

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Influência de extratos fitogênicos *in vitro* na produção de massa microbiana
do rúmen

Milenna Nunes Moreira

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Avaliação da adição de extratos fitogênicos *in vitro* na produção de massa
microbiana do rúmen

Milenna Nunes Moreira
Graduanda

Prof.º Dr.º. Aderbal Marcos de Azevedo Silva
Orientador

MSc. Giovanna Henriques da Nóbrega
Co-orientadora

Patos, PB
Junho de 201

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

M837i

2011 Moreira, Milenna Nunes

Influência de extratos fitogênicos *in vitro* na produção de massa microbiana do rúmen/, Milenna Nunes Moreira. - Patos - PB: UFCG/UAMV, 2011.

34f.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador: Aderbal Marcos de Azevedo Silva

(Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1-. Nutrição Animal. 2 – Aditivos fitogênicos. 3- Plantas Medicinais.

CDU: 616.085:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MILENNA NUNES MOREIRA
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária

ENTREGUE EM ____/____/____

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aderbal Marcos de Azevedo Silva ORIENTADOR	Nota
Prof. Dra. Melânia Loureiro Marinho EXAMINADOR I	Nota
MSc. Giovanna Henriques da Nóbrega EXAMINADOR II	Nota

Aos meus pais, Juscelino e
Claudia Maria por toda
paciência, amor, incentivo e
carinho dedicados a mim e por
participar de todos os
momentos da minha vida.

Dedico!

Agradecimentos

Sempre temos um objetivo na vida, para isso corremos atrás de nossos sonhos e ser Medica Veterinária é um deles, que hoje esta se tornando realidade. Mas para isso preciso agradecer muito. Primeiramente a **Deus** ter me dado o dom da vida e que sem Ele não seria e não teria nada.

Aos meus pais **Juscelino Andrade** e **Claudia Maria** por terem me dado toda a força para que chegasse ate aqui, mesmo que para isso tenham sacrificado muito de suas vidas e de seu tempo com minha educação, passando por todas as alegrias e as dificuldades nesse tempo em que estou aqui chorando, sorrindo, brincando, estudando, sonhando e realizando conquistas.

Aos meus avós **Onofre Nunes** (*in memorian*) e **Alouracy Alves, João Elias e Jeneci Andrade** (*in memorian*) que com muita garra conseguiram ter uma vida feliz, mesmo com as dificuldades educaram seus filhos e seus netos dando um caráter que poucos conseguiram formar.

Ao meu irmão **Moisés Nunes** pelos dias de briga e de alegria que me deu e por sempre me apoiar em tudo.

Aos meus tios **Joana, Genivaldo, Joãozinho, Claudijane, Claudijilson e Claudecy** por sempre acreditarem em mim e vê mais do que uma menina levada. Aos meus primos por terem compartilhado uma infância divertida e agradável.

Aos **animais**, que são tão importantes para a existência desse curso e para que possamos nos especializar e assim conseguir ajudá-los a ter melhor qualidade de vida.

A turma 2006.2 por me proporcionar esses cinco anos de muito trabalho, mas de muita diversão. Em especial **Andrea** (primeira amizade feita), **Bruna** (noites de estudo e amiga incondicional), **Gabi, Aline, Raissa, Sâmya, Danilo** e **Nilberto** que deixaram isso tudo bem melhor do que já é!

A minha companheira de moradia **Maria Ivana**, por me aturar na alegria e na tristeza, na saúde e na doença ate que a formatura nos separe, mas sempre amiga e presente para sempre!

A professora **Solange Absalão** (*in memorian*) por ter confiado em mim e ter me dado as primeiras experiências científicas na minha vida acadêmica, e pela preocupação de mãe que sempre demonstrou com os seus orientados.

Ao meu orientador **Aderbal**, pela paciência de orientar uma graduanda tão estressada e briguenta como ele diz.

Ao grupo de trabalho **Gió, Maiza, Fábio, Juninho, Milena e Diego** por todos os finais de semana e feriados passados no laboratório ralando para que esse trabalho saísse.

A todos os **mestres** da UFCG do campus de Patos – PB, pela nossa formação acadêmica.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Caprinos	14
2.2 Ecossistemas microbianos do rúmen	15
2.3 Importância da utilização de plantas medicinais	17
2.4 Taboa (<i>Typha domingensis</i>)	19
2.5 Flor de seda (<i>Calotropis procera</i>)	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Local do experimento	22
3.2 Coleta e pré-murchamento	22
3.3 Determinação de matéria seca	22
3.4 Extração e concentração	23
3.5 Liofilização	24
3.6 Degradabilidade	24
3.7 Análise do líquido ruminal	25
3.8 Massa microbiana	25
3.9 Estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Quantidade de matéria verde coletada (g), percentual de matéria seca, 22
matéria seca coletada (g) e extrato em pó obtido (g) de flor de seda e taboa
- Tabela 2** Média da diferença entre os dados obtidos, antes e após 24 horas de 26
degradação, das variáveis tempo de sedimentação, potencial de redução do azul de
metileno, pH e massa microbiana
- Tabela 3** Média da degradação da matéria seca das amostras com extrato e sem 30
extrato da taboa e da flor de seda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Taboa (<i>Typha domingensis</i>) (Fonte MEDEIROS, 2011)	19
Figura 2 Flor de seda (<i>Calotropis procera</i>) (Fonte MEDEIROS 2011)	20
Figura 3 Preparo da alcoolatura (Fonte: MEDEIROS 2011)	23
Figura 4 Armazenamento (Fonte: MEDEIROS 2011)	23
Figura 5 Rotoevaporador (Fonte: MEDEIROS 2011)	23
Figura 6 Liofilizador (Fonte: MEDEIROS 2011)	24
Figura 7 Dayse (Fonte: MOREIRA 2011)	25
Figura 8 Avaliação de cor, tempo de sedimentação e REDOX do líquido ruminal (MOREIRA 2011)	25
Figura 9 Centrifuga (Fonte: MOREIRA 2011)	26
Figura 10 Tubos de Ensaio Contendo Massa Microbiana (MOREIRA 2011)	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Quantidade de infusórios antes e depois de 24 horas de degradação	27
Gráfico 2 Motilidade de infusórios antes e depois de 24 horas de degradação	28

RESUMO

MOREIRA, MILENNA NUNES. Avaliação da adição de extratos fitogênicos *in vitro* na produção de massa microbiana do rúmen. UFCG, 2011 37pg. (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária).

