado de desenvolvimento. Quando a significação resultou positiva para os fatores considerados, assim como para a interação tipo de pigmento "versus" estado de desenvolvimento, realizou-se a prova de comparação de médias proposta por Newman-Keuls, citada por KIRK<sup>11</sup>.

Efetuando-se a análise estatística dos resultados (TABELA 2), observa-se que a influência dos dois fatores, período de corte e tipo de pigmentos, resultou altamente significativo ( $P < 0,01$ ). A comparação de médias dos pigmentos nos quatro períodos estudados (TABELA 3) indica que a neoxantina (16,60%) e a zeaxantina (17,44%) não apresentaram diferenças estatísticas entre si, en-

Tabela 1

Valores Médios dos Pigmentos Carotenóides Isolados (mg/kg de M.S.) do Feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.) em Quatro Períodos de Corte Madri, Espanha, 1983.

Pigmentos Carotenóides	Períodos de Colheita			
	42 dias	56 dias	70 dias	84 dias
Carotenos	136,21	90,50	85,85	70,29
Luteína	306,46	198,94	242,94	226,55
Zeaxantina	24,74	9,39	26,83	18,79
Violaxantina	63,50	30,84	57,78	35,81
Neoxantina	27,95	9,96	15,43	13,08
Não identificados	28,42	29,23	13,85	29,41
<b>T O T A L</b>	<b>587,28</b>	<b>368,86</b>	<b>432,68</b>	<b>393,93</b>

Tabela 2

Análise de Variância dos Resultados dos Carotenóides do Feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.) em Quatro Períodos de Corte (Dados Baseados na M.S.), Madri, Espanha, 1983.

Fontes de Variação	Soma do Quadrado	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
J	431888.2	4	1079992.0	291.63 * *
K	69.19580	2	30.09795	
L	17297.78	3	5765.928	137.11
JK	2961.848	8	370.2310	
JL	11893.88	12	991.1569	4.88
KL	252.3175	6	42.05292	
JKL	4874.919	24	203.1216	

J – Pigmentos;

K – Repetição;

L – Período de colheita

Tabela 3

Comparação de Médias dos Pigmentos Carotenóides do Feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.) em Quatro Períodos de Corte. (Baseado na M.S.). Madri, Espanha, 1983.

Carotenóides	Médias	N	Z	V	C
L	243,72	227,12 **	226,28 **	197,28 **	148,02 * *
C	95,70	79,10 **	78,26 **	49,26 **	
V	46,98	30,38 *	29,54 **		
Z	17,44	0,84NS			
N	16,60				

L – Luteína;

C – Carotenos;

V – Violaxantina;

Z – Zeaxantina;

N – Neoxantina

\*\* (P < 0,01);

\* (P < 0,01);

\* (P < 0,05);

NS (P > 0,05) não significativo.

Tabela 4

Comparação de Médias Entre os Períodos de Corte do Feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.) Madri, Espanha, 1983.

Período de corte	Médias	56	84	70
42 dias	111,77	43,85 **	38,87 **	28,01 **
70 dias	83,76	15,84 **	10,86 **	
84 dias	72,90	4,91NS		
56 dias	67,92			

\*\* (P < 0,01);

NS (P > 0,05) não significativo.

tretanto diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) dos pigmentos neoxantina e violaxantina, (46,98%) como também, os demais entre si ( $P < 0,01$ ).

A comparação de médias entre os períodos de corte (TABELA 4), revela que os períodos de 42, 70 e 84 dias de idade apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,01$ ), por outro lado o corte com 56 dias de idade não apresentou diferenças significativas com o de 84 dias, e sim com os demais ( $P < 0,01$ ).

O fato do período de 56 dias ter apresentado menos carotenóides (67,42 mg/kg de M.S.) que os períodos de 70 e 84 dias não parece normal, dado que a relação folhas/ talos diminui com a idade da planta.

Com exceção do período de 56 dias de idade, a prova de NEWMAN KEULS confirmou que as diferenças encontradas na proporção de carotenóides e estado de desenvolvimento foram todas significativas ( $P < 0,01$ ). Isto mostra que a concentração de carotenóides totais, diminui significativamente com o retardamento do corte da planta.

