

ANDRÉ SOARES DE OLIVEIRA

**CO-PRODUTOS DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE SEMENTES DE MAMONA E
DE GIRASSOL NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48c
2008

Oliveira, André Soares de, 1976-
Co-produtos da extração de óleo de sementes de mamona
e de girassol na alimentação de ruminantes / André Soares de
Oliveira. – Viçosa, MG, 2008.
xv, 166f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Maurício de Souza Campos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nutrição animal 2. Bovino de leite. 3. Digestão. 4. Ricina
- Biodegradação. 5. Biodiesel. 6. Fibras na nutrição animal.
7. Síntese protéica. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

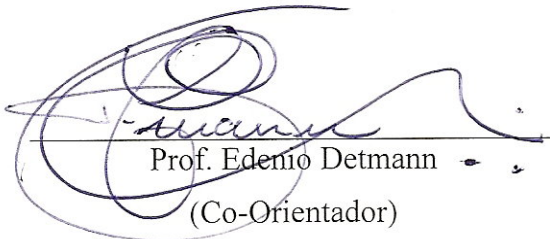
CDD 22.ed. 636.085

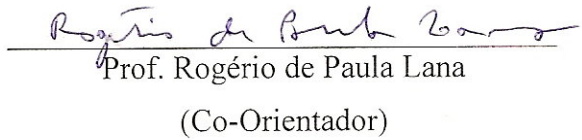
ANDRÉ SOARES DE OLIVEIRA

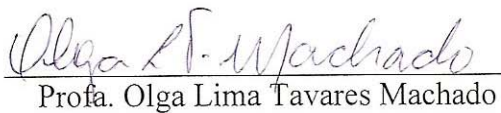
CO-PRODUTOS DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE SEMENTES DE MAMONA E
DE GIRASSOL NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

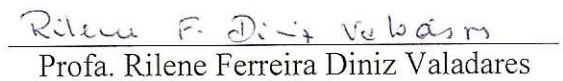
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

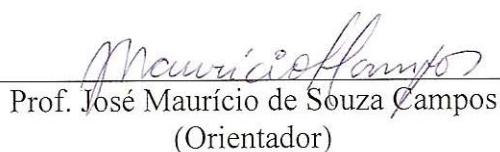
Aprovada: 20 de agosto de 2008


Prof. Edenio Detmann
(Co-Orientador)


Prof. Rogério de Paula Lana
(Co-Orientador)


Profa. Olga Lima Tavares Machado


Profa. Rilene Ferreira Diniz Valadares


Prof. José Maurício de Souza Campos
(Orientador)

**À minha esposa Márcia e aos nossos filhos Júlia e Lucas,
alicerces da minha vida,
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e pelo apoio na realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento parcial dos experimentos com co-produtos da extração do óleo de mamona na alimentação animal.

Ao professor José Maurício de Souza Campos, pela amizade, pela confiança, pelos cruciais ensinamentos e valiosa orientação.

Um agradecimento especial aos amigos Alberto e Shirley, pela grande amizade e pelo apoio irrestrito.

Aos professores Edênio Detmann, Odilon Gomes Pereira, Sebastião de Campos Valadares Filho, Rogério de Paula Lana e Rilene Ferreira Diniz Valadares Filho pelos importantes ensinamentos e pela amizade.

À professora Olga Lima Tavares Machado pela oportunidade do treinamento em análise eletroforética e pela valiosa contribuição.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, pela disponibilização do Laboratório de Proteína.

Ao professor Ronaldo Perez, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos.

Aos estagiários Eduarda, Débora, Luciano, Gustavo, Janaína (Zootecnia), Janáina (Veterinária) e Ana Cristina pelo empenho e dedicação.

Aos funcionários da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL), em particular ao Joélcio, Almiro e Gaguinho, pelo importante apoio durante as realizações dos experimentos e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Monteiro, Fernando, Valdir, Vera e Wellington, pelo importante apoio durante a realização das análises laboratoriais.

Aos funcionários da Fábrica de Ração, pela confecção das rações.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pelos preciosos ensinamentos, apoio, convívio e amizade.

Aos amigos e colegas: José Carlos, Cristina, Douglas, José Augusto, Stefanie, Viviane, Lara, Darcilene, Henrique, Juliana, André Brito, Belmiro, Rennius, Acreano, Analívia, Daniel, Janáina, e demais, pelo intercâmbio de conhecimentos e idéias, pelo convívio, pelo apoio e valiosa amizade.

À TECNOMOL - Empresa Júnior de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, pelas sugestões de protocolos de extração de ricina.

Às doutoras Márcia Flores e Angélica Bataro pelos auxílios na realização da eletroforese

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDRÉ SOARES DE OLIVEIRA, filho de Amando Rangel de Oliveira e Tânia Maria Soares de Oliveira, nasceu em Campos dos Goitacazes, Estado do Rio de Janeiro, em 05 de junho de 1976.

Em 1994, ingressou na Universidade Federal de Viçosa-UFV, onde obteve o título de Zootecnista, colando grau em 26 de março de 1999.

No período de abril de 1999 a março de 2001 realizou trabalhos de assessoria e consultoria técnica e gerencial para grupos de produtores de leite na região da Zona da Mata Mineira, Sul do Espírito Santo e Noroeste Fluminense.

Entre abril de 2001 e fevereiro de 2003, foi consultor técnico do Projeto Educampo/Sebrae-MG na região de Teixeira de Freitas, Bahia, realizando trabalhos de acompanhamento técnico e gerencial para grupos de produtores de leite.

Em março de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, defendendo tese em 17 de fevereiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, defendendo tese em 20 de agosto de 2008.

CONTEÚDO

Resumo.....	viii
Abstract.....	xii
Introdução geral.....	1
Literuatura Citada.....	11
Eficiência de utilização de nutrientes e função hepática de ovinos alimentados com dietas contendo farelo ou torta de mamona tratado com hidróxido de cálcio.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	21
Resultados e Discussão.....	31
Conclusões.....	49
Literatura Citada.....	49
Degradação ruminal da ricina e seu efeito sobre o crescimento microbiano.....	55
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	59
Resultados e Discussão.....	65
Conclusões.....	80
Literatura Citada.....	81
Eficácia de destoxificação da ricina por meio de tratamento alcalino ou térmico e seus efeitos sobre o valor nutritivo do farelo de mamona para ruminantes.....	85
Resumo.....	85
Abstract.....	86
Introdução.....	87
Material e Métodos.....	89
Resultados e Discussão.....	96
Conclusões.....	120
Literatura Citada.....	120

Desempenho produtivo e eficiência de utilização de nutrientes em vacas leiteiras alimentadas com farelo de girassol.....	125
Resumo.....	125
Abstract.....	126
Introdução.....	127
Material e Métodos.....	129
Resultados e Discussão.....	138
Conclusões.....	158
Literatura Citada.....	158
Conclusões Gerais.....	165

RESUMO

OLIVEIRA, André Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2008.
Co-produtos da extração de óleo de sementes de mamona e de girassol na alimentação de ruminantes. Orientador: José Maurício de Souza Campos. Co-orientadores: Edenio Detmann e Rogério de Paula Lana.

A expectativa de crescimento gradual da participação do biodiesel na matriz energética mundial, cria necessidade de estudos sobre a utilização dos co-produtos gerados pela cadeia produtiva. Neste sentido, propõe-se avaliar os co-produtos da extração de óleo de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) e de girassol (*Helianthus annuus* L.) na alimentação de ruminantes, em quatro experimentos. No **experimento I** avaliou-se o uso do farelo (FM) ou torta de mamona (TM), tratado ou não com 40g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$, sobre o consumo e digestibilidade, função hepática, síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e balanço de nitrogênio em ovinos. Utilizou-se 19 ovinos sem raça definida com peso inicial médio de 56 kg, mantidos em gaiolas de metabolismo por 21 dias, sendo 16 dias de adaptação e cinco dias de coleta. Os animais foram distribuídos em cinco tratamentos referentes à fonte protéica, em 15% da matéria seca (MS) da dieta: farelo de soja, FM, FM tratado com Ca(OH)_2 (FMT), TM e TM tratado com Ca(OH)_2 (TMT), os quais foram arranjados num fatorial $2 \times 2 + 1$ (com fator adicional). O tratamento com Ca(OH)_2 reduziu em 62,1 e 64,8% o teor de ricina do FM (773 mg/kg de MS) e da TM (799 mg/kg de MS). O consumo médio diário de ricina reduziu ($P < 0,10$) com o tratamento alcalino, em média de 2,43 para 0,96 g/kg de peso corporal. Não foram observados sintomas clínicos de intoxicação por ricina e os níveis séricos de enzimas relacionados com função hepática não se alteraram, estando dentro do padrão normal da espécie. Não houve efeitos entre mamona e soja, de interações entre fonte e tratamento com Ca(OH)_2 e de fonte de mamona sobre os consumos de MS e componentes da dieta, exceto para os consumos de extrato etéreo (EE), maior ($P < 0,10$) para a TM, e de carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinza e proteína (CNFcp), maior ($P < 0,10$) para dieta com FS. Porém, o tratamento do FM e TM com Ca(OH)_2 aumentou ($P < 0,10$) o consumo de MS, proteína bruta e CNFcp. Não houve efeito no coeficiente de digestibilidade (CD) da dieta entre mamona e soja (exceto para CDEE, maior ($P < 0,10$) para TM), de interação entre fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 e de fonte de mamona (exceto para CDEE, maior ($P < 0,10$) para TM). O tratamento alcalino aumentou ($P < 0,10$) o CD de todos os

componentes (exceto CDCNFcp). A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e a eficiência de utilização dos substratos energéticos e nitrogenados (ECNi) da dieta aumentaram ($P < 0,10$) apenas com $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Apesar da excreção urinária de N-uréia ter aumentado com o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, a maior ($P < 0,10$) ECNi reduziu ($P < 0,10$) as perdas de N fecal, aumentando-se em 21,3% a retenção de N. O tratamento do FM ou TM com 40g de $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{kg}$, base da matéria natural, apesar de não desnaturar completamente a ricina, amplia a eficiência de utilização dos componentes energéticos e nitrogenados em dietas para ovinos. No **experimento II** avaliou-se a capacidade *in vitro* dos microrganismos ruminais em destoxificar a ricina do farelo de mamona (FM), bem como o efeito da desnaturação de proteínas solúveis do FM por meio de tratamento alcalino, sobre a taxa de crescimento microbiano (μ) e a concentração média de amônia ao longo da incubação. Foram avaliadas três fontes de proteína solúvel (tripticase, extrato bruto de farelo de mamona (EBP) em estado intacto; e EBP em estado desnaturado com óxido de cálcio) em três doses de proteína (0,42; 0,84 e 1,64 g/L), em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 3x3. Foram coletadas amostras do meio de cultivo nos tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas para: análise de ricina, mediante eletroforese em gel (SDS-PAGE), densitometria e dosagem de proteína total; avaliação do crescimento microbiano (DO-600 nm); e dosagem de amônia. As sub-unidades de ricina não desaparecem na ausência de inóculo ruminal, mas foram degradadas a taxas de 0,2725; 0,1504 e 0,0648h⁻¹ com inóculo ruminal nas concentrações iniciais de 61, 122 e 243 µg de ricina/mL do meio de cultivo. Estas concentrações de ricina representaram uma relação de 0,15; 0,30 e 0,60 kg de FM por litro de meio de cultivo ruminal. Houve interações ($P < 0,05$) na taxa instantânea de crescimento microbiano (μ) entre dose e fonte de proteína solúvel e entre dose e desnaturação do EBP de FM. Houve incremento linear ($P < 0,05$) na μ com aumento na dose de tripticase, e redução ($P < 0,05$) de forma quadrática com aumento na dose de EBP intacto de FM, sendo estimado o valor mínimo de -0,0038h⁻¹ na μ , na dose de 1,444 g/L. A μ aumenta ($P < 0,05$) com desnaturação do EBP de farelo de mamona, mas não é afetada pela dose de EBP de mamona em estado desnaturado. A concentração média de amônia foi menor ($P < 0,05$) para o tratamento com EBP de FM em relação à tripticase, não sendo observado efeitos de desnaturação. Os resultados indicam que apesar da microbiota ruminal ser capaz de degradar a ricina, reduzindo sua ação tóxica no animal hospedeiro, a toxina inibe o crescimento microbiano ruminal. Recomenda-se a completa destoxificação do farelo de mamona para seu uso na alimentação de