Os aditivos fitogênicos são compostos químicos presentes em extratos vegetais e têm despertado interesse em suas ações farmacológicas, como contribuição na fermentação ruminal, possivelmente aumentando a massa microbiana e conseqüentemente melhorando a digestibilidade de forrageiras. Algumas plantas da região Nordeste são usadas e consideradas eficientes no tratamento de animais, entre elas a taboa (*Typha domingensis*) e a flor de seda (*Calotropis procera*). O objetivo dessa pesquisa foi observar alterações na produção da massa microbiana do rúmen, em procedimento *in vitro*, quantificando assim a ação do extrato liofilizado da taboa e da flor de seda na produção desses microorganismos e os efeitos causados no líquido ruminal de caprinos. O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). A coleta das plantas foi realizada na cidade de Patos – PB, nas proximidades do CSTR. Destas foi feita uma extração alcoólica e o extrato, liofilizado para confecção do extrato em pó. Foi desenvolvida degradação *in vitro* de capim elefante, com adição ou não do extrato liofilizado de cada uma das plantas. O líquido ruminal foi avaliado quanto a cor, consistência, odor, pH, redução do azul de metileno (REDOX), sedimentação e quanto aos infusórios (quantidade, motilidade tamanho), além da produção de massa microbiana. Não houve diferença estatística entre os parâmetros de avaliação do líquido ruminal, nem na produção de massa microbiana. O capim elefante teve menor degradabilidade no tratamento com adição do extrato de taboa. A adição dos extratos fitogênicos da taboa e da flor de seda não alterou a produção de massa microbiana. Entretanto mais pesquisas são necessárias para que se possa estabelecer o uso ou não desses extratos como aditivos, com o objetivo de melhorar a atividade dos microorganismos ruminais.

Palavras- chave: aditivos, microorganismos, plantas medicinais

ABSTRACT

MOREIRA, MILENNA NUNES. Evaluation of phytogetic extracts addition on *in vitro* production of microbial mass in the rumen. UFCG, 2011 37pg. (Work End of Course in Veterinary Medicine).

The additives are phytogetic chemical compounds present in plant extracts and has been attracting interest in its pharmacological actions as a contribution of rumen fermentation, possibly increasing microbial mass and consequently improving the digestibility of forage. Some plants in the Northeast are widely used and considered effective in animals, including the (*Typha domingensis*) and silk flower (*Calotropis procera*). The objective of this research was to observe changes in the production of microbial mass in the rumen, on *in vitro* procedure, thus quantifying the activity of the extract of dried reeds and silk flower in the behavior of these microorganisms and the effects in the rumen of goats. The experiment was conducted at the Laboratory of Animal Nutrition in Health Center and Rural Technology (CSTR), Federal University of Campina Grande (UFCG). The collection of plants was held in the city of Patos - PB, near the CSTR. Those, an alcohol extraction and the extract, freeze-dried to prepare the extract powder. It was developed *in vitro* degradation of elephant grass, with or without addition of freeze-dried extract of each plant. The rumen fluid was evaluated for color, texture, odor, pH, reduction of methylene blue (REDOX), sedimentation and about the infusoria (quantity, motility, size), besides the production of microbial mass. There was no statistical difference between the evaluation parameters of rumen fluid or in the production of microbial mass. The elephant grass had greater degradation in the treatments without addition of extracts. The addition of phytogetic extracts (cattail and silk flower) did not alter the production of microbial mass, would not justify the use of them to enhance the activity of microorganisms.

Keywords: additives, microorganisms, plants, medicinal

1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais com fins de tratamento de doenças e sintomas se perpetuou desde a história da civilização e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizadas por grande parte da população mundial como fontes terapêuticas. A maior parte da população fez ou faz uso de plantas para alívio de dores, inflamações ou no tratamento de doenças. Com os animais não é diferente e várias são as plantas utilizadas pelos produtores rurais, através de conhecimentos tradicionais para tratamento de seu rebanho, e até mesmo dos seus animais de estimação. No Semiárido nordestino, o uso de plantas para a cura de doenças é prática comum. Muitas espécies nativas, até a década de 50, eram utilizadas para produzirem fármacos e cosméticos, agregando renda a economia regional.

A Fitoterapia veterinária é bastante relevante e aceitável por diversos tipos de criação, seja de animais de produção ou animais de companhia para os diversos fins, proporcionando em muitos casos, viabilidade na criação, por minimizar perdas econômicas com o uso de medicamentos sintéticos. Também são usadas como aditivos fitogênicos melhorando o desempenho dos microorganismos ruminais. Os aditivos fitogênicos são compostos químicos presentes em extratos vegetais, tais compostos químicos possuem algumas funções conhecidas como: imunestimulação, incremento ao trânsito intestinal, ação antioxidante na membrana plasmática de células de defesa ação antimicrobiana, antifúngica e efeito tranquilizante. Com isso os aditivos estão ocupando o espaço dos antibióticos e dos ionóforos junto aos produtores rurais. Em decorrência destas características também tem despertado interesse em suas ações farmacológicas, como contribuição da fermentação ruminal, possivelmente aumentando a massa microbiana e consequentemente melhorando a digestibilidade de forrageiras.

Algumas plantas de região Nordeste são usadas e consideradas eficientes em animais, entre elas a taboa (*Typha domingensis*) por possuir característica adstringência, diurética, antidiarréica, antidisentérica, antiinflamatória, antianêmica, emoliente e tônica; e a flor de seda (*Calotropis procera*) que ao longo de vários estudos foram descobertas algumas propriedades farmacológicas, como antiinflamatória, antifebril e analgésica.

Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi observar alterações na produção da massa microbiana do rúmen, em procedimento *in vitro*, quantificando assim a ação do extrato liofilizado da taboa e da flor de seda na produção desses microorganismos e os efeitos causados no líquido ruminal de caprinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinos

A importância econômico-social dos caprinos criados no Nordeste do Brasil reside na produção de leite e de carne para alimentação da população em geral, e particularmente na agropecuária familiar como fonte de proteína animal de baixo custo, e na produção de peles que ao serem comercializadas contribuem para o aumento da renda (SILVA e ARAÚJO, 2000). Por outro lado há um aumento paralelo na demanda por seus produtos em países mais desenvolvidos, desse modo há um crescente interesse na produção dessa espécie, disseminado por todo o mundo. Contudo a alimentação desses animais é o principal componente dos custos de produção, contribuindo para que técnicos e pesquisadores, ao longo dos anos, busquem alternativas para redução desses custos. Porém, a eficiência na produção só será possível se houver um conhecimento adequado da composição do alimento, além das exigências nutricionais dos animais, associadas a outras práticas de manejo (NÓBREGA, 2008).

O Nordeste brasileiro destaca-se pelo desenvolvimento da produção de caprinos, com uma totalidade de 8.303.143 de cabeças, sendo a maioria nos estados da Bahia e Pernambuco, no estado da Paraíba se concentra uma população de 624.205 animais (IBGE, 2009). Apesar de numericamente expressivo, o rebanho caprino da região nordeste mantém índices produtivos ainda baixos, principalmente em razão do baixo padrão tecnológico empregado na região, que é fruto do sistema de produção adotado pela maioria dos criadores (cultura de subsistência) e da falta de apoio governamental.

No entanto nos últimos anos, a caprinocultura no Brasil vem se consolidando como importante alternativa pecuária, principalmente para o pequeno produtor, que emprega mão-de-obra familiar. Entre os fatores que têm colaborado para essa consolidação, destacam-se o preço atrativo do leite, pelo produtor e consumidor, e as características particulares do leite, consumido, por exemplo, por pessoas que possuem intolerância ao leite bovino (GONÇALVES et al., 2001). A partir da iniciativa de alguns criadores dotados de maior visão empresarial, a caprinocultura leiteira vem se desenvolvendo na região e tem-se mostrado uma atividade promissora (CORDEIRO, 2001).

2.2 Ecossistemas microbianos do rúmen

O rúmen é o primeiro dos quatro estômagos dos ruminantes, tem por função juntamente com o retículo a degradação mecânica pela mastigação durante a ingestão e ruminação, bem como à degradação química durante a fermentação microbiana e apresenta um ecossistema microbiano estável e ao mesmo tempo dinâmico (LEEK, 2006). O ecossistema é estável, pois um ruminante saudável não sofre a contaminação do ecossistema, apesar de entrada de milhões de microorganismos no rúmen diariamente, através dos alimentos, água e ar. E se torna dinâmico devido alterações consideráveis em decorrência de mudanças na alimentação do animal. Estas características ocorrem devido a adaptação de certos microorganismos ao ambiente ruminal, enquanto os microorganismos contaminantes não sobrevivem a este ambiente.

O ambiente ruminal é favorável ao desenvolvimento contínuo da população microbiana, atuando como câmara de fermentação pelos seguintes fatores: 1) temperatura entre 38 a 42° C (média 39°C); 2) anaerobiose; 3) pH tampão variando entre 5,5 a 7,0 (média 6,8); 4) presença de bactérias, protozoários e fungos; 5) suplemento de nutriente e contínua remoção de digesta e dos produtos de fermentação; 6) outros: matéria seca entre 10 a 15%, gravidade específica entre 1,022 a 1,055, tensão superficial do líquido de 50 dinas/cm e pressão osmótica constante (LANA, 2005).

O rúmen é considerado um ecossistema aberto e contínuo, que mantém uma população microbiana estável pela evolução de milhões de anos de seleção (KOZLOSKI, 2002). Seu ecossistema consiste principalmente de bactérias (10¹⁰ – 10¹¹ células/mL), protozoários (10⁴ – 10⁶/mL), fungos anaeróbios (10³ – 10⁵ zoósporo/mL) e bacteriófagos (10⁸ – 10⁹/mL) (KAMRA, 2005). As populações de microorganismos variam dentro do mesmo animal segundo o tempo percorrido depois da última ingestão do alimento, e entre animais com igual alimentação em diferentes países (POSGATE E WARE, 1965). O sinergismo e antagonismo de diferentes grupos de microorganismos e também de gêneros de um grupo são diversos e complicados. Os resultados destas relações no rúmen são responsáveis pela bioconversão dos alimentos na forma que é utilizada pelo animal. A qualidade e quantidade dos produtos da fermentação são dependentes do tipo e atividade dos microorganismos no rúmen (TOWNE & NAGAJARA, 1990; TOWNE et al., 1990; RUSSEL et al., 1992).

Os processos microbianos do rúmen permitem converter alimentos fibrosos, proteínas de baixa qualidade e mesmo compostos não-proteicos, em nutrientes para o ruminante. Beever & Moud (2000) salientam que a principal razão pela qual monogástricos e pré-ruminantes são incapazes de utilizar quantidades de forrageiras é que, assim como outros mamíferos, eles não possuem enzimas, presentes no rúmen, que são capazes de quebrar os polímeros complexos que formam as paredes celulares dos vegetais. Nos ruminantes, no entanto, o principal sitio de digestão, com relação às forrageiras, é o rúmen, local onde o alimento é retido por períodos substanciais e sujeito à fermentação microbiana extensiva, sob condições anaeróbicas.