A diminuição das concentrações de carotenóides em relação à idade da planta são mais acentuadas que os outros componentes químico-bromatológicos. No caso dos fenos em estudo observou-se uma diminuição da proteína bruta com a idade da planta, de 23,06% (42 dias) a 18,71% (84 dias). O estrato etéreo diminui de 4,28% a 3,46% nos mesmos períodos, já a fibra neutro detergente (F.N.D), aumentou de 42,39% a 54,21%. As diferenças na proporção de pigmentos encontrados em cada período de corte comparadas com as que existem entre os outros componentes químico-bromatológicos, explicam a íntima relação e dependência entre o desenvolvimento dos carotenóides e os plástídeos, o que comprova as afirmativas de BRITTON & GOODWIN<sup>7</sup>.

### Caroteno e Xantofilas

As porcentagens de cada um dos carotenóides identificados no feno de Cu-

nã (*Clitoria ternatea* L.), por período de corte, assim como os do gênero "vicias" encontrados por BARRO DE NEYRA<sup>3</sup> e os dados de BICKOFF et alii<sup>4</sup> para alfafa, encontram-se na TABELA 5. Observa-se que a proporção de luteína nos quatro períodos, resultou superior aos dos gêneros de vicias e da alfafa, enquanto que a zeaxantina (pigmento de grande interesse como a luteína), foi superior aos dados de alfafa e inferior aos das três vicias. Os dados de violaxantina e neaxantina foram inferiores aos do gênero "vicias" e da alfafa. A criptoxantina encontrada para alfafa, não foi identificada nos fenos de cunhã.

O período de 42 dias apresentou quantidade de carotenos (136,21 mg/kg de M.S.) e de xantofilas; luteína, zeaxantina, violaxantina e neaxantina (422,65 mg/kg de M.S.) superiores aos demais períodos de corte, o que pode estar condicionado à idade da planta (relação folhas/talos).

### CONCLUSÕES

As quantidades de carotenóides totais dos fenos da leguminosa Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.), de um modo geral, decresceu com a idade da planta, com exceção da idade de 56 dias. O feno colhido aos 42 dias apresentou maior conteúdo de carotenóides.

O conteúdo de caroteno dos fenos diminui com a idade da planta; enquanto as quantidades de xantofilas do feno colhido aos 42 dias foram superiores às demais idades de corte.

O pigmento luteína aumentou com a idade de corte, enquanto que as demais xantofilas não apresentaram a mesma regularidade.

Com base nos resultados desta pesquisa, destaca-se o feno de cunhã como uma das alternativas para a formulação de rações para animais.



Tabela 5

Valores Médios<sup>(1)</sup> dos Pigmentos Isolados da Matéria Seca do Feno de Cunhã (*Clitoria ternatea*, L.), em Quatro Idades de Corte, e de Plantas do Gênero "vicias" e Alfafa (*Medicago sativa*,) "in natura". (Em % Total de Carotenóides).  
Madri Espanha, 1983.

	Caroteno- nos	Luteína	Zea- xantina	Viola- xantina	Neo- xantina	Cripto- xantina
<i>C. ternatea</i>						
42 dias	23,19	52,18	4,10	10,81	4,76	—
56 dias	24,53	58,93	2,55	3,86	2,70	—
70 dias	19,84	56,15	3,89	13,35	3,57	—
84 dias	17,84	60,84	4,77	9,09	3,32	—
Média	21,35	57,02	3,83	9,28	3,59	—
<i>V. sativa</i> (2)						
Início floração	28,88	39,54	6,70	13,89	11,00	
Plena floração	28,16	38,22	7,87	14,04	11,89	
Legumes	25,66	38,55	8,14	14,73	12,94	
Média	27,56	38,77	7,57	14,22	11,94	
<i>V. villosa</i> (2)						
Início floração	27,74	42,08	3,55	14,30	11,55	
Plena floração	28,17	44,46	3,73	13,15	10,29	
Legumes	27,59	44,60	6,88	10,28	10,63	
Média	27,83	43,71	4,72	12,91	10,82	
<i>V. monanthos</i> (2)						
Início floração	28,58	50,93	4,30	9,72	6,44	
Plena floração	29,35	44,15	6,30	10,96	9,22	
Legumes	22,44	44,76	8,72	13,35	10,69	
Média	26,79	46,61	6,44	11,34	8,78	
<i>V. ervilia</i> (2)						
Início floração	29,30	42,63	7,24	11,24	9,66	
Plena floração	31,22	46,75	5,09	7,96	9,15	
Legumes	27,00	48,46	5,30	9,24	10,01	
Média	29,17	45,95	5,88	9,48	9,61	
<i>M. sativa</i> (3)						
Média	20,00	32,00	1,80	27,40	15,40	3,40