ruminantes. No **experimento III**, objetivando-se definir o método de destoxificação, avaliou-se a eficácia de destoxificação do FM por meio de tratamento alcalino (Ca(OH)_2 ou CaO , nas doses de 20, 40 ou 60 g/kg, diluído ou não em água) ou térmico (autoclave com pressão de 1,23 kgf/cm² ou 15 psi a 123°C, durante 30, 60 ou 90 minutos) e seus efeitos sobre a composição química, cinética de degradação ruminal *in situ* da proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), matéria seca (MS) e digestibilidade verdadeira intestinal *in vitro* da proteína não-degradada no rúmen (DIV-PNDR). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. A eficácia dos tratamentos foi avaliada com base na presença das subunidades de ricina em gel a 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condição desnaturante, análise densitométrica e dosagem de proteína total. Observou-se teor 831g de ricina/kg de MS no FM controle. A eficácia de 100% de destoxificação com Ca(OH)_2 na dose de 40 g/kg de farelo ou com autoclave em 15 psi durante 60 minutos, observada em pesquisas anteriores, não se confirmou no presente estudo. Somente os tratamentos com Ca(OH)_2 ou CaO , diluídos em água (1:10), na dose de 60 g/kg de farelo, ou com autoclave (90 minutos) mostram-se eficazes ($P < 0,05$) em destoxificar a ricina. O tratamento alcalino, independente da fonte, ou térmico reduzem ($P < 0,05$) a taxa e a degradabilidade ruminal efetiva da PB, mas sem afetar a extensão de degradação e a DIV-PNDR. Somente o tratamento alcalino promove reduções ($P < 0,05$) nas estimativas de repleção ruminal da fração potencialmente degradável da FDN, em razão do aumento na taxa de degradação ruminal. Estimam-se custos com aquisição do agente alcalino equivalentes a 6% do preço FOB (livre de frete e imposto) do FM comercializado como fertilizante. Os tratamentos alcalinos com Ca(OH)_2 ou CaO na dose de 60g/kg de farelo, ou com 90 minutos de autoclave (1,23 kgf/cm², 123°C) poderão permitir o uso da FM na alimentação de ruminantes, mas sua aplicação em escala industrial depende de estudos sobre viabilidade operacional e econômica. No **experimento IV** avaliou-se o efeito de quatro níveis de inclusão de farelo de girassol (FG) na dieta (0, 7, 14 e 21%, base da MS) de vacas leiteiras com produção de 30 kg/dia sobre o desempenho produtivo e a eficiência de utilização dos nutrientes. Utilizou-se 12 vacas da raça Holandesa distribuídas em três quadrados latinos 4x4. As dietas foram isonitrogenadas (16,2% de PB, base MS) contendo 55% de silagem de milho, na base da MS. O FG substituiu a mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 47,37% de farelo de trigo, na base da MS (FS:FT). Adotou-se o teste de Williams como procedimento de comparações de médias. O FG apresentou maior valor absoluto para degradabilidade

ruminal efetiva *in situ* da PB em relação à mistura FS:FT (68,68 vs 62,92%). Os consumos dos nutrientes não foram afetados pelo FG, exceto o de EE que reduziu ($P < 0,05$) a partir de 7% de FG e da FDN que aumentou ($P < 0,05$) a partir de 21% FG. Os coeficientes de digestibilidade da MS, MO e CT, e o teor NDT reduziram ($P < 0,05$) a partir de 21% de FG. Os consumos de MS, EE, CT, CNF digestíveis, bem como o consumo de NDT reduziram ($P < 0,05$) a partir do nível de 7% de FG. A composição do leite não foi afetada pelo FG, mas a produção de leite (PL), produção de lactose e extrato seco total reduziram ($P < 0,05$) a partir de 21% FG. A PL corrigida para 3,5% de gordura, a produção de gordura, proteína e extrato seco desengordurado, e a eficiência de conversão do N dietético em N secretado no leite (EUNleite) reduziram ($P < 0,05$) a partir de 14% de FG. O nível de FG não afetou a síntese de proteína microbiana ruminal (estimada por meio da excreção urinária e secreção no leite de derivados de purinas) e a eficiência de utilização dos substratos energéticos, mas reduziu ($P < 0,05$) a eficiência de utilização do nitrogênio (N) disponível para síntese de nitrogênio microbiano (ECNd) a partir de 21% de FG. Não houve efeito sobre a excreção de N urinário. Em razão das reduções ($P < 0,05$) na ECNd e EUNleite, a partir de 21% de FG elevou-se o valor absoluto de perdas de N na urina e nas fezes. O FG pode ser incluído em até 14% em dietas de vacas leiteiras com produção de 30 kg/dia, sem afetar a produção de leite, a composição do leite e as eficiências de utilização dos componentes nitrogenados e energéticos da dieta.

ABSTRACT

OLIVEIRA, André Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2008.
Co-products of castor seed and sunflower seed oil extraction in ruminant feeding. Adviser: José Maurício de Souza Campos. Co-advisers: Edenio Detmann and Rogério de Paula Lana.

The expectation of gradual growth of biodiesel participation in world energetic matrix creates the needs of studies that generate information about the use of the co-products generated by the productive chain. This way, it is proposed to evaluate the co-products of castor (*Ricinus communis* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds oil extraction in ruminant feeding, divided in four experiments. In **experiment I**, it was evaluated the use of solvent (SCM) or expeller castor seed meal (ECM) treated or not with 40 g.kg⁻¹ of Ca(OH)₂ on intake and digestibility, hepatic function, rumen microbial nitrogen synthesis and nitrogen balance in sheep. Nineteen sheep, with 56 kg average initial weight were used, kept in metabolic cages for 21 days, being 16 days for adaptation and five days of collection. The animals were distributed in five treatments, relative to the protein source, in 15% in dieta (basis DM): soybean meal (SM); SCM, SCM treated with Ca(OH)₂ (SCMT), ECM and ECM treated with Ca(OH)₂ (ECMT), which were arranged in a 2x2+1 factorial (with additional factor). The treatment with Ca(OH)₂ reduced in 62.1 and 64.8% the SCM ricin content (773 mg.kg⁻¹ of DM) and of ECM (799 mg.kg⁻¹ of DM). The ricin daily average intake reduced (P<0.10) with alkaline treatment, from the average 2.43 to 0.96 g.kg⁻¹ of body weight. No ricin intoxication clinical symptoms were observed and serum levels of enzymes related to hepatic function were not altered, being within the species normal pattern. There was no effect between castor seed meal and soybean meal, interactions between castor seed source and treatment with Ca(OH)₂ and, castorseed meal source on DM and components the diet intake, except for intakes of ether extract (EE) greater (P<0.10) for ECM, and non-fibrous carbohydrates (NFC) and NFC corretec for ash and protein (NFCap), greater (P<0.10) for the diet with SM. However, the Ca(OH)₂ treatment of castorseed meal SCM and ECM increased (P<0.10) the DM, CP and NFCap intakes. There was no effect in digestibility coefficient between castor seed meal and soybean meal (except for EEDC, greater (P<0.10) for ECM), interaction between castor seed meal source and Ca(OH)₂ treatment, and castor seed meal source (except for EEDC, greater (P<0.10) for ECM). The alkaline treatment increased (P<0.10) all components digestibility

coefficient (except TCDC and NFCDC). Microbial protein synthesis and diet energetic and nitrogen substrates utilization efficiency (NUEi) increased ($P < 0.10$) only with Ca(OH)_2 treatment. Despite the N-urea urinary excretion had increased with Ca(OH)_2 , the greater ($P < 0.10$) NUEi reduced ($P < 0.10$) fecal N loss, increasing N retention in 21.3%. Treatment of solvent or expeller castor seed meal with 40g of $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$, based on natural matter, although not completely desnaturation the ricin, improvement the efficiency of utilization of energy and nitrogen components in diets for sheep. In **experiment II**, it was evaluated the rumen microorganisms *in vitro* capacity to detoxification the ricin, as an effect of solvent castor seed meal (SCM) soluble proteins (containing ricin) denaturation on microbial growth rate (μ) and ammonium average concentration. Rumen *in vitro* incubations containing three soluble protein sources (tripticase, SCM crude extract protein (CEP) intact or in denaturated state with calcium oxide) were evaluated in three doses (0.42, 0.84 and 1.64 g.L^{-1}), in a completely randomized design, with three repetitions, in a 3x3 factorial scheme. At the times 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours, culture medium samples were collected to analysis of: ricin, by gel eletroforesis means (SDS-PAGE), densitometry and total protein dosage; microbial growth (DO-600 nm); and ammonium dosage. Ricin subunits do not disappear in the absence of rumen inoculums, but are degraded to rates of 0.2725, 0.1504 and 0.0648 h^{-1} with rumen inoculums initial concentrations of 61, 122 and 243 $\mu\text{g.mL}$ of ricin in culture medium. These ricin concentrations represent a ratio of 0.15, 0.30 and 0.60 kg of SCM per liter of rumen culture medium. There were interactions ($P < 0.05$) in instantaneous rate of microbial growth (μ) between dose and soluble protein source and between dose and CEP of SCM denaturizing. Linear increase ($P < 0.05$) of μ is observed with increase of tripticase dose, but quadratic reduction ($P < 0.05$) with increase of CEP intact SCM dose, and estimating the minimum value of $-0,0038\text{h}^{-1}$ in μ , at dose of 1,444 g/L . The μ increase ($P < 0.05$) with denaturation of CEP of SCM. The average concentration of ammonium was lesser ($P < 0.05$) in CEP of SCM treatment relative to tripticase, with no denaturation effect observed. The results indicate that, despite rumen microorganisms are capable of degrade ricin, reducting its toxic action in host animal, the toxin inhibits rumen microbial growth. Therefore, castor seed meal complete detoxication is recommended for used in ruminant feeding.. In **experiment III**, With the objective of defining the detoxification method, detoxification efficacy (DE) of CSM was evaluated by means of alkaline treatment (Ca(OH)_2 or CaO , in 20, 40 or 60

g.kg⁻¹ doses, diluted or not in water) or heat (autoclave with 1.23 kgf/cm² pressure or 15 psi at 123°C, during 30, 60 or 90 minutes) and its effects on chemical composition, *in situ* rumen degradation kinetics of crude protein, neutral detergent fiber, dry matter (DM) and *in vitro* true intestinal digestibility of rumen undegradable protein (RUP-IVD). The experiment was carried out in a completely randomized design, with five repetitions. Treatments efficacy was evaluated based on the presence of ricin subunits in 15% policramida gel (SDS-PAGE) in denaturizing condition, densitometric analysis and total protein dosage. It was observed 831 g of ricina.kg⁻¹ of DM in CSM control. The 100% detoxification efficacy with Ca(OH)₂ in 40 g.kg⁻¹ dose of meal or with autoclave at 15 psi during 60 minutes, observed in previous researches, was not confirmed in the present study. Only the treatments with Ca(OH)₂ or CaO, diluted in water (1:10), in 60 g.kg⁻¹ dose of meal, or with autoclave (90 minutes) are efficient (P<0.05) in detoxify ricin. The alkaline treatment, independent of the source, and thermal treatment reduce (P<0.05) the rate and CP effective ruminal degradability, but without effect on degradation extension and RUP-IVD. Only the alkaline treatment promotes reductions (P<0.05) in ruminal repletion estimates of NDF potentially digestible fraction, because of the rumen degradation rate increase. The costs with alkaline agent acquisition are estimated to be equivalent to 6% of the CSM FOB price commercialized as fertilizer. The alkaline treatments with Ca(OH)₂ or CaO in 60 g.kg⁻¹ dose of meal, or with 90 minutes of autoclave (1.23 kgf/cm², 123°C) can permit the use of CSM in ruminant feeding, but its application in industrial scale dependent of studies on operational and economic viability. In **experiment IV**, it was evaluated the effect of four sunflower meal (SFM) levels in the diet (0, 7, 14 and 21%, DM basis) of dairy cows with 30 kg.day⁻¹ production on the productive performance na nutrients utilization efficiency. Twelve Holstein breed cows were distributed in three 4x4 Latin squares. The diets were isoprotein (16.2% CP, DM basis), containing 55% corn silage, DM basis. The SFM substituted the mixture containing 53.57% of soybean meal and 47.37% of wheat meal, DM basis (FS:FT). Williams test was adopted as the average comparison procedure. The SFM presented greater absolute value for CP *in situ* ruminal effective degradability relative to FS:FT mixture (68.68 vs 62.92%). The nutrients intake was not affected by SFM, except that of EE, which reduced (P<0.05) from 7% of SFM, and of NDF, which increased (P<0.05) from 21% of SFM. The DM, OM and TC digestibility coefficients, and the TDN content reduced (P<0.05) from 21% of SFM. The DM, EE, TC, digestible NFC, as well as TDN intake reduced (P<0.05) from 7% of SFM. Milk

composition was not affected by SFM, but milk production (PL), lactose and total solids production reduced ($P<0.05$) from 21% of SFM. The 3.5% fat corrected PL, fat, protein and solids non-fat production, and the conversion efficiency of dietetic N into milk secreted N (EUNmilk) reduced ($P<0.05$) from 14% of SFM. The level of SFM did not affect rumen microbial protein (estimated by the derivatives in purine urinary excretion and secretion of milk) and energetic substrates utilization efficiency, but reduced ($P<0.05$) the degradable nitrogen (N) utilization efficiency for microbial N synthesis (NUEd) from 21% of SFM. There was no effect on the N urinary excretion. Because of the ECNd and EUN milk reductions ($P<0.05$), from 21% of SFM the urine and feces N losses absolute value increased. The SFM can be included in up to 14% in diets of dairy cows with production of 30 kg/day, without affecting the milk production, milk composition and the efficiencies of using nitrogen and energy components of the diet.