Algumas das características comuns de bactérias encontradas no rúmen de animais consumindo dietas ricas em forragens são (KAMRA, 2005):

- A maioria das bactérias são gram-negativa. O número de bactérias gram-positivas tende a aumentar com a elevação da energia na dieta.
- A maioria das bactérias são anaeróbias obrigatórias. Existem algumas anaeróbias facultativas.
- O ótimo pH de crescimento de bactérias ruminais é entre 6,0 e 6,9.
- Temperatura ótima em torno de 39°C.
- Toleram níveis altos de ácidos orgânicos sem prejudicar seu metabolismo

As bactérias são classificadas mediante a utilização de substratos ou características fermentativas comuns. Entretanto, se produz uma grande superposição de bactérias nos grupos, porque a maioria das espécies é capaz de fermentar vários substratos (CHURCH, 1993).

A maior parte dos protozoários no rúmen são ciliados e dividem-se em dois grupos dependendo de características morfológicas: os entodiniomorfos, que ingerem preferencialmente partículas insolúveis suspensas no fluído ruminal e estão presentes em maior número quando a dieta é a base de forragem, e os holotriquiás, que tem maior capacidade de ingerir materiais solúveis e grânulos de amido e estão presentes em maior número quando a dieta é rica em grãos de cereais. Os protozoários podem ser classificados como utilizadores de açúcar, os que degradam amido e os que hidrolisam lignina e celulose (OGIMOTO & IMAI, 1981).

As estirpes de fungos encontrados no rúmen são todos anaeróbios restritos. Estes fungos têm uma ativa degradação de fibra por apresentar diferentes enzimas envolvidas na sua degradação. Recentes experimentos têm mostrado que se remover os fungos do

conteúdo ruminal, ocorre significativa redução na produção de gás e degradação da fibra *in vitro* de dietas fibrosas (KAMRA, 2005).

Entre os compostos resultantes dos processos fermentativos no rúmen, Owens & Goetsch (1988) destacam os ácidos graxos, a proteína microbiana e vitamina K e do grupo H como sendo de grande importância para a nutrição dos animais ruminantes. Bergman (1990) salienta que os produtos finais da fermentação são parcialmente determinados pela natureza da dieta, posto que esta possa mudar a atividade metabólica dos microorganismos, promovendo novos substratos que influenciam a qualidade e a natureza desses produtos. Além disso, as quantidades dos compostos resultantes dos processos fermentantes são elaboradas não somente em função das composições químicas dos alimentos ingeridos, mas também são dependentes da quantidade e do tempo de permanência dos alimentos nos compartimentos pré-gástricos (HUNGATE, 1966), uma vez que a quantidade e a composição da dieta são variáveis externas que afetam a ingestão, a taxa de digestão a taxa de passagem e desta maneira, o turnover do conteúdo ruminal (VAN SOEST, 1994).

2.3 Importância da utilização de plantas medicinais

Desde os primórdios, os vegetais fazem parte da vida do homem como fonte de alimentos, de matéria prima para vestuário, habitações, restauradores de saúde, etc (CALIXTO, 2000). As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam as sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, pertencente à época XVIII dinastia, que descrevia o tratamento de mais de 100 doenças baseado na utilização de um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Neste campo de pesquisa envolvendo produtos naturais, destacaram-se alguns da civilização grega, como Hipócrates e Teofrasto, sendo esse último responsável pelo registro da utilização da espécie botânica *Papaver Somniferum*, que tem como princípio ativo à morfina, analgésico opióide empregado até os dias de hoje (PINTO et al., 2002).

Apesar da existência destes registros antigos que relatam à ampla utilização dos vegetais como alternativa terapêutica, todo esse conhecimento sempre foi baseado no empirismo, ou seja, no conhecimento prático do emprego dos vegetais como medicamentos. Somente no início do século passado esses recursos passaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e os princípios ativos começaram a ser

identificados e utilizados pela medicina tradicional (SIMÕES et al., 2001; PHILLIPSON, 2001).

De maneira que essa forma de terapia e sua maneira prática de utilização nas mais variadas doenças tem se tornado cada vez mais difundida. Estes conhecimentos foram passando de geração a geração, através do crescente intercâmbio entre os povos, sendo as plantas medicinais comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (ALMEIDA, 1993; MACIEL, 2002).

Estas observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Sendo que hoje, o seu uso não se restringe às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistência médica e farmacêutica; tudo indica que elas são utilizadas intensamente no meio urbano, como forma alternativa ou complementar em relação aos medicamentos da medicina oficial (SIMÕES et al, 1986; MACIEL, 2002).

Em virtude disto, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL, 2002).

Apesar da enorme diversidade molecular presente nos compostos químicos isolados a partir dos vegetais, o que muitas vezes impossibilita que essas estruturas sejam reproduzidas simetricamente, somente 15 a 17% dos espécimes de plantas já foi estudado ao seu potencial medicinal (COX & HEINRICH, 2001).

As plantas medicinais também são utilizadas como aditivos fitogênicos que são compostos químicos presentes em extratos vegetais. Esses compostos possuem ações isoladas ou sinérgicas, sendo seu uso combinado mais interessante do ponto de vista comercial, por reduzir as doses e potencializar os efeitos (GABBI, 2004). Tais compostos químicos possuem algumas funções orgânicas que já estão esclarecidas e outras que ainda necessitam um maior número de pesquisas. Entre estas funções conhecidas está a imunoestimulação, incremento ao trânsito intestinal, ação antioxidante na membrana

plasmática de células de defesa, ação antimicrobiana e antifúngica (MIZUBUTI et al 2010).

2.4 Taboa

A *Typha domingensis* (Taboa) pertence à família Typhaceae, comumente conhecida como Taboa, é uma planta perene, herbácea, rizomatosa, aquática, com caule cilíndrico, podendo atingir até 3m de altura, nativa da América do Sul. Propaga-se por sementes e vegetativamente e forma densos agrupamentos. É bastante vigorosa, chegando a produzir 7.000 kg de rizomas por hectare. Seus rizomas são comestíveis, possuindo valor protéico igual ao do milho e de carboidratos igual ao da batata (BIANCO et al., 2003). É muito freqüente em margens de lagos, reservatórios, canais de drenagem e várzeas. Possui importância comercial, pois serve de matéria prima para confecção de móveis e de celulose (KISSMANN, 2000).