(1) Estes valores correspondem à média aritmética dos fenos nos quatro períodos de corte.

(2) Dados de BARRO DE NEYRA<sup>3</sup>

(3) Dados de BICKOFF et. alii<sup>4</sup>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AITKEN, F.C. & HANKIN, R.G. *Vitamins in Feed for Livestock*. Tech. Comm. Commonwealth Bureau of Animal Nutrition. Aberdeen, N.<sup>o</sup> 25; citado por BARRO DE NEYRA, L.M.C., Madrid. 335-349, 1980.
2. A.O.A.C. Official methods of analysis. 3 ed. Association of Official Agricultural Chemist. Washington, D.C., 1015 p. 1970.
3. BARRO DE NEYRA, L.M.C. *Estudo de los carotenoides y su variación a lo largo del ciclo vegetativo de la planta en distintas especies de género Vicia*. Tesis Doctoral Universidade Complutense. Madrid. 335-349, 1980.
4. BICKOFF, E.M.; LIVINSTON, A.L.; BAILEY, G.F. & THOMPSON, C.R. Xantopylls in fresh and dedhydrated alfafa. *Jour Agr. and Food. Chem.* 2 (11) 563-566, 1954.

5. BONSEMBIANTE, M.; BITTANTE, G. & ANDRIGHETTO, I. *L'effetto del beta-carotene sulla fertilit  di bovine alimentate con dieta integrate con vitamina A*. 11 p. 1980.
6. BOTEY SERRA, J. & GARCIA FITE, D. *Determinación de las xantofilas por cromatografia liquida de alta presión*. Aplicación al estudio de las xantofilas em la yema del huevo, como determinanze de seu color. *Afinidad*, XXXII, N . 325, 249–225, 1975.
7. BRITTON, G. & GOODWIN, T.W. *Chlorophyll, carotenoid pigment and sterols*. Chemistry and biochemistry of Herbage. Vol. 1. Academic Press. London. 478–510, 1973.
8. CARVALHO, L.A.; BRUNE, W.Y. & GARCIA, R. Avalia o de caroteno em plantas forrageiras. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Vol. 9, N.  4. Pág. 514–525, 1980.
9. GOODWIN T.W. *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Academic Press. Londres, Nueva York, citado por BARRO DE NEYRA, L.M.C. en "Estudio de los carotenoides y su variación a lo largo del ciclo vegetativo de la planta en distintas especies del g nero *Vicia*", 335–349, 1980.
10. KARVER, P. Citado por BARRO DE NEYRA, L.M.C. en "Estudio de los carotenoides y su variación a lo largo del ciclo vegetativo de la planta en distintas especies del g nero *Vicia*", 335–349, 1950.
11. KIRK. Citado por BARRO DE NEYRA, L.M.C. en "Estudio de los carotenoides y su variación a lo largo del ciclo vegetativo de la planta en distintas especies del g nero *Vicia*" 335 – 349, 1980.
12. NATIONAL RESEARCH COUNCIL – Nutrient Requeriments of Domestic Animals, N.  2. Nutrient requeriments of Swine. National Research Council, Washington, D.C. 33p. 1968.
13. Mc DONALD, P. EDWARDS, R.A. & GRENALGH, J.F.D. *Nutrition Animal*, 2 ed. Acribia. Zaragoza, Espanha. 479p. 1979.
14. SAVILLE, D.G. & FALK, R.H. Vitamin A deficiency in drought feed sheep. *Aust. Journal Exp. Aplic. and Aust.* 12 (54): 19–20, 1972.
15. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6 ed. Ames, Iowa State University Press. 593p. 1974.