INTRODUÇÃO GERAL

A expectativa de crescimento gradual da participação do biodiesel na matriz energética mundial criou oportunidades para a produção de ruminantes através da oferta potencial de farelos ou tortas obtidos após a extração do óleo de sementes de oleaginosas, constituindo os principais co-produtos da cadeia produtiva do biodiesel. Desta forma, permite-se integrar as cadeias de agroenergia e pecuária, otimizando a geração de emprego e renda e minimizando os passivos ambientais. Neste sentido, estudos que permitem gerar informações sobre a melhor forma de utilização dos co-produtos na alimentação de ruminantes fazem-se necessários, para garantir a sustentabilidade desta integração.

O valor nutritivo dos co-produtos da extração de óleo de sementes de oleaginosas depende basicamente do método de extração, da espécie, do grau de decorticação da semente e do processamento do produto resultante (Pierce, 1970).

Os processos de extração podem ser divididos em sistemas mecânico e químico. No sistema mecânico, as prensas hidráulicas consistiram no processo industrial pioneiro de extração de óleo. Em razão da baixa eficiência de extração foram gradualmente substituídas por prensas tipo *expeller*, desenvolvidas no final da década de 1900, os quais constituem atualmente no processo majoritário de extração mecânico de óleo. O processo químico utiliza solventes orgânicos que possibilita maximizar a extração de óleo das sementes (Hayward, 1937; Gallup et al., 1950; Evangelista et al., 2004).

Denomina-se de torta o produto resultante da extração mecânica e farelo resultante da extração química. A torta obtida da extração por prensa hidráulica apresenta maior teor óleo e, conseqüentemente, menor teor de proteína em relação àquela resultante da extração por prensa tipo *expeller*, além de maior variabilidade. O farelo, por ser obtido de um processo mais eficiente de extração de óleo, contém menor

teor de extrato etéreo e, conseqüentemente, maior teor de proteína bruta (Hayward, 1937; Gallup et al., 1950; Pierce, 1970; Evangelista et al., 2004).

Entre as diversas opções de oleaginosas disponíveis para produção de biodiesel, as culturas da mamona (*Ricinus communis* L.) e do girassol (*Helianthus annuus* L.) se caracterizam pelo potencial de exploração em regiões marginalizadas do processo de desenvolvimento e pela alta produtividade potencial de óleo por unidade de superfície comparada às oleaginosas de ciclo anual (Barros et al., 2006; Ferreira et al., 2006; CONAB, 2008). No entanto, as informações dos seus respectivos co-produtos da extração de óleo de sementes na alimentação de ruminantes ainda são escassas, o que impede, até o momento, recomendações exatas para suas utilizações.

As sementes de mamona apresentam altos teores de extrato etéreo (entre 39,6 a 48,4%, com base na MS) (Anthonisen et al., 2006). O produto resultante da extração do óleo constitui alimento concentrado protéico, com teores de proteína bruta (base da MS) entre 30,8 a 40,7%, dependendo do processo de extração do óleo (Moreira et al., 2003; Evangelista et al., 2006), e degradabilidade ruminal efetiva da proteína bruta intermediária entre o farelo de soja e o farelo de algodão (Moreira et al., 2003). Em razão das indústrias comumente não utilizarem decorticações das sementes de mamona, os produtos contém alto teor de fibra em detergente (FDN) e são ricos em cutina (Van Soest, 1994). Assim, o uso de tortas ou farelos de mamona na alimentação de animais não-ruminantes é limitado, o que praticamente impede a concorrência com os animais ruminantes.

Apesar do potencial de utilização dos co-produtos da semente de mamona na alimentação de ruminantes como substitutos de fontes tradicionais de proteína, esses, atualmente, são utilizados somente como fertilizantes orgânicos controladores de nematóides, reduzindo a agregação de valor e a renda da cadeia produtiva. A presença

de um composto tóxico (ricina), de um alcalóide (ricinina) e de complexos alergênicos (albuminas 2S), bem como a carência tecnológica que propicie a obtenção de um alimento seguro com preços competitivos, foram comentados apontados como principais fatores que impedem a sua adoção na alimentação animal (Severino, 2005).

A ricina é uma proteína solúvel encontrada principalmente no endosperma da mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas e caules (Bandeira et al., 2004). Apesar da alta toxicidade da semente, o óleo de mamona não é tóxico, pois a ricina não é solúvel em lipídios, permanecendo todo o componente tóxico na torta ou no farelo (Gaillard & Pepin, 1999).

A toxicidade da ricina é conhecida há mais de um século, mas somente no final da década de 1980 seu mecanismo de ação em células eucarióticas foi melhor elucidado (Endo & Tsuguri, 1987; Endo et al., 1987; Endo & Tsuguri, 1988). A ricina se classifica como uma lecitina, componente do grupo das “proteínas inativadoras de ribossomos”, compostas por duas subunidades de funções biológicas distintas. A subunidade A inativa especificamente e irreversivelmente os ribossomos eucarióticos, impedindo a síntese protéica. Já a subunidade B encontra-se ligada à membrana celular e à subunidade A, e permite a entrada desta por endocitose para o citosol (Olmes, et al., 1974; Endo & Tsurugi, 1988). Assim, se quebradas as ligações entre as duas subunidades, as partes resultantes não são tóxicas em células eucarióticas (Audi et al., 2005).

Em organismos procarióticos, a ricina nas formas intacta ou com as sub-unidades isoladas não apresentaram efeitos tóxicos, mas polipeptídios ativos obtidos da hidrólise da ricina por tripsina foram capazes de inibir a síntese protéica e o crescimento microbiano de *Escherichia coli* (Hass-Kohn, 1980).

A ricinina é um alcalóide encontrado em todas as partes da planta, podendo ser detectado desde as fases iniciais de desenvolvimento. Seu teor varia em função dos componentes da planta, sendo maior nas folhas; características genéticas; estresses ambientais; e teor de ricina nas sementes, sendo negativamente correlacionado com o teor de ricinina (Severino, 2005). Assim, em razão da baixa atividade tóxica associado à pequena concentração nas sementes a ricinina não é considerado fator limitante para o uso de farelos ou tortas de mamona na alimentação animal (Anandan et al., 2005).

As albuminas 2S compreendem classe distinta de proteínas de reserva amplamente distribuídas em sementes de espécies oleaginosas (Youle et al., 1981). Além da função de reserva de nutrientes para a semente, apresentam atividade inibitória sobre enzimas α -amilase salivar humana e de insetos, propriedades antifúngicas e alergênicas em humanos (Nascimento & Machado, 2006). Para o uso do farelo na alimentação animal, as propriedades alergênicas, até o momento, não representam grande entrave, pois somente se manifestam quando estes compostos são injetados ou absorvidos pela respiração, o que só acontece se houver exposição a grandes quantidades do produto em ambiente pouco ventilado (Bandeira et al., 2004). Todavia, a inativação destes componentes deve ser considerada no processo de eliminação de compostos indesejáveis do farelo de mamona, de forma a garantir a obtenção de um produto seguro ao homem.

Diante do exposto a ricina é considerado o principal fator limitante para o uso dos co-produtos da extração de óleo de sementes de mamona na alimentação animal (Anandan et al., 2005). Os principais sintomas clínicos observados em ruminantes intoxicados por sementes de mamona foram: anorexia, fraqueza muscular, salivação intensa, diarreia, desidratação, midríase, hipotermia, recumbência, elevação dos níveis séricos de nitrogênio-uréico, creatinina, creatina kinase e asparato aminotransferase 24-

30 horas após a ingestão e morte até 3 dias após a ingestão (Armién et al., 1996; Tokarnia & Dobereiner, 1997; Aslani et al., 2007). Todavia, possíveis efeitos de confundimentos sobre as alterações gastrintestinais podem ter ocorrido nos trabalhos que avaliaram somente o efeito de ingestão de sementes de mamona, em razão do seu alto teor de extrato etéreo.

Considerando-se o intenso e contínuo processo de degradação protéica que ocorre no ambiente ruminal, especula-se que parte ou totalidade da ricina presente no farelo de mamona seja inativada pela microbiota ruminal, o que poderia explicar algumas observações de tolerâncias em animais ruminantes alimentados com dietas contendo farelo de mamona ricos em ricina (Albin et al., 1969; Santana et al., 1971). No entanto, ainda não há comprovações desse comportamento.

A utilização de procedimentos adequados para quantificação de ricina é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas e aplicação do farelo de mamona na alimentação animal. Diversos métodos químicos, ensaios biológicos e imunológicos podem ser utilizados de acordo com o objetivo e o material a ser analisado.

Em estudo objetivando definir a técnica mais acurada, conduzidos por Wannemacher Jr. Et al., 1992), comparou-se a detecção de ricina em extrato de sementes de mamona por métodos de diferentes sensibilidades (a sensibilidade é informada entre parênteses): toxicidade em ratos (0,4 ppm), citotoxicidade em células “Vero” (0,01 ppm), ELISA (0,002 ppm), HPLC (5 ppm), eletroforese em gel (20 ppm) e eletroforese capilar de alta performance (25 ppm); cujos resultados obtidos foram: 4,1 ppm pela toxidez de ratos, 4,9 ppm pela citotoxicidade em células “Vero”, 1,3 ppm por ELISA, 9,3 ppm por HPLC, 3,3 ppm por eletroforese em gel e 2,9 ppm por eletroforese capilar. Os autores concluíram que todos os métodos podem ser utilizados para detectar

ricina em um extrato bruto de ricina, mas os resultados obtidos podem ter grande variação (Wannemacher Jr. et al., 1992).

Em pesquisas recentes, as análises de ricina no farelo de mamona utilizou-se eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) (Anandan et al. 2005). Este procedimento apresenta a vantagem econômica e operacional frente aos outros métodos, notadamente ELISA e HPLC, que exigem a utilização de padrões de ricina.

A eletroforese em gel (SDS-PAGE) consiste em ferramenta analítica amplamente utilizada na separação e identificação de proteínas, devido à relativa simplicidade, rapidez e alto valor informativo. O princípio da técnica consiste na separação de frações protéicas de diferentes massas moleculares, previamente carregadas negativamente, mediante migração em campo elétrico desenvolvido em géis de poliacrilamida (Mandarino & Almeida, 2004). A quantificação de proteínas separadas por eletroforese pode ser realizada mediante análise densitométrica das imagens do gel (SDS-PAGE) e dosagem de proteína total (Retamal et al., 1999).

Em razão destas características, a eletroforese em gel (SDS-PAGE) tem sido extensivamente utilizada para avaliações de proteólise e degradação ruminal de grupos específicos de proteínas de alimentos em sistemas *in vitro* ou *in situ*, permitindo ainda estimações dos parâmetros de cinética de proteólise e degradação dos mesmos (Nugent et al., 1983; Spencer et al., 1988; Tanner et al., 1994; Romagnoto et al., 1994; Chiou et al., 1999; Sadeghi & Shawrang, 2008).

Tratamentos que possibilitem transformar o farelo de mamona num produto destoxificado foram estudados, tendo-se obtido alguns resultados, embora não conclusivos, utilizando-se vapor, etanol e hidróxidos (Borchers, 1949; Kodras et al.,

1949; Gardner et al., 1960). No entanto, nesses trabalhos não foram avaliados a viabilidade operacional e econômica do processo de destoxificação.

Na década de 1960, a Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro (SANBRA) desenvolveu processo de destoxificação do farelo de mamona, aplicável em escala industrial, que proporcionou a obtenção de produto considerado seguro para a alimentação animal (Matos, 1976). Este produto, apresentado como “Lex Protéico”, era resultante do aquecimento do farelo de mamona em autoclave especial, com temperatura máxima de processamento de 125 °C e pressão máxima de 2 kg/cm² (Matos, 1976).

Em razão da elevada oferta de “Lex Protéico”, nas décadas de 1960 e 1970 desenvolveram-se diversos trabalhos sobre a utilização do farelo de mamona destoxificado na alimentação de vacas em lactação com produção abaixo de 10 kg/dia de leite (Assis et al., 1962a; Assis et al., 1962b; Robb et al., 1974; Matos, 1976), novilhas leiteiras (Miranda et al., 1961) e de bovinos de corte em confinamento (Marion, 1967; Albin et al., 1968; Albin et al., 1969; Albin et al., 1970). No entanto, observa-se, no presente momento, escasses de pesquisas sobre o uso do farelo de mamona destoxificado na alimentação animal.

Em investigação realizada na Índia comparou-se a eficácia de diferentes métodos físicos (autoclave, cozimento, aquecimento, fervura e embebição) e químicos (tratamento com hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, amônia, cloreto de sódio, formaldeído ou tanino) de destoxificação da ricina do farelo de mamona (Anandan et al., 2005). Dos métodos avaliados, somente o autoclave (15 psi, 60 min) e o tratamento com hidróxido de cálcio (40 g/kg de farelo de mamona) provocaram completa desnaturação da toxina, avaliado mediante análise quantitativa (método de Lowry) e qualitativo (visualização das bandas de proteína em gel de eletroforese).