Figura 1. Taboa (*Typha domingensis*) (Fonte MEDEIROS, 2011)

É uma espécie emergente cujas folhas são anfiestomáticas e apresentam grupos de fibras esclerenquimáticas por entre as células do parênquima paliçádico, logo abaixo da epiderme, e associados aos feixes (HENRY-SILVA e CAMARGO, 2003). Plantas de *T. domingensis* absorvem metais pesados, inclusive o cobre, podendo contribuir para o saneamento ambiental. Indicada, também, como depuradora natural de ambientes aquáticos (REITZ, 1984).

2.5 Flor de seda

A *Calotropis procera* SW (flor de seda ou algodão de seda), da família Asclepiadácea, destaca-se como uma das espécies arbustivas do semi-árido utilizadas como alternativa alimentar, tanto pela adaptação (mantém-se resistente no período de maior escassez de água) como pela disponibilidade. Abbas et al. (1992) encontraram teores de MS e PB equivalente a 94,62 e 19,4%, respectivamente, confirmando o excelente valor nutritivo da *Calotropis procera* SW, o que permite sua utilização como alternativa na suplementação protéica/energética de rebanhos no semi-árido.



Figura 2. Flor de seda (*Calotropis procera*) (Fonte MEDEIROS 2011)

O uso desta planta *in natura* na alimentação animal é limitado por algumas de suas características. Kumar et al. (2000), avaliando as propriedades farmacológicas do látex de *Calotropis procera* SW, confirmaram a existência de propriedades antiinflamatórias, antifebris e analgésicas. Shivkar & Kumar (2003) afirmaram haver também propriedade anti-helmíntica. Sharma (1934) assegura que o látex da *Calotropis procera* SW também é usado como abortivo e infanticida. Outra característica do látex dessa planta é sua ação sobre o coração dos mamíferos, aumentando a força das contrações sistêmicas e aumentando a amplitude de contração e relaxamento dos átrios. Kumar et al. (2000), analisando galhos e folhas de *Calotropis procera* SW em estudos fitoquímicos e sua utilização na alimentação caprina, detectaram substâncias ativas como: glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos flavônicos, triterpenos, esteróides e polifenóis. Esses autores confirmaram, no entanto, que as plantas desidratadas e picadas não apresentam toxidez, pois, após a dessecação, ocorre perda ou volatilização de algumas substâncias ativas, tornando-a menos tóxica. Ademais, Silva et. al. (2010) observaram que o aumento da

proporção de feno de flor de seda na dieta de ovinos em crescimento melhorou a digestibilidade da matéria seca e a conversão alimentar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento:

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), localizada no município de Patos-PB, no período de setembro de 2010 à maio de 2011. O clima da região é classificado como quente e seco com duas estações bem definidas, sendo uma chuvosa, de janeiro a maio, e outra seca, de junho a dezembro, com médias pluviométricas anuais de 500 mm.

3.2 Coleta e pré-murchamento

A coleta das plantas foi realizada na cidade de Patos – PB, nas proximidades do CSTR, entre os dias 14 e 22 de outubro de 2010, em período de estiagem, com temperaturas variando entre 29 à 41°C. No horário das 06:00 às 07:30 da manhã.

O pré-murchamento foi realizado em lugar ventilado e sombreado, durante 48 horas após a coleta.

3.3 Determinação de matéria seca

A determinação da matéria seca (MS) foi realizada após o processo de pré-murchamento com o objetivo de observar o rendimento das plantas, e obter a quantidade necessária das plantas para a confecção dos extratos. O maior rendimento foi observado para a taboa (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de matéria verde coletada (g) (MV), percentual de matéria seca (MS), matéria seca coletada (g) (MS) e extrato (EX) em pó obtido (g) de flor de seda, e taboa.

Planta	MV(g)	MS(%)	MS(g)	EX(g)
Flor de seda	3399	10,86	369	36,317
Taboa	2584	19,80	512	40,087

3.4 Extração e concentração

Após o pré-murchamento as plantas foram processadas em alcoolatura (Figura 3), onde para um litro da mesma, foram utilizadas 200g da planta picada, 263 mL de água destilada e 737 mL de álcool a 95%. Logo após foram misturados e mantidos no processo de extração por duas horas. Em seguida o material foi filtrado, armazenado em frasco âmbar (Figura 4) e conservado em geladeira.



Figura 3. Preparo da alcoolatura (Fonte: MEDEIROS 2011)



Figura 4. Armazenamento (Fonte: MEDEIROS 2011)

Para a concentração dos extratos foi utilizado o Evaporador Rotativo à Vácuo (Modelo MA – 120/V) (Figura 5), onde o extrato da taboa permaneceu por duas horas, enquanto o da flor de seda permaneceu por quatro horas em uma temperatura de 60°C. Logo após, alíquotas dos extratos foram colocados em potes plásticos e armazenados em congelador à - 20°C durante 72 horas.



Figura 5. Rotoevaporador (Fonte: MEDEIROS, 2011)

3.5 Liofilização

No processo de liofilização os potes com os extratos congelados (-20°C) foram dispostos no liofilizador (Modelo ALPHA 1-4 LD) (Figura 6), onde passaram por 72 horas para secar. Depois de secas foram moídas em moinho de bola, onde se confeccionou o pó dos extratos e por serem hidrosscópicas foram conservados em um dessecador.



Figura 6. Liofilizador (Fonte: MEDEIROS, 2011)

3.6 Degradabilidade

Para a degradação, foi utilizado como substrato, para a manutenção dos microorganismos ruminais, feno de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), confeccionado na fazenda NUPEÁRIDO (Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento do Trópico Semi-Árido) – Fazenda Experimental do Jatobá, a partir do corte da planta verde, triturada em picadeira, seca ao sol durante dois a quatro dias, em seguida moído em máquina forrageira com peneira fina, ensacado e armazenado em sacos de náilon.