Nota-se neste trabalho, que os procedimentos de destoxificação com hidróxido de cálcio são operacionalmente simples e com potencial de viabilidade econômica. O hidróxido de cálcio em solução aquosa é misturado ao farelo de mamona na dose de 40 g/kg, base da matéria natural. Após permanecer por uma noite (12-18 horas) para ocorrer o processo de destoxificação o material tratado é seco para posterior armazenamento e utilização (Anandan et al, 2005). Sob o prisma de que o óxido de cálcio em solução se transforma em hidróxido de cálcio, a substituição do hidróxido de cálcio por óxido de cálcio no tratamento alcalino do farelo de mamona pode ser interessante devido ao menor custo e menor poder corrosivo o que reduz riscos de acidentes de trabalho.

Destarte, vislumbra-se o emprego deste processo de destoxificação nas próprias unidades de produção de mamona, ou mesmos nos sistemas de produção de animais ruminantes, com potencial de geração de renda e emprego. Este cenário poderá trazer as seguintes conseqüências: eliminação da desvantagem competitiva do óleo de mamona em relação aos obtido por outras oleaginosas como a soja, algodão, girassol, dendê, que por utilizarem os farelos e tortas na alimentação animal, agregam maior valor nas cadeias produtivas, impactando em preços mais competitivos ao biodiesel (Barros et al., 2006); maior leque de opções em concentrados protéicos na alimentação de ruminantes, permitindo amenizar os danos causados pelas oscilações de preços dos alimentos tradicionalmente utilizados.

No entanto, antes de recomendar os métodos de destoxificação do farelo de mamona para utilização na alimentação de ruminantes, necessita-se de validações sob a ótica da nutrição de ruminantes, contemplando avaliações de consumo, eficiência de utilização de nutrientes e de saúde animal, bem como sobre a eficácia de destoxificação

em razão da variabilidade na concentração de ricina entre cultivares de mamona (Pinkerton et al., 1999)

Sementes de girassol contêm entre 35 a 45% de extrato etéreo e 25 a 30% de casca (Finn et al., 1985; Economides, 1998; NRC, 2001). Durante o processo de extração de óleo obtêm-se co-produtos protéicos com teor de proteína bruta (PB) entre 28 a 50%, base da MS (Anderson, 2002), cujo valor nutritivo depende da cultivar, do processo de extração do óleo e do grau de decorticação (Hesley, 1994; Canibe et al., 1999). A casca da semente de girassol contém baixo teor de PB (5%, base da MS), altos teores de fibra em detergente neutro (73,5%, base da MS) e de lignina (26,5%, base da MS) (Arija et al., 1998). Desta forma, o grau de decorticação apresenta-se como principal fator de variação no valor nutritivo de farelos ou tortas de girassol.

Em diversos estudos caracterizou-se o farelo de girassol (FG) como fonte de alta degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta em relação à fontes tradicionais como o farelo de soja, farelo de algodão e farelo de amendoim (Erasmus et al., 1994, Branco et al., 2006; Rodriguez et al., 2008). No entanto, devido à presença de casca, observou-se menor degradabilidade ruminal da MS do FG em relação ao farelo de soja (Rodrigues et al., 2008). Em pesquisas *in vitro* demonstrou-se que a fração protéica não-degradada no rúmen do FG (29% de PB, base da MS) apresenta alta digestibilidade intestinal verdadeira (Branco et al., 2006). Análises do perfil de aminoácidos essenciais permitiram indicar semelhanças ao farelo de soja, exceto para lisina (menor) e metionina (maior) (NRC, 2001).

Estudos sobre desempenho de vacas em lactação demonstraram viabilidade da inclusão de 11 a 15% de farelo ou torta de girassol, base da matéria seca, em substituição ao farelo de soja e milho grão, mas para animais com produção abaixo de 20 kg/dia (Schingoethe et al., 1977; Silva et al., 2005). Todavia, os mesmos estudos

foram insuficientes para elaborar recomendações de níveis adequados de farelo de girassol em dietas para vacas de maior potencial de produção de leite, como também para avaliar efeito de níveis mais elevados sobre o desempenho produtivo e a eficiência de utilização de nutrientes.

Diante do exposto, desenvolveu-se este trabalho em quatro experimentos com os seguintes objetivos gerais:

Experimento 1

Avaliar o efeito da utilização de 15%, base da MS da dieta, do farelo ou torta de mamona tratado com 40g/kg de Ca(OH)_2 sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes, função hepática, síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e balanço de nitrogênio em ovinos.

Experimento 2

Avaliar o efeito da fermentação ruminal *in vitro* sobre a degradação da ricina, bem como o efeito da desnaturação de proteínas solúveis de mamona sobre o de crescimento microbiano e a concentração média de amônia no meio.

Experimento 3

Avaliar a eficácia de destoxificação da ricina do farelo de mamona por meio tratamento alcalino (hidróxido de cálcio ou óxido de cálcio) ou térmico (autoclave) e seus efeitos sobre a composição química, degradação ruminal *in situ* e digestibilidade intestinal *in vitro* da proteína não-degradada no rúmen.

Experimento 4

Avaliar o efeito de quatro níveis de farelo de girassol (0, 7, 14 e 21%, base da MS) na dieta sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação de alta produção.

Os capítulos desta tese, relativos a cada experimento, estão descritos em forma de artigo técnico-científico, elaborados conforme normas da Revista Brasileira de Zootecnia.

LITERATURA CITADA

- ALBIN, R.C.; HARRAUGH, F.E.; ZINN, D.W. Castor meal of three ricin levels for cattle. **Journal of Animal Science**, v.27, n.1, p.288 (Abstract), 1968.
- ALBIN, R.C.; DAVIS, W.H.; ZINN, D.W. Castor meal for growing-finishing steers. **Journal of Animal Science**, v.28, n.1, p.133 (Abstract), 1969.
- ALBIN, R.C.; OATMAN, S.; ZINN, D.W. Detoxified castor meal for fattening steers. **Journal of Animal Science**, v.30, n.2, p.314 (Abstract), 1970.
- ANANDAN S.; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH J. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal feed science and technology**, v.120, p.159-168, 2005.
- ANDERSON, V. Sunflower Meal in Beef Cattle Diets. Acessado em 11-07-2008. disponível: www.ag.ndsu.nodak.edu/carringt/livestock/Beef%20Report%2002/sunflower%20meal.htm.
- ANTHONISEN, D.D.; SCHIRMER, M.; SILVA, S.D.A. et al. Teor de óleo de sementes de mamona de variedades introduzidas na zona sul do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 2., 2006. Aracajú. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão. [2006] (CD-Rom).
- ARIJA, I.; BRENES, A.; VIVEROS, A. et al. Effects of inclusion of full-fat sunflower kernels and hulls in diets for growing broiler chickens. **Animal Feed Science Technology**, v.70, p.137-149, 1998.
- ARMIÉN, A.G.; D'ANGELIS, F.H.F.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental pelas sementes de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.4, p.99-106, 1996.

- ASLANI, M.R.; MALEKI, M.; MOHRI, M. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, v.49, n.1, p.400-406, 2007.
- ASSIS, F.P.; NAUFEL, F.; ROCHA, G.L. et al. Emprego do farelo de torta de mamona atoxicada em rações para vacas leiteiras. **Boletim da Indústria Animal**, v.20, n.1, p.39-35, 1962a.
- ASSIS, F.P.; NAUFEL, F.; TUNDISI, A.G.A. et al. Valor do farelo de torta de mamona atoxicada em rações para vacas leiteiras, em comparação com os farelos de torta de algodão e de amendoim. **Boletim da Indústria Animal**, v.20, n.1, p.35-38, 1962b.
- AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M. et al. Ricin poisoning: A comprehensive review. **The Journal of the American Medical Association**, v.294, n.9, p.2342-2351, 2005.
- BANDEIRA, D.A.; CARTACHO, W.V.; SEVERINO, L.S. et al. Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. In: I Congresso Brasileiro de Mamona, 2004. **Anais ...** Campina Grande. Disponível em: www.cnpa.embrapa.br.
- OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v.249, p. 627-631, 1974.
- BARROS, G.S.C.; SILVA, A.P.; PONCHIO, L.A. et al. Custos de produção de biodiesel no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Ano 15, n.3, p.36-50, 2006
- BORCHERS, R. Castor bean meal. Part 1: Destruction of the toxic factor. **Poultry Science**, v.28, p.568-570, 1949.
- BRANCO, A.F.; CONEGLIAN, S.M.; MAIA, F.S. et al. Digestibilidade intestinal verdadeira da proteína de alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1788-1795, 2006 (supl.)
- CANIBE, N.; PEDROSA, M.M.; ROBREDO, L.M. et al. Chemical composition, digestibility and protein quality of 12 sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1775-1782, 1999.
- CHIOU, P.W.S; WU, B.Y.S.S. Protein sub-fractions and amino acid profiles of rumen-undegradable protein in dairy cows from soybean, cottonseed and fish meals. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, p.65-80, 1999.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2008, disponível em www.conab.gov.br.

- ECONOMIDES, S. The nutritive value of sunflower meal and its effect on replacement cereal straw in the diets of lactating ewes and goats. **Livestock Production Science**, v.55, p.89-97, 1998.
- ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M. et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.12, p.5908-5912, 1987.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.17, p.8128-8130, 1987.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of Ricin A-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.18, p.8735-8739, 1988.
- ERASMUS, L.J.; BOTHA, P. M.; CRUYWAGEN, C. W. et al. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.541-551, 1994.
- EVANGELISTA, A.R.; ABREU, J.G.; PERON, A.J. Avaliação da composição química de tortas de mamona e amendoim obtidas por diferentes métodos de extração de óleo. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 1., 2004. Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão. [2004] (CD-Rom).
- FERREIRA, G.B.; BELTRÃO, N.E.N.; SEVERINO, L.S. et al. **A cultura da mamona no cerrado: riscos e oportunidades**. Embrapa Algodão: Campina Grande, 70p., 2006 (Documentos, 149).
- FINN, A. M.; CLARK, A. K.; DRACKLEY, J. K. et al. Whole rolled sunflower seeds with or without additional limestone in lactating dairy cattle rations. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.903-913, 1985.
- GAILLARD, Y.; PEPIN, G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by higher-performance liquid chromatography- (tandem) mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.733, p.181-229, 1999.
- GALLUP, W.D.; BRIGGS, H.M.; HATFIELD, E.E. The comparative value of hydraulic expeller and solvent processed oil meals for ruminants. **Journal of Animal Science**, v.9, p.194-200, 1950.

- GARDNER JR., H.K.; D'AQUIN, E.L.; KOULTUN, S.P. et al. Detoxification and deallergenization of Castor Beans. **The Journal of the American Oil Chemists Society**. v.37, p.142-148, 1960.
- HAAS-KOHN, L.J.G.; LUGNIER, A.A.J.; TIBONI, O. et al. Inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis by a limited tryptic digest of ricin, the toxin of *Ricinus communis* L. seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.97, n.3, p. 962-967, 1980.
- HAYWARD, J.W. The nutritive value of soybean oil meal prepared by the different methods of oil extraction. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.14, n.12, 1937.
- KODRAS R.C.K.; WHITEHAIR, R.M. Studies on the detoxification of castor seed pomace. **Journal of the American Oil Chemistry Society**. v.26, p.641-644, 1949.
- MANDARINO, J. M. G.; ALMEIDA, A. M. R. Técnicas eletroforéticas. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.. (Org.). **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em fitovirologia**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia/Embrapa Soja, 2001, p.151-172.
- MARION, P.T. Castor meal – a new protein supplement. **Journal of Animal Science**, v.26, n.4, p.924 (Abstract), 1967.
- MATOS, L.L. **Substituição do farelo de algodão pelo farelo de mamona destoxicado, na alimentação suplementar de vacas em lactação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Viçosa: UFV, 1976. 39p.
- MIRANDA, R.M.; BARREIRA, H.A.; FARIA, E.V. et al. O farelo de mamona destoxicado na alimentação de novilhas leiteiras. Rio de Janeiro, **Instituto de Zootecnia, Publicação 41**, 1961, 12p.
- MOREIRA, J.F.C., RODRÍGUEZ, N.M.; FERNANDES, P.C.C. et al. Concentrados protéicos para bovinos. 1. Digestibilidade in situ da matéria seca e da proteína bruta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, p.315-323, 2003.
- NASCIMENTO, V.V.; MACHADO, O.L.T. Albuminas 2S de mamona apresentam funções de reserva e defesa. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 2., 2006. Aracajú. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão. [2006] (CD-Rom).
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.

- NUGENT, J.H.A.; JONES, W.T.; JORDAN, D.J. Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein Fraction I (18S) leaf protein bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. **British Journal of Nutrition**, v.50, n.2, p.357-368, 1983.
- OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v.249, p. 627-631, 1974.
- PINKERTON, S.D.; ROLFE, R.; AULD, D.L. et al. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, v.39, p.353-357, 1999.
- PIERCE, RM. Sunflower processing techniques. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.47, n.7, p.248-269, 1970.
- RETAMAL, C.A.; THIEBAUT, P.; ALVES, E.W. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. **Analytical Biochemistry**, v.268, p.15-20, 1999.
- ROBB, J.G.; LABEN; R.C; WALKER JR, H.G. et al. Castor meal in dairy rations. **Journal of Dairy Science**. v.47, n.4, p.443-450, 1974.
- RODRÍGUEZ, C.A.; GONZÁLEZ, J.; ALVIR, M.R. Effects of feed intake on in situ rumen microbial contamination and degradation of feeds. **Livestock Science**, v.116, p.108-117, 2008.
- ROMAGNOLO, D.C.; POLAN, C.E.; BARBEAU, W.E. Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1093-1099, 1994.
- SADEGHI, A.A.; SHAWRANG, P. Effects of microwave irradiation on ruminal dry matter, protein and starch degradation characteristics of barley grain. **Animal Feed Science and Technology**, v.141, p.184-194. 2008.
- SANTANA, O.P.; CALDAS, G.C.; ARAÚJO, P.E.S. Resposta comparativa de bovinos jovens em confinamento, ao farelo de mamona adubo e lex protéico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 8., 1971, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1971, p.144-145.
- SCHINGOETHE, D.J.; ROOK, J.A.; LUDENS, F. Evaluation of sunflower meal as a protein supplement for lactating cow. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.591, 1977.
- SEVERINO, L.S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. (Embrapa Algodão. Documentos, 134), 2005, 31p.

- SILVA, Z.F.; OLIVEIRA, M.D.S; BARBOSA, J.C. Substituição parcial do farelo de soja e do milho por teores crescentes de torta de girassol em concentrados isoprotéicos para vacas em lactação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., Goiânia, 2005 **Anais....** SBZ. 2005. (CD-ROM).
- SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V.; FREER, M. et al. Monitoring the fate of dietary proteins in rumen fluid using gel eletrophoresis. **British Journal of Nutrition**, v.60, p.241-247, 1988.
- TANNER, G.J.; MOORES, A.E.; LARKIN, P.J. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora in vitro. **British Journal of Nutrition**, v.71, n.6, p.947-958, 1994.
- TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. Imunidade cruzada pelas sementes de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p.25-35, 1997.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.
- WANNEMACHER Jr., R.W.; HEWETSON, J.F.; LEMLEY, M.A. et al. Comparison of detection of ricin in castor bean extracts by biosassays, immunoassays, ad chemical procedures. **Toxicon**, v.30, n.5-6, p.562, 1992.
- YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. **American Journal of Botany**, v.68, n.1, p.44-48, 1981.

Eficiência de utilização de nutrientes e função hepática de ovinos alimentados com dietas contendo farelo ou torta de mamona tratado com hidróxido de cálcio

RESUMO – Objetivou-se avaliar o farelo (FM) ou torta de mamona (TM) tratado ou não com 40g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$ sobre o consumo e digestibilidade, função hepática, síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e balanço de nitrogênio em ovinos. Utilizou-se 19 ovinos sem raça definida com peso inicial médio de 56 kg, mantidos em gaiolas de metabolismo por 21 dias, sendo 16 dias de adaptação e cinco dias de coleta. Os animais foram distribuídos em cinco tratamentos referentes à fonte protéica, em 15% da matéria seca (MS) da dieta: farelo de soja, FM, FM tratado com Ca(OH)_2 (FMT), TM e TM tratado com Ca(OH)_2 (TMT), os quais foram arranjados num fatorial $2 \times 2 + 1$ (com fator adicional). O tratamento com Ca(OH)_2 reduziu em 62,1 e 64,8% o teor de ricina do FM (773 mg/kg de MS) e da TM (799 mg/kg de MS). O consumo médio diário de ricina reduziu ($P < 0,10$) com o tratamento alcalino, em média de 2,43 para 0,96 g/kg de peso corporal. Não foram observados sintomas clínicos de intoxicação por ricina e os níveis séricos de enzimas relacionados com função hepática não se alteraram, estando dentro do padrão normal da espécie. Não houve efeitos entre mamona e soja, de interações entre fonte e tratamento com Ca(OH)_2 e de fonte de mamona sobre os consumos de MS e componentes da dieta, exceto para os consumos de extrato etéreo (EE), maior ($P < 0,10$) para a TM, e de carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinza e proteína (CNFcp), maior ($P < 0,10$) para dieta com FS. Porém, o tratamento do FM e TM com Ca(OH)_2 aumentou ($P < 0,10$) o consumo de MS, proteína bruta e CNFcp. Não houve efeito no coeficiente de digestibilidade (CD) da dieta entre mamona e soja (exceto para CDEE, maior ($P < 0,10$) para TM), de interação entre fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 e de fonte de mamona (exceto para CDEE, maior ($P < 0,10$) para TM). O tratamento alcalino aumentou ($P < 0,10$) o CD de todos os componentes (exceto CDCNFcp). A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e a eficiência de utilização dos substratos energéticos e nitrogenados (ECNi) da dieta aumentaram ($P < 0,10$) apenas com Ca(OH)_2 . Apesar da excreção urinária de N-uréia ter aumentado com o Ca(OH)_2 , a maior ($P < 0,10$) ECNi reduziu ($P < 0,10$) as perda de N fecal, aumentando-se em 21,3% a retenção de N. O tratamento do FM ou TM com 40g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$, base da matéria natural, apesar de não desnaturar completamente a ricina, amplia a eficiência de utilização dos componentes energéticos e nitrogenados em dietas para ovinos.

Palavras-chave: biodiesel, co-produtos, destoxificação, ricina, *Ricinus communis* L.

Nutrients utilization efficiency and hepatic function of sheep fed with diets containing solvent or expeller castor seed meal treated with calcium hydroxide

ABSTRACT – It is proposed to evaluate the use of solvent (SCM) or expeller castor seed meal (ECM) treated or not with 40 g.kg⁻¹ of Ca(OH)₂ on intake and digestibility, hepatic function, rumen microbial nitrogen synthesis and nitrogen balance in sheep. Nineteen sheep, with 56 kg average initial weight were used, kept in metabolic cages for 21 days, being 16 days for adaptation and five days of collection. The animals were distributed in five treatments, relative to the protein source, in 15% in dieta (basis DM): soybean meal (SM); SCM, SCM treated with Ca(OH)₂ (SCMT), ECM and ECM treated with Ca(OH)₂ (ECMT), which were arranged in a 2x2+1 factorial (with additional factor). The treatment with Ca(OH)₂ reduced in 62.1 and 64.8% the SCM ricin content (773 mg.kg⁻¹ of DM) and of ECM (799 mg.kg⁻¹ of DM). The ricin daily average intake reduced (P<0.10) with alkaline treatment, from the average 2.43 to 0.96 g.kg⁻¹ of body weight. No ricin intoxication clinical symptoms were observed and serum levels of enzymes related to hepatic function were not altered, being within the species normal pattern. There was no effect between castor seed meal and soybean meal, interactions between castor seed source and treatment with Ca(OH)₂ and, castor seed meal source on DM and components the diet intake, except for intakes of ether extract (EE) greater (P<0.10) for ECM, and non-fibrous carbohydrates (NFC) and NFC correctec for ash and protein (NFCap), greater (P<0.10) for the diet with SM. However, the Ca(OH)₂ treatment of castor seed meal SCM and ECM increased (P<0.10) the DM, CP and NFCap intakes. There was no effect in digestibility coefficient between castor seed meal and soybean meal (except for EEDC, greater (P<0.10) for ECM), interaction between castor seed meal source and Ca(OH)₂ treatment, and castor seed meal source (except for EEDC, greater (P<0.10) for ECM). The alkaline treatment increased (P<0.10) all components digestibility coefficient (except TCDC and NFCDC). Microbial protein synthesis and diet energetic and nitrogen substrates utilization efficiency (NUEi) increased (P<0.10) only with Ca(OH)₂ treatment. Despite the N-urea urinary excretion had increased with Ca(OH)₂, the greater (P<0.10) NUEi reduced (P<0.10) fecal N loss, increasing N retention in 21.3%. Treatment of solvent or expeller castor seed meal with 40g of Ca(OH)₂/kg, based on natural matter, although not completely desnaturation the ricin, improvement the efficiency of utilization of energy and nitrogen components in diets for sheep.

Key Words: biodiesel, co-productes, detoxification, ricin, *Ricinus communis* L.

Introdução

A expectativa de crescimento da participação de biodiesel na matriz energética mundial, criou oportunidades para a produção de ruminantes pela possibilidade de utilização de co-produtos resultantes do processo de extração do óleo de sementes de oleaginosas. Dentre as culturas disponíveis, a mamona (*Ricinus communis* L.) se destaca pelo potencial de exploração em regiões marginalizadas do processo de desenvolvimento econômico e pela maior intensidade no uso de mão-de-obra.

Apesar do potencial de utilização na alimentação de ruminantes (Miranda et al., 1961; Albin et al., 1969; Santana et al., 1971; Robb et al., 1974; Matos, 1976), o farelo ou a torta de mamona têm sido utilizados exclusivamente como fertilizantes orgânicos, devido à presença de uma potente toxina (ricina) o que reduz a competitividade em relação às outras oleaginosas (Severino, 2005).

A ricina é uma proteína encontrada principalmente no endosperma de sementes de mamona e inativa irreversivelmente ribossomos eucarióticos, inibindo a síntese protéica (Olsnes et al., 1974; Endo & Tsurugi, 1988). É composta por duas subunidades de funções biológicas distintas. A subunidade A (36 kDa) inativa especificamente e irreversivelmente os ribossomos eucarióticos, impedindo a síntese protéica. Já a subunidade B (29 kDa) encontra-se ligada à membrana celular e à subunidade A, e permite a entrada desta por endocitose para o citosol (Olsnes, et al., 1974; Endo & Tsurugi, 1988).

Apesar de em estudos com bovinos de corte confinados, por períodos acima de 100 dias, não se ter observado efeitos tóxicos e sobre o desempenho dos animais recebendo dietas contendo farelo de mamona com alto teor de ricina (Albin et al., 1969; Santana et al., 1971), ingestões entre 2,5 a 6 g de sementes esmagadas de mamona/kg de

peso corporal são reconhecidas como tóxicas para ruminantes (Armién et al., 1996; Tokarnia & Dobereiner, 1997; Aslani et al., 2007).

Os principais sintomas clínicos observados em ovinos intoxicados por sementes de mamona foram: anorexia, fraqueza muscular, salivação, diarreia, desidratação, midríase, hipotermia, recumbência, elevação dos níveis séricos de nitrogênio-uréico, creatinina, creatina kinase e aspartato aminotransferase 24 a 30 horas após a ingestão, e morte até 3 dias após a ingestão (Armién et al., 1996; Aslani et al., 2007).

Apesar dos resultados inconsistentes sobre intoxicação por ricina em ruminantes, destoxificações dos co-produtos de sementes de mamona foram recomendados para viabilizar seu uso na alimentação animal (Severino, 2005). Embora alguns métodos de destoxificação sejam conhecidos desde o final da década de 1940 (Borchers, 1949; Kodras et al., 1949; Gardner et al., 1960) somente recentemente foi desenvolvido trabalho mais conclusivo, em que somente o uso de autoclave (15 psi, 60 min) ou o tratamento com hidróxido de cálcio (40g/kg de farelo de mamona) provocaram completa desnaturação da toxina (Anandan et al., 2005).

É interessante que os procedimentos de destoxificação com hidróxido de cálcio são operacionalmente simples e com potencial de viabilidade econômica. No entanto, antes de recomendar seu uso para alimentação animal há necessidade de estudos de validação, contemplando-se avaliação de indicadores de eficiência nutricional e de saúde animal relacionados com intoxicação clínica por ricina.

Desta forma, desenvolveu-se este trabalho com objetivo de avaliar o efeito da utilização de 15%, base da matéria seca da dieta, do farelo ou torta de mamona, tratado ou não com 40 g/kg de Ca(OH)_2 , sobre o consumo e digestibilidade, função hepática, síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e balanço de nitrogênio em ovinos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), entre dezembro de 2005 e janeiro de 2006. Foram utilizados 19 ovinos machos castrados, sem raça definida, com peso médio inicial de 56 ± 8 kg, mantidos em gaiolas de metabolismo por um período de 21 dias, sendo 16 dias de adaptação e cinco dias de coleta, durante os quais se registraram o consumo de alimentos e realizadas coleta total de fezes e urina e amostra em sangue.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e adotado-se o peso inicial dos animais como covariável. Foram utilizados cinco tratamentos referentes à fonte protéica: farelo de soja - controle (FS), farelo de mamona (FM), farelo de mamona tratado com Ca(OH)_2 (FMT), torta de mamona (TM) e torta de mamona tratado com Ca(OH)_2 (TMT), os quais foram arranjos num fatorial $2 \times 2 + 1$.

O farelo e torta de mamona foram adquiridos de agroindústrias localizadas na região metropolitana de Salvador-BA e no Norte de Minas Gerais, respectivamente. O farelo de mamona foi obtido após a extração do óleo de sementes de mamona utilizando-se solventes orgânicos, enquanto a torta de mamona foi obtida por extração do tipo *expeller*. Ambos os co-produtos foram comercializados exclusivamente como fertilizantes orgânicos e, segundo os fabricantes, impróprios para a alimentação animal.