O procedimento *in vitro*, com adição ou não do extrato liofilizado de cada uma das plantas, foi desenvolvido no aparelho ANKON 200 (Ankon Technology Corp., Faiport, NY, USA) (Figura 7), conforme metodologia proposta por Tilley e Terry (1963) e adaptada por Silva (1990), para averiguar se houve ou não melhoramento da flora microbiana com a utilização dos extratos das plantas, anteriormente sugerido.



Figura 7. Dayse (Fonte: MOREIRA 2011)

3.7 Análise do líquido ruminal

Logo após a coleta do líquido ruminal, este foi misturado com saliva artificial, e retirado uma amostra para a análise. Foi avaliado segundo Rosenberger (1993) quanto a cor, consistência, odor, pH, redução do azul de metileno (REDOX), sedimentação e quanto aos infusórios (quantidade, motilidade e tamanho).

O estudo do líquido ruminal das amostras com capim elefante como única fonte de alimentação para os microorganismos (sem extrato) e com adição de extrato das plantas fitogênicas, foi realizado entre a diferença do líquido antes e após 24 de degradação *in vitro*.

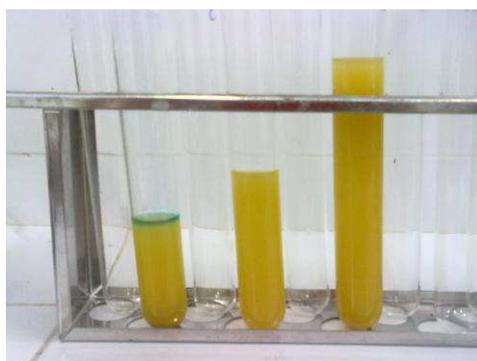


Figura 8. Avaliação de cor, tempo de sedimentação e REDOX do líquido ruminal (MOREIRA 2011)

3.8 Massa microbiana

Para determinar o peso da massa microbiana foi retirada uma amostra de 2 mL de cada solução submetidas ao rúmen artificial, antes e após a degradação de 24 horas,

colocado na centrífuga (Modelo 80 – 2B) por quatro minutos ($3.000 \text{ rotações min}^{-1}$), e em seguida pesados, observando a diferença entre as amostras antes e após a degradação.



Figura 9. Centrífuga (Fonte: MOREIRA, 2011)



Figura 10. Tubos de Ensaio Contendo Massa Microbiana (MOREIRA, 2011)

3.9 Estatística

Os dados relativos a cor e infusórios do líquido ruminal foram submetidos ao teste não paramétrico (Qui Quadrado). Com o restante dos dados, de pH, redução do azul de metileno (REDOX), tempo de sedimentação, produção de massa microbiana e a degradação do feno de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), foi aplicado um teste de média (Duncan), comparando assim a desenvoltura das amostras de capim elefante com adição de extratos fitogênicos, com as que não continham o extrato das plantas, com um nível de significância de 5%, usando o programa SAS (1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as avaliações do líquido ruminal, as características consistência e odor, foram sempre consideradas aquosa e aromático fraco, respectivamente, devido a diluição do líquido ruminal em saliva artificial, em uma quantidade de três pra um. Com relação a cor, não houve diferença estatística ($P>0,05$) para a frequência das três cores observadas, amarelo palha, castanho amarelado e marrom amarelado.

O teste de frequência não revelou diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos, antes e depois de 24 horas de degradação *in vitro*, para os parâmetros quantidade e motilidade dos infusórios (Gráficos 1 e 2).

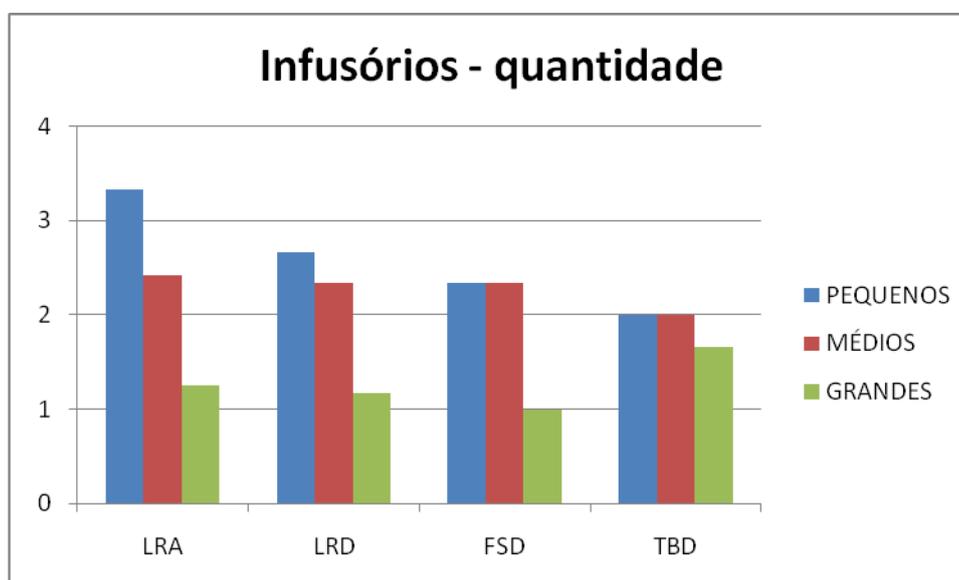


Gráfico 1. Quantidade de infusórios antes (LRA – líquido ruminal) e depois (LRD – líquido ruminal, FSD – com extrato de flor de seda, TBD – com extrato de taboa) de 24 horas de degradação; 0 = ausentes, 1 = raros, 2 = poucos, 3 = quantidade moderada, 4 = boa quantidade

Analisando o Gráfico 1, a quantidade de infusórios diminuiu, de uma forma geral, após 24 horas de degradação, para os tratamentos sem e com adição do extrato de taboa e flor de seda, ressaltando que em nenhum deles houve mortalidade total dos infusórios.