O tratamento do farelo e torta mamona foi realizado utilizando solução de Ca(OH)_2 (1 kg para 10 litros de água), na quantidade de 40 gramas de Ca(OH)_2 / kg de farelo ou torta, na base da matéria natural, conforme descrito por Anandan et al. (2005). Após a mistura do farelo ou torta com a solução de Ca(OH)_2 (pH acima de 12), o material permaneceu por um período de 12 a 18 horas (uma noite), sendo logo após seco por 5 horas à 60°C . Utilizou-se como fonte de Ca(OH)_2 cal hidratada destinada à

construção civil e, segundo o fabricante, contendo mínimo de 88% de óxidos totais (ICAL).

As dietas foram isonitrogenadas (14,5% de proteína bruta, na base da matéria seca), fornecidas uma vez ao dia, às 08 horas, permitindo-se sobras de 5 a 10% (base da matéria natural). A mistura uréia:sulfato de amônio (9:1) foi utilizada para ajustar o teor de proteína bruta da dieta em razão das diferenças entre os alimentos protéicos utilizados. A proporção dos ingredientes da dieta está apresentada na Tabela 1. Mistura mineral foi fornecida à vontade aos animais em cochos separados.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes das dietas experimentais, em porcentagem na matéria seca

Ingredientes	Dietas ²				
	FS	FM	FMT	TM	TMT
Silagem de milho	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
Milho	25,00	24,39	24,39	24,02	24,02
Farelo de soja (FS)	15,00				
Farelo de mamona (FM)		15,00			
Farelo de mamona tratado (FMT)			15,00		
Torta de mamona (TM)				15,00	
Torta de mamona tratado (TMT)					15,00
Uréia/sulfato de amônio ¹		0,61	0,61	0,98	0,98

¹ relação de 9:1. ²FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de Ca(OH)₂/kg.

A coleta total de fezes foi realizada utilizando bolsas coletoras de couro adaptadas aos animais do 17º ao 21º dia do experimento. Após a coleta e pesagem das fezes, realizadas sempre às 08:00 e 17:00 h, foram retiradas amostras equivalentes a 5% do peso total excretado, congeladas à -20°C para posterior secagem e análise química.

As amostras de silagens de milho e de fezes foram secas em estufa com ventilação forçada e, juntamente com as dos demais alimentos, foram processadas em

moinho de faca com peneira de 1 mm para análise química. Alíquotas de amostras secas dos alimentos foram moídas com peneira de 2 mm para incubação ruminal *in situ*. Após a secagem das amostras diárias de fezes, de cada animal, foram feitas amostras compostas para posterior análise química.

As análises dos teores de MS, proteína bruta (nitrogênio total x 6,25), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (H₂SO₄ 72% p/p) foram realizadas segundo métodos descritos em Silva & Queiroz (2002). A quantificação de cutina foi realizada mediante hidrólise do resíduo de FDA com H₂SO₄ 72% p/p, seguido de oxidação do resíduo da hidrólise com KMnO₄ e queima em mulfla à 550°C, segundo descrito por Van Soest (1994). Para análise da concentração de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com alfa amilase termo-estáveis sem uso de sulfito de sódio, corrigidas para o resíduo de cinzas (Mertens, 2002) e para o resíduo de compostos nitrogenados (Licitra et al., 1996). As análises de FDN e FDA foram realizadas em sistema Ankon[®], utilizando sacos de TNT (tecido-não-tecido), com dimensões de 5cm x 5cm, mantendo-se relações média de 14 mg de MS /cm² de tecido e 100 mL de detergente neutro/g de amostra seca ao ar. A quantificação de nitrogênio não protéico (NNP) dos alimentos foi realizada segundo Licitra et al. (1996).

A solução mineral para determinação dos macroelementos minerais dos alimentos foi preparada por via úmida, mediante digestão nitro-perclórica, conforme descrito em Silva & Queiroz (2002). Após as diluições, o teor de P foi determinado por colorimetria, os de Ca e Mg em espectrofotômetro de absorção atômica, e os de Na e K em espectrofotômetro de chama.

Os teores de carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (CNF_{cp}) foram calculados conforme proposto por Hall (2000) adaptado, sendo: $CNF_{cp} = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \%uréia) + \%FDN_{cp} + \%EE + \%Cinzas]$. Os nutrientes

digestíveis totais (NDT) foram calculados com adaptações ao descrito por Weiss (1999), pela seguinte equação: $NDT (\%) = PBD + FDN_{cpD} + CNF_{cpD} + 2,25EED$, em que: PBD = proteína bruta digestível; FDN_{cpD} = fibra em detergente neutro digestível; CNF_{cpD} = carboidratos não-fibrosos digestíveis; e EED = extrato etéreo digestível. A composição química dos alimentos utilizados está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química dos alimentos

Itens ¹	Alimentos ³						
	SM	Milho	FS	FM	FMT	TM	TMT
MS (%)	33,04	85,36	87,12	88,09	89,44	89,00	86,28
MO ²	94,26	97,87	92,56	90,18	85,77	93,08	88,37
PB ²	7,89	9,13	51,52	37,32	37,83	33,70	34,03
NNP ³	69,19	19,12	15,03	22,27	23,25	29,61	30,20
NIDN ³	17,87	6,46	8,11	17,60	28,95	12,49	18,90
NIDA ³	7,98	9,64	3,86	4,85	5,52	6,77	6,94
EE ²	2,77	3,60	0,99	3,14	2,00	7,98	5,48
FDN ²	52,59	10,62	18,39	55,80	56,70	55,15	56,41
FDN_{cpD} ²	50,72	9,96	13,95	46,50	41,33	48,30	45,51
CNF_{cpD} ²	32,88	75,18	26,10	3,22	4,61	3,10	3,35
FDA ²	24,67	3,18	7,77	41,12	38,02	43,89	43,34
Lignina ²	3,64	0,94	0,77	4,52	3,97	4,29	3,86
Lignina/ FDN_{cpD}	7,18	9,40	5,50	9,71	9,62	8,87	8,48
Cutina ²	0,25	0,05	0,09	25,26	24,94	27,39	26,48
Cutina/ FDN_{cpD}	0,50	0,49	0,66	54,33	60,34	56,70	58,19
Ca ²	0,19	0,04	0,22	0,78	1,95	0,72	2,14
P ²	0,24	0,19	0,64	0,68	0,65	0,84	0,80
K ²	1,01	0,36	2,39	0,96	0,86	1,11	0,97
Na ²	0,05	0,06	0,07	0,04	0,06	0,05	0,07
Mg ²	0,17	0,09	0,29	0,43	0,38	0,53	0,44

¹MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; NNP = nitrogênio não-protéico; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDN_{cpD} = fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína; CNF_{cpD} = carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína; FDA = fibra em detergente ácido (FDA).

²% base da MS; ³% do nitrogênio total.

³SM = silagem de milho, FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de $Ca(OH)_2/kg$; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de $Ca(OH)_2/kg$.

Amostras de sangue foram obtidas no 21º dia, 4 horas após a alimentação matinal, por punção da veia jugular, utilizando-se frasco contendo acelerador de coagulação. Após a coleta, o material foi centrifugado a 2.300 x g por 15 minutos e o soro resultante congelado a -20°C para posterior análise dos níveis séricos de uréia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransfase (ALT). Amostras de soro foram enviadas para laboratório comercial de análise clínica humana para quantificação dos níveis séricos de AST e ALT, utilizando-se o método cinético otimizado ultra-violeta.

As amostras de urina foram obtidas em 16 animais a partir de coleta total de urina em recipientes (baldes) no piso, contendo 100 mL de solução de ácido sulfúrico a 20% v/v, durante 72 horas, do 19º ao 21º dia do experimento. Utilizaram-se três repetições para cada tratamento, exceto o tratamento com FMT, com quatro repetições. Após o período de 24 horas, determinou-se o volume total excretado, sendo as amostras homogeneizadas e, em seguida, retiradas alíquotas de 10 mL de urina adicionadas com 40 mL de ácido sulfúrico 0,072N, congeladas à -20°C para posterior análise de nitrogênio total, uréia, alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina.

As análises de uréia nas amostras de urina e de soro foram realizadas por meio de sistema enzimático-colorimétrico pelo método urease, utilizando-se *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.). A análise de ácido úrico na urina foi realizada por meio do método enzimático-Trinder, utilizando-se *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.) O N-uréico foi obtido multiplicando-se o teor de uréia por 0,466. As análises de alantoína na urina diluída foram realizadas pelo método colorimétrico, enquanto as análises de xantina e hipoxantina pelo método enzimático, ambos descrito em Chen & Gomes (1992).

As purinas microbianas absorvidas (PA, mmol/dia) foram calculadas a partir das excreções dos derivados de purinas (\hat{Y} , mmol/dia), utilizando-se a fórmula $\hat{Y} = 0,84 *$

$PA + 0,150 * PV^{0,75} e^{0,25 * PA}$, utilizando o método iterativo Newton-Raphson, onde 0,84 é a recuperação das purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e $0,150 * PV^{0,75} e^{0,25 * PA}$ a excreção endógena de derivados de purinas na urina (Chen & Gomes, 1992).

A síntese ruminal de compostos nitrogenados microbianos (Nmic, gN/dia) foi calculada em função das purinas microbianas absorvidas (PA, mmol/dia), utilizando-se a equação $Nmic = (70 * PA)/(0,83 * 0,116 * 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 a digestibilidade intestinal das purinas microbianas e 0,116 a relação N-purina:N-total nas bactérias (Chen & Gomes, 1992).

O teor de proteína degradada no rúmen das dietas foi calculado utilizando-se a fração efetivamente degradada quantificada para cada um dos ingredientes dietéticos, conforme descrição a seguir: utilizaram-se sacos de poliéster medindo 20x10 cm, com porosidade de 60 μ , onde se adicionaram 6 g de amostra seca ao ar de silagem de milho, milho grão moído, FS, FM, FMT, TM e TMT. Os tempos de incubação utilizados para avaliação da cinética de degradação da PB foram de 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas. Para análise da cinética de degradação ruminal da FDN utilizou-se os tempos de 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 e 240 horas. Utilizou-se esquema de incubação seqüencial e remoção simultânea. As amostras foram incubadas em duplicata no rúmen de uma vaca leiteira em lactação, 550 kg de peso corporal e produção de leite próxima a 20 kg/dia, por intermédio de fistula ruminal. Foi fornecido ao animal silagem de milho à vontade e ração concentrada (contendo milho grão moído, farelo de soja, farelo de trigo e uréia) na quantidade de com 1 kg para cada 3 kg de leite produzido, base da matéria natural. Decorrido o tempo de incubação, os sacos foram lavados em água corrente e levados à estufa com ventilação forçada (65°C) por 72 horas, sendo posteriormente avaliados os teores de MS, PB e FDN dos resíduos de incubação.

Os parâmetros da dinâmica de degradação da PB foram estimados utilizando o modelo de crescimento assintótico de primeira ordem reparametrizado por Ørskov & McDonald (1979) descrito pela função: $Y_t = a + b * (1 - e^{-kd*t})$; em que: Y_t = fração degradada no tempo “t” (%); a = fração solúvel (%); b = fração insolúvel potencialmente degradável (%); kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); e t = variável independente tempo (h). Os parâmetros da dinâmica de degradação da FDN foram estimados utilizando o modelo apresentado por Mertens & Loften (1980), descrito pela função: $Y_t = b * e^{(-kd*(t-L))} + I$; em que: Y_t = resíduo não degradado no tempo “t” (%); b = fração potencialmente degradável da FDN (%); kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); e t = variável independente tempo (h); L = latência discreta (h); I = fração indegradável da FDN (%). A degradação ruminal efetiva (DE) da PB e FDN foram calculadas pelo modelo: $DE = a + b*[kd/(kd+kp)]$; em que: a = fração solúvel, aplicável apenas à PB; kp = taxa de passagem do alimento pelo rúmen (h^{-1}).

A taxa de passagem (kp) foi calculada de acordo com Cannas et al. (2004), utilizando-se as equações: kp para silagem de milho = $1.82 * CFDN^{0.40} * e^{(0.046 * \%PB)}$, em que CFDN = consumo diário de FDN da dieta, expresso em % do peso corporal, %PB = teor de proteína bruta da dieta em % da MS; Kp para os alimentos concentrados = $1,572 * Kp$ da silagem de milho – 0,925. O consumo de proteína bruta degradada no rúmen foi calculado pelo produto do consumo de MS e o teor de PDR da dieta.

Como indicadores de eficiência de utilização de compostos nitrogenados (N) foram utilizados a eficiência de conversão do N ingerido em N microbiano ruminal (ECNi) e a eficiência de conversão do N dietético disponível no rúmen em N microbiano ruminal (ECNd), a partir das seguintes equações; ECNi = síntese de N microbiano ruminal (g/dia) / consumo de N total (g/dia); ECNd = síntese de N microbiano ruminal (g/dia) / consumo de N degradados no rúmen (g/dia).

A avaliação da concentração de ricina no FM, FMT, TM e TMT foi realizada através da separação das frações A (36 kDa) e B (29 kDa) por eletroforese em gel de 15% de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE), de acordo com o método proposto por Laemmli (1970) e por análise densitométrica.