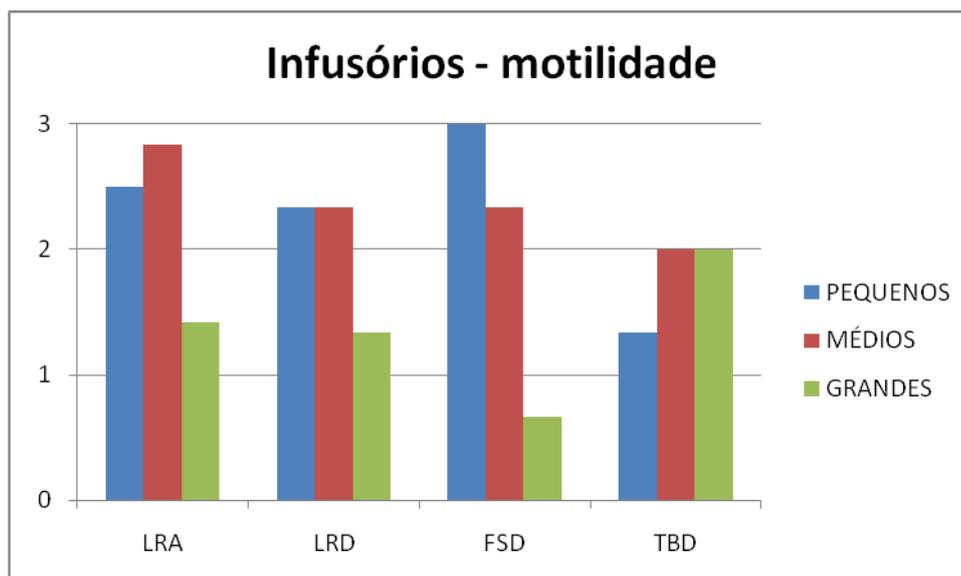


Gráfico 2. Motilidade de infusórios antes (LRA – líquido ruminal) e depois (LRD – líquido ruminal, FSD – com extrato de flor de seda, TBD – com extrato de taboa) de 24 horas de degradação; 0 = ausente, 1 = baixa, 2 = moderada, 3 = ativos ou boa motilidade

Com relação a motilidade dos infusórios (Gráfico 2), o líquido ruminal avaliado depois da degradação, com ou sem adição do extrato das plantas, manteve as movimentações próximas a do líquido avaliado antes da degradação.

Observando as variáveis tempo de sedimentação, potencial de redução do azul de metileno, pH e massa microbiana (Tabela 2), nota-se que não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos utilizados (com ou sem adição dos extratos), ou seja, não houve alteração no desenvolvimento dos microorganismos, nem na produção de massa microbiana.

Tabela 2 - Média da diferença entre os dados obtidos, antes e após 24 horas de degradação, das variáveis tempo de sedimentação (SEDI), potencial de redução do azul de metileno (REDOX), pH e massa microbiana (MAMI)

Variáveis	SE*	CF	CT	P
SEDI (seg)	27,33	-18,33	90,00	0,27
REDOX (seg)	332,50	370,00	537,00	0,19
pH	0,03	0,02	-0,03	0,72
MAMI (g)	14,20	15,95	-32,12	0,82

*SE = sem extrato; CF = com extrato de flor de seda; CT = com extrato de taboa.

Resultado semelhante foi observado por Gabbi (2004), em estudo com novilhas da raça Jersey, onde os resultados mostraram que a inclusão do aditivo fitogênico não influenciou nos parâmetros zootécnicos (ganho de peso diário e eficiência alimentar), no

entanto este autor encontrou resultado satisfatório em relação aos parâmetros hematológicos, implicando que estudos com extratos fitoterápicos devem ser realizados para um melhor conhecimento em relação ao seu uso na nutrição animal inclusive estudos semelhantes a este devem ser confirmados *in vivo*.

Mesmo não havendo diferença estatística ($P>0,05$), observa-se que, quanto à sedimentação, todos os tratamentos aumentaram esse tempo, comparando antes e após 24 horas de degradação, com exceção do extrato de flor de seda, que diminuiu, o que pode significar que esse extrato não possui boas características para a produção de massa microbiana. Segundo Rosemberger (1993) o tempo de sedimentação, num proventrículo normal, é de quatro a oito minutos dependendo do alimento e do tempo em que o mesmo foi ingerido. No presente estudo todas as amostras tiveram um tempo bem inferior ao relatado pela literatura, fato que pode ser explicado devido o líquido ruminal ter sido retirado de um animal em jejum e em seguida o mesmo ser diluído em saliva artificial.

Na prova de redução do azul de metileno (REDOX) observou-se que houve um aumento no tempo de redução para todos os tratamentos, após o processo de degradação *in vitro*. Os tratamentos sem adição de extrato e com adição de extrato de flor de seda (CF), tiveram um aumento de aproximadamente cinco minutos, permanecendo dentro da normalidade para animais alimentados com volumoso. Entretanto, considerando valores numéricos, o tratamento com adição do extrato de taboa apresentou um aumento de mais de oito minutos, que pode ser um indicativo de que esse extrato não proporciona melhor desempenho dos microorganismos ruminais.

Quanto ao pH observou-se que apenas no tratamento com o extrato da taboa houve uma tendência a reduzir, quando comparado com o pH de antes da degradação, mesmo não havendo diferença estatística ($P>0,05$). A média final do pH ruminal foi 7,0 indicando que o pH proporcionou um ambiente adequado para a flora ruminal se desenvolver.

A produção de massa microbiana também não foi influenciada pela adição dos extratos de taboa e flor de seda ($P>0,05$). Entretanto, considerando os valores numéricos, o tratamento com adição do extrato de taboa provocou uma diminuição na produção de massa.

Quanto à degradabilidade, observou-se que, em relação ao tratamento sem adição dos extratos fitogênicos, a presença do extrato de flor de seda não influenciou a degradação, enquanto que as amostras com extrato de taboa obtiveram menor degradabilidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Média da degradação da Matéria seca das amostras com extrato e sem extrato da Taboa e da Flor de Seda

Amostras	SE*	CF	CT	P
Degradação da MS**	36,19a	34,52ab	33,28b	0,006

*SE = sem extrato; CF = com extrato da flor de seda; CT = com extrato da taboa. **letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente, pelo teste de Duncan.