Inicialmente, 250 mg de farelo ou torta de mamona foram colocados em tubos “eppendorf” de 2 mL, adicionando-se 1 mL de tampão de extração TRIS 0,5 M (pH 3,8 ajustado com ácido sulfúrico 37%) e centrifugados a 9.739 xg durante 20 minutos. Retirou-se o sobrenadante, adicionou em outro tubo “eppendorf” o qual foi armazenado entre 2 a 6°C para análise imediata, sendo este denominado de extrato bruto protéico.

Para realizar a corrida eletroforética, foram retirados alíquotas de 30 µL do extrato bruto protéico, colocados em tubos “eppendorf” e adicionado 10 µL de tampão de amostra (4X), contendo solução tampão Tris HCL 60 mM pH 6,8 (10% de glicerol, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,025% de azul de bromofenol e 0,025% de B-mercaptoetanol). Em seguida submeteu-se o material à temperatura de 100°C por 5 minutos a sendo então aplicado 20 µL desta mistura em cada poço do gel. A corrida eletroforética foi inicialmente conduzida a 50 Volts, até a banda do corante atingir a superfície do gel de separação, quando foi aumentada para 140 Volts, permanecendo assim até o final da corrida, definido quando o corante se aproximou da extremidade inferior do gel. Terminada a corrida, os géis foram retirados da placa e colocados em solução corante (1,5 g de Coomassie Brilliant Blue G, 90 mL de ácido acético glacial, 450 mL de metanol e 460 mL de água deionizada) por 24 horas e logo depois em solução descorante (100 mL de ácido acético glacial, 500 mL de metanol e 400 mL de água deionizada) por 12 horas. Os géis foram então scaneados, sendo as imagens utilizadas para análise de densitometria. A identificação das frações de ricina foi

realizada utilizando-se marcadores de massa molecular entre 14 a 66 KDa (Sigma, USA).

Outra alíquota do extrato bruto protéico foi retirada para avaliação de proteína total utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A análise de densitometria dos géis foi realizada nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, obtendo-se as áreas totais e aquelas correspondentes às frações da ricina, segundo procedimentos descritos por Retamal et al. (1999). O teor de ricina no FM ou TM foi estimado conforme a equação: teor de ricina (mg/kg de MS) = $[(V_1 \times \text{PTN total}) * (\text{área ricina}/\text{área total})] / \text{peso da MS da amostra em contato com a solução tampão de extração (gramas)] * 1.000$, em que: V_1 = volume utilizado da solução tampão de extração (1 mL); PTN total = concentração de proteína total no extrato bruto (mg/mL); área ricina = área correspondente às frações A e B da ricina presente no extrato bruto, obtida por análise densitométrica; área total = área total de proteínas presentes no extrato bruto obtida por análise densitométrica.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1989), utilizando nível crítico de 10% de probabilidade para o erro tipo I. As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \beta(X_{ij} - \bar{X}) + e_{ij}, \text{ sendo:}$$

Y_{ij} = observação no animal i, submetido ao tratamento j;

μ = constante geral;

T_j = efeito do tratamento i, sendo $i = 1, 2, 3, 4, 5$;

β = relação funcional para a covariância;

X_{ij} = valor observado para a covariável peso corporal inicial do animal i submetido ao tratamento j;

\bar{X} = valor médio para a covariável peso corporal inicial.

e_{ij} = aleatório, associado a cada observação, pressuposto NID $(0; \sigma^2)$.

Foram aplicados quatro contrastes ortogonais: controle - C (FS vs. FM + FMT + TM + TMT); fonte de mamona - F (FM + FMT vs. TM + TMT); tratamento da mamona com hidróxido de cálcio - H (FM + TM vs. FMT + TMT) e interação fonte de mamona e tratamento com hidróxido de cálcio - F x H (FM + TMT vs TM + FMT).

Resultados e Discussão

A composição química das dietas experimentais está apresentada na Tabela 3. A principal modificação química observada com a substituição do farelo de soja (FS) pelo FM ou TM ocorreu sobre a composição dos carboidratos, com aumento da fração insolúvel em detergente neutro (FDN), bem como aumento da participação de cutina na FDN.

Tabela 3 – Composição química das dietas experimentais

Itens ¹	Dietas ⁴				
	FS	FM	FMT	TM	TMT
MS (%)	54,23	54,47	54,67	54,66	54,25
MO ²	94,91	94,56	93,90	95,01	94,30
PB ²	14,74	14,18	14,25	14,58	14,63
NNP ³	33,05	34,91	35,23	35,61	35,80
NIDN ³	10,99	13,94	18,47	11,11	13,35
NIDA ³	6,08	6,10	6,36	6,39	6,45
EE ²	2,71	3,01	2,84	3,72	3,35
FDN ²	36,97	42,51	42,65	42,38	42,57
FDNcp ²	35,02	39,84	39,06	40,07	39,65
CNFcp ²	42,44	38,55	38,75	37,64	37,68
FDA ²	15,32	15,29	15,33	15,36	15,37
Lignina ²	2,53	3,09	3,01	3,05	2,99
Cutina ²	0,18	3,95	3,91	4,27	4,14
Cutina/FDNcp	0,51	9,93	10,00	10,66	10,43
Ca ²	0,16	0,24	0,42	0,23	0,44
P ²	0,29	0,30	0,29	0,32	0,31
K ²	1,06	0,84	0,83	0,86	0,84
Na ²	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
Mg ²	0,17	0,19	0,18	0,20	0,19

¹MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; NNP = nitrogênio não-protéico; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína; CNFcp = carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína; FDA = fibra em detergente ácido (FDA). ²% base da MS; ³% do nitrogênio total. ⁴FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de Ca(OH)₂/kg.

A alta relação cutina/FDN dos ingredientes FM e TM (Tabela 2) indica elevada presença de casca da semente de mamona no material (Van Soest, 1994). A cutina é a principal fração não-fenólica da lignina bruta, composta por polímeros de ésteres de hidroxi-ácidos graxos de cadeia longa e álcoois, presente na epiderme de tecidos de plantas, conferindo proteção superficial. Embora não forme ligações com carboidratos, por ser indigestível, apresenta-se como barreira à entrada de microorganismos ruminais reduzindo a extensão da degradação (Van Soest, 1994).

Percebe-se, contudo, que o tratamento do FM ou da TM com Ca(OH)_2 não alterou a composição dos carboidratos. Em diversos estudos demonstrou-se que o tratamento alcalino de materiais ricos em parede celular lignificada remove ligações tipo ésteres entre lignina e hemicelulose por saponificação, tornando a hemicelulose e parte da lignina solúveis em meio neutro. Todavia, a eficácia do tratamento depende da presença de ligações tipo ésteres entre carboidratos e lignina, as quais são minoritárias em dicotiledôneas (Fahey et al., 1993; Van Soest, 1994). Desta forma, a baixa presença de interações carboidratos-lignina do tipo ésteres na parede celular do FM e TM, possivelmente apresenta-se como um dos fatores que explica a ausência de efeito do tratamento com Ca(OH)_2 (40g/kg) sobre os teores de FDN e lignina.

Observa-se que, apesar do aumento nos teores de cálcio nas dietas com o tratamento alcalino da TM e FM, a relação cálcio/fósforo (Ca/P) de 1,45:1 manteve-se dentro da faixa considerada adequada para utilização de ambos os nutrientes (Van Soest, 1994). Todavia, a relação Ca/P é considerada importante pelos sistemas nutricionais vigentes, somente em dietas deficientes em fósforo. Quando a dieta supre adequadamente a demanda de fósforo, grandes variações na relação Ca/P são toleradas (1:1 até 8:1) sem afetar o desempenho de animais ruminantes (NRC, 2001). Por outro lado, salienta-se que o cálcio adicionado pelo tratamento do FM ou TM com Ca(OH)_2 ,

apresenta baixo coeficiente de absorção (55%) em relação às fontes tradicionais, como o carbonato de cálcio (coeficiente de absorção de 75%) e o fosfato bicálcico (coeficiente de absorção de 95%) (NRC, 2001).

O resultado da avaliação do efeito do tratamento com 40g de CaOH_2/kg de farelo de mamona (FM) ou torta de mamona (TM) no desaparecimento das duas sub-unidades de ricina (A com 35 KDa e B com 29KDa), em gel (SDS-PAGE), para encontra-se na Figura 1.

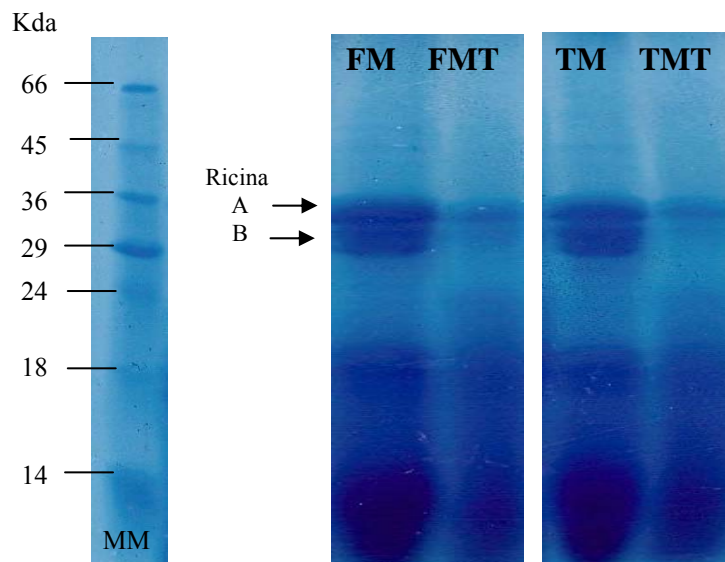


Figura 1 – Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para avaliação da eficácia do tratamento do farelo de mamona (FM) ou torta de mamona (TM) com 40g de CaOH_2/kg (FMT e TMT) no desaparecimento das duas sub-unidades de ricina (A com 35 KDa e B com 29 KDa). MM = marcador de massa molecular (14 a 66 KDa).

Verifica-se a presença das duas sub-unidades da ricina e de outras proteínas solúveis em tampão pH 3,8 no FM e TM, indicando que após o processo de extração do óleo ainda apresenta resíduos de ricina, necessitando de procedimentos para destoxificação. A eficácia do tratamento pode ser avaliada pela diferença na intensidade das sub-unidades de ricina. Neste sentido observa-se que o tratamento com 40g de

Ca(OH)₂/kg não provocou completo desaparecimento das sub-unidades de ricina tanto no FM quanto na TM e, portanto, não confirma os resultados obtidos por Anandan et al. (2005). Esses autores ao compararem a eficácia de destoxificação da ricina de diferentes métodos físicos (autoclave, cozimento, aquecimento, fervura e embebição) e químicos (tratamento com hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, amônia, cloreto de sódio, formaldeído ou tanino) observaram que somente o autoclave (15 psi, 60 min) e o tratamento com hidróxido de cálcio (40 g/kg de farelo de mamona) provocaram completa desnaturação da toxina.

O teor de ricina no FM e TM e a eficácia de destoxificação do tratamento com 40g de Ca(OH)₂/kg constam na Tabela 4. Observa-se que a eficácia de destoxificação do FM foi de 62,1% e 64,8% para a TM. O teor de ricina observado para o FM (773 mg/kg de MS) e TM (799 mg/kg) foi o dobro do valor determinado por Anandan et al. (2005), o que pode explicar a menor eficácia do tratamento no presente trabalho. Porém salienta-se que o método utilizado por Anandan et al. (2005) para medir o teor de ricina (purificação da ricina seguido por dosagem de proteína total) difere-se do utilizado no presente trabalho (eletroforese e densitometria), o que pode implicar em diferenças nas estimativas (Wannemacher Jr. et al., 1992). Além disso, diferenças na pureza do Ca(OH)₂ utilizado (produto comercial destinado à pintura contendo mínimo de 88% óxidos totais) e por Anandan et al. (2005) (não reportado) também pode ter contribuído para a menor eficácia de destoxificação do tratamento alcalino.

Tabela 4 – Teor de ricina no farelo de mamona (FM) e torta de mamona (TM) e eficácia de destoxificação do tratamento com 40g de Ca(OH)₂/kg

Item	FM	FMT	TM	TMT
Ricina (% da área total)	13,75	5,60	13,65	5,15
Proteína total ¹ (mg/kg de MS)	5.623	5.239	5.837	5.465
Ricina (mg/kg de MS)	773	293	799	281
Eficácia de destoxificação ² (%)		62,1		64,8

¹solúvel em pH 3,8; ²((teor de ricina controle – teor ricina tratado) / teor de ricina controle) x 100.

FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TMT = torta de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg

O consumo de ricina e os níveis séricos de ALT (alaninoaminotransferase) e AST (aspartatoaminotransferase) constam na Tabela 5. Observa-se que apesar do maior ($P < 0,10$) consumo de ricina para os ovinos que receberam dietas com FM ou TM sem tratamento alcalino, durante o período experimental não foram observados sintomas clínicos de intoxicação nos animais e, os níveis séricos de ALT e AST não foram afetados pelo tratamento alcalino, estando os mesmos dentro dos padrões normais para a espécie (22 a 28 UI/L para ALT e 60 a 280 UI/L para AST) (Radostits et al., 2002). Os níveis séricos de ALT e AST constituem em indicadores de função hepática, os quais se elevam na ocorrência de lesão hepática e estão associados com ocorrência de intoxicação por ricina em ratos e ovinos (Kumar et al., 2003; Aslani et al., 2007).