Os resultados obtidos da degradação da MS do feno de capim elefante complementam os observados na avaliação do líquido ruminal (Tabela 2), confirmando a ineficiência dos extratos das plantas, taboa e flor de seda, em melhorar o desempenho dos microorganismos ruminais, aumentar a produção de massa microbiana e, conseqüentemente melhorar a digestibilidade de forrageiras.

5 CONCLUSÃO

A adição dos extratos fitogênicos da taboa e da flor de seda não alterou a produção de massa microbiana. Entretanto mais pesquisas são necessárias para que se possa estabelecer o uso ou não desses extratos como aditivos, com o objetivo de melhorar a atividade dos microorganismos ruminais.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. K.; BOYETTE, C.D. Weeds and crop species. **Weed Technol.**, v.6, p.548-552, 1992.

ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais Brasileira, São Paulo: Hemus,1993, p. 341.2, 1992.

BEEVER, D. E.; MULD, F. L.; **Forage evaluation for efficient ruminant livestock production.** In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (ED) Forage evaluation in ruminant nutrition. Wallingford: CAB Publishing, 2000. p. 15 42.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology. Veterinary.**, v.70, p.567-590, 1990.

BIANCO, S.; PITELLI, R. A.; PITELLI, A. M. C. M. Leaf area estimation in *Typha latifolia* using leaf blade linear dimensions. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p. 257-261, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, v.33, p.179-189, 2000.

CHURCH, D. C. **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes.** Zaragoza: Acríbia, 1993. 641p.

CORDEIRO, P. R. C. Produção de leite d cabra no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p.497.

COX, P. A.; HEIRICH, M. Ethnobotany and drug development. **Phamaceutical News**, v. 8, p.55 – 59, 2001.

GABBI, A. M. **Aditivo fitogênico na alimentação de novilhas leiteiras da raça Jersey:** parâmetros zootécnicos, hematológicos e comportamentais. 2004. 70f. Dissertação (mestrado Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

GONÇALVES, H. C.; SILVA, M. A.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A. Fatores Genéticos e de Meio na Produção de Leite de Caprinos Leiteiros. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.719-729, 2001.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Avaliação sazonal da biomassa da macrófita aquática *Eichhornia azurea* em um rio de águas brancas da bacia hidrográfica do rio Itanhaém (litoral sul do estado de São Paulo, Brasil). **Hoehnea**, v.30, p.71-77, 2003.

HUNGATE, R.E. **The Rumen And Its Microbs.** New York: Academic Press, 1966. 533p.

IBGE. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 26 de maio de 2011.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p.124-134, 2005.

- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. TOMO III – 2ªed. 2000. 726p.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFSM. 2002, 140p.
- KUMAR, S. MaBy; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. Electrostatic strengths of saet bidgesin dehydrogenase monames, 3w. **Web of Science**. v.38, n.4, p.368- 383, 2000.
- LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343p.
- LEEK, B. F. **Digestão no estômago do ruminante**. In: REECE, W. O. Dukes, fisiologia dos animais domésticos. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.404-437.
- MACIEL M. A. M., PINTO A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas Medicinais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Química. Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MIZUBUTI, I. Y.; PEREIRA, E. S.; PINTO, A. P.; CARNEIRO, M. S. S.; **Uso de Aditivos para novilhas Leiteiras** .. In :Novilhas Leiteiras PEREIRA, E. S.; PIMENTEL, P.G.; QUEIROZ, A.C.; MIZUBUTI, I.Y. Edt LTDA; Fortaleza; 2010. p.461-487.
- NÓBREGA, Giovanna Henriques da. **Composição corporal e exigências nutricionais de caprinos ½ Boer ½ SRD em pastejo no Semi-árido**. Patos, PB: UFCG, 2008. 52p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrosilvipastoris no Semi-árido).
- OGIMOTO, K., IMAI, S. **Atlas of rumen microbiology**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, v. 31, p.302, 1981.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A. L. **Ruminal fermentation**. In: CHVRCH, PC (Ed) The ruminant animal: digestive physiology and nutrition – Waweland press, 1988. P 145-171.
- PHILLIPSON, I. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237-243, 2001.
- POSGATE, J. R. & WARE, D. A. Manipulating rumen fermentation. **Jornal Animal Science.**, Champaign, v.46, n.3, p.585-599, 1965.
- REITZ, R. **Tifáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1984.
- ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 166-228.
- RUSSEL, J. B.; CONNOR, J. D.; FOX, D. C.; A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal Fermentation. **Jornal Animal Science**, v.70, p.3553-3561, 1992.
- SAS-Statistics Analysis Systems Institute. **User's guide**. North Caroline: SAS Institute Inc., 1999.

SHARMA, G. K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v.4, p.63-74, 1934.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Anthelmintic activit of the latex of *Colotropis procera*. **Biology Pharmaceutical**, v.41, p.263-365, 2003.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2 ed. Vicosa, MG: Universidade Federal de Vicosa, 1990. 165p.

SILVA, A. M. A.; COSTA, R. G.; PEREIRA FILHO, J. M.; BAKKE, I. A.; LÔBO, K. M. S.; LIRA FILHO, G. E.; NÓBREGA, G. H. Nutritional balue of silk flower hay for lambs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2739 – 2743, 2010.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2 ed. Vicosa, MG: Universidade Federal de Vicosa, 1990. 165p.

SILVA, F. L. R; ARAUJO, A. M. Desempenho Produtivo em Caprinos Mestiços no Semi-árido do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1028-1035, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre/Florianopolis: Editors da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2001.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage techique for the in vitro digestion of forages crops. **Journal of the British Grassland Journal**, v.18, p.104-111, 1963.

TOWNE, G.; NAGAJARA, T. G. Omasal ciliated protozoa in cattle, bison and sheep. **Applied Environment Microbiology**, v.56, p.409-412, 1990.

TOWNE, G.; NAGAJARA, T. G.; BRANDT, R. T. Ruminal ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemental fat. **Journal Animal Science**, v.68, p.2150-2155, 1990.

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