Tabela 5 – Consumo diário de ricina e concentração no soro sanguíneo de alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)_2

Itens	Dietas ¹					Contrastes ² (efeito)				CV (%)
	FS	FM	FMT	TM	TMT	C	F	H	F x H	
Ricina (mg)	0,0	267,2	117,3	212,4	116,9	**	ns	**	ns	14,99
Ricina (mg/kg de PC ³)	0,0	2,37	1,09	2,48	0,83	**	ns	**	ns	17,73
ALT (UI/L)	31,43	27,25	31,18	29,77	28,73	ns	ns	ns	ns	24,87
AST(UI/L)	69,47	53,85	59,00	71,90	63,33	ns	**	ns	ns	18,45

¹FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$.

²C = controle (FS vs FM + FMT + TM + TMT); F = fonte de mamona (FM + FMT vs TM + TMT); H = tratamento com Ca(OH)_2 (FM + TM vs FMT + TMT); F x H = interação fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 (FM + TMT vs TM + FMT);

³PC = peso corporal.

Dose letal para a ingestão de sementes de mamona esmagadas de 2,5 g/kg de peso corporal para ovinos com peso corporal entre 32 a 42 kg, com quadro de diarréia acentuada e mortes com menos de três dias após a ingestão foi descrita por Armién et al., 1996.

Neste sentido, durante os 21 dias de período experimental esperar-se-ia a ocorrência de sintomas clínicos de intoxicação por ricina nos animais recebendo as dietas contendo 15% de FM ou TM, pois corresponde ao fornecimento de 3g/kg peso corporal e 3,1g/kg de peso corporal de FM e TM. Considerando a insolubilidade da ricina em lipídeos e o rendimento teórico de 56% em farelo durante a extração do óleo de sementes de mamona (Anthonisen et al., 2006), estima-se fornecimento médio equivalente a 5,4g/kg de peso corporal de sementes de mamona, mais que o dobro da dose letal observada por Armién et al. (1996). Em adição, considerando a dose letal por ingestão de seis sementes de mamona em humanos (Jones, 1947), teores de ricina entre 1,9 a 16 mg/g de sementes (Pinkerton et al., 1999) e peso por semente entre 0,35 a 0,67g (Milani et al., 2006), estimam-se doses letais entre 57 a 919 µg de ricina/kg de peso corporal em humanos adultos (70 kg). Desta forma, o valor estimado de ingestão de ricina nos tratamentos com TM e FM (média de 2.425 µg de ricina/kg) superam os valores acima descritos como letais em humanos.

Albin et al. (1969) e Santana et al. (1979) também não observaram sintomas clínicos de intoxicação de bovinos de corte confinados por períodos acima de 100 dias, alimentados com dietas contendo farelo de mamona com alto e baixo teor de ricina.

Embora não existam comprovações, é possível que as moléculas de ricina sejam quebradas por proteases microbianas ruminais inativando sua ação, pois somente a molécula intacta (frações A e B ligadas) inibe a síntese protéica em células eucarióticas (Audi et al., 2005). Desta forma, possivelmente apresenta-se como um dos fatores responsáveis pela ausência de efeitos clínicos agudos de intoxicação nos animais.

Na Tabela 6 encontram-se as estimativas dos parâmetros da dinâmica de degradação ruminal da proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos usados nas dietas experimentais. A fração efetivamente degradada da PB

(DEPB) média entre FM e TM (62,09%) representou 94% do valor obtido para o FS. Observa-se que houve similaridade entre os valores para DEPB entre FM e TM.

Tabela 6 - Parâmetros da dinâmica de degradação ruminal estimados para proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos utilizados, obtidos por meio de incubação *in situ*

Itens ¹	Alimentos ²						
	SM	Milho	FS	FM	FMT	TM	TMT
PB							
Fração a, %	48,68	17,33	26,20	25,30	30,13	28,47	32,97
Fração b, %	27,29	60,78	73,80	65,76	61,34	63,57	58,88
Kd, % h ⁻¹	0,0469	0,0264	0,0514	0,0535	0,0348	0,0506	0,0324
DE, %	64,58	40,28	66,15	61,53	57,35	62,64	58,08
FDN							
Fração b, %	76,57	97,66	98,85	32,99	33,84	35,09	35,23
Fração I, %	23,43	2,34	1,15	67,01	66,16	64,91	64,77
Kd, % h ⁻¹	0,0197	0,0206	0,0519	0,0386	0,0401	0,0434	0,0478
Latência, h	1,064	0,726	0,1000	0,10024	0,10030	0,10080	0,10050
DE, %	28,33	31,35	53,73	15,49	16,22	17,52	18,43

¹ Fração a = fração solúvel; fração b = fração insolúvel potencialmente degradável; Kd = taxa de degradação da fração b; DE = fração efetivamente degradada, adotando-se valor de taxa de passagem (Kp) de 0,03587 h⁻¹ para silagem de milho (SM) e 0,04355 h⁻¹ para os alimentos concentrados, segundo equações preditivas descritas em Cannas et al. (2004); fração I = fração indegradável.

² SM = silagem de milho; FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de Ca(OH)₂/kg.

A principal alteração sobre a cinética de degradação da PB ocorreu com o tratamento alcalino do FM ou TM, com redução média de 35,5% na taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável, os quais reduziram a DEPB. Reduções nas taxas de degradação ruminal de alimentos protéicos tratados com agentes alcalinos têm sido descritos na literatura (Waltz & Loerch, 1986; Stern et al., 1994). O mecanismo pelo qual o tratamento alcalino reduz a degradação ruminal está relacionado com mudanças na estrutura das proteínas causadas pelo processo desnaturação (NRC,

2001). Conforme apresentado anteriormente, as sub-unidades protéicas solúveis em pH 3,8 do FM e TM desapareceram parcialmente com o tratamento de 4% de Ca(OH)_2 , indicando a ocorrência de desnaturação (Figura 1).

A partir dos valores de fração efetivamente degradada PB obtidos de cada alimento e considerando a PB da mistura uréia:sulfato de amônio da dieta totalmente degradada no rúmen, os teores de proteína degradável no rúmen (PDR) foram estimados em 9,09, 9,02, 8,83, 9,70 e 9,50%, base da MS, para as dietas com FS, FM, FMT, TM e TMT.

O FM e TM apresentaram alta fração indigerível da FDN (em média 66% da FDN), possivelmente devido aos elevados teores de cutina. Em termos absolutos o tratamento com Ca(OH)_2 do FM e TM não afetou a fração indegradável da FDN, mas aumentou em média 7% a taxa de degradação ruminal (kd) da fração potencialmente degradável da FDN (FDNpd). Embora os teores de cutina e de lignina não foram alterados pelo tratamento alcalino, é possível que o mesmo tenha rompido parte das ligações tipo ésteres entre os componente da cutina (Van Soest, 1994), facilitando o acesso dos microrganismos ruminais à fração potencialmente degradável do alimento.

As médias para o consumo de constituintes da dieta são apresentadas na Tabela 7. Apesar da maior fração indigestível da FDN do FM e TM em relação ao FS, não houve diferença sobre o consumo de MS e dos nutrientes entre as dietas com mamona e farelo de soja, exceto ($P < 0,10$) para os consumos de CNF e CNFcp. A rápida degradação da fração potencialmente degradável da FDN e o pequeno tamanho de partícula da FDN indigestível facilitam os processos de desaparecimento ruminal da FDN do FM e TM, os quais podem explicar a ausência de efeito sobre o consumo de MS e FDN, em relação ao farelo de soja. Os menores ($P < 0,10$) consumos de CNF e

CNFcp para as dietas contendo co-produtos de mamona em relação ao farelo de soja ocorreram devido à menor composição destas frações (Tabelas 2 e 3).

Tabela 7 - Consumo de constituintes da dieta em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)_2

Itens ¹	Dietas ²					Contrastes ³				CV (%)
	FS	FM	FMT	TM	TMT	(efeito)				
						C	F	H	F x C	
	g/dia									
CMS	1.363,2	1.152,4	1.334,0	1.181,4	1.386,8	ns	ns	**	ns	16,83
CMO	1.293,0	1.089,4	1.253,6	1.119,2	1.307,0	ns	ns	ns	ns	16,95
CEE	39,6	35,7	40,5	45,6	48,2	ns	**	ns	ns	17,95
CPB	205,7	165,4	191,9	170,9	203,2	ns	ns	**	ns	17,05
CPDR	123,9	103,9	117,8	114,6	131,7	ns	ns	ns	ns	16,78
CFDN	444,2	443,7	516,9	447,7	537,0	ns	ns	ns	ns	20,61
CFDNcp	440,5	435,6	491,8	442,5	519,8	ns	ns	ns	ns	18,93
CCNFcp	607,1	452,7	529,3	460,2	535,7	**	ns	**	ns	15,66
	g/kg de peso corporal									
CMS	24,5	20,4	24,9	20,7	26,3	ns	ns	**	ns	17,43
CFDN	8,0	7,9	9,7	7,9	10,1	ns	ns	ns	ns	20,54
CFDNcp	7,9	7,7	9,2	7,8	9,8	ns	ns	ns	ns	18,85

¹CMS = consumo de matéria seca; CMO = consumo de matéria orgânica; CEE = consumo de extrato etéreo; CPB = consumo de proteína bruta; CPDR = consumo de proteína bruta degradável no rúmen; CFDN = consumo de fibra em detergente neutro; CFDNcp = consumo de fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína; CNFcp = consumo de carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína;

²FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$.

³C = controle (FS vs FM + FMT + TM + TMT); F = fonte de mamona (FM + FMT vs TM + TMT); H = tratamento com Ca(OH)_2 (FM + TM vs FMT + TMT); F x H = interação fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 (FM + TMT vs TM + FMT); ns não significativo ($P > 0,10$). **($P < 0,10$).

Não houve efeito de interações entre fonte e tratamento alcalino e de fonte de mamona sobre o consumo de matéria seca e de nutrientes (exceto para consumo de EE). Porém, o tratamento do FM e TM com Ca(OH)_2 aumentou ($P < 0,10$) o consumo de MS, PB e CNFcp. Apesar de não ter sido observado efeito significativo para os consumos

(em g/dia) de MO, CT, FDN e FDNcp com o tratamento alcalino, em termos absolutos, verificou-se aumentos de 15,9, 14,2, 18,2 e 15,2% nos tratamentos FMT e TMT em relação aos tratamentos FM e TM. Reduções dos teores de ricina (Figura 1) e o aumento na taxa de degradação ruminal *in situ* da FDNpd do FM e TM (Tabela 4) apresentam-se como fatores que podem explicar o aumento ($P<0,10$) no consumo de MS com o tratamento com Ca(OH)_2 .

Apesar do quadro de ausência de intoxicação clínica observado no presente trabalho (Tabela 5), não se descarta a possibilidade de efeitos subclínicos nos animais alimentados com FM e TM, os quais podem explicar, pelo menos parcialmente, o aumento no consumo de MS com a redução da toxicidade da ricina promovida pelo tratamento alcalino (Figura 1 e Tabela 4).

O maior ($P<0,10$) consumo de EE nas dietas com torta em relação ao farelo de mamona deve-se ao maior teor de extrato etéreo presente na torta de mamona, pois o processo de extração de óleo *expeller* utilizado para obtenção da torta de mamona é menos eficiente que a extração por solventes orgânicos (Gallup et al., 1950).

Aumentos ($P<0,10$) no consumo de PB e CNFcp com o Ca(OH)_2 ocorreram em razão do aumento ($P<0,10$) no consumo de MS, pois a composição de PB e CNFcp das dietas não foi alterada (Tabela 3).

As médias para os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EE, FDN, FDNcp, CNFcp e teor dietético de NDT são apresentadas na Tabela 8. Observa-se que o coeficiente de digestibilidade (exceto para EE) das dietas com mamona não diferiram da dieta com farelo de soja, embora o FM e TM apresentem menor estimativa de extensão da degradação ruminal da FDN *in situ* em relação ao FS (Tabela 6). O alto valor observado para taxa de degradação ruminal da FDNpd e principalmente a baixa

contribuição da FDNcp do FM e TM na FDNcp das dietas (média de 17,2%) explicam a ausência de efeito ente mamona e soja.

Tabela 8 – Coeficiente de digestibilidade total (CD) e teor de nutrientes digestíveis totaos (NDT) em dietas de ovinos contendo farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)₂

Itens ¹	Dietas ²					Contrastes ³ (efeito)				CV (%)
	FS	FM	FMT	TM	TMT	C	F	H	F x H	
	%									
CDMS	69,24	65,11	70,22	65,70	68,31	ns	ns	ns	ns	6,67
CDMO	71,22	67,44	72,51	67,58	70,48	ns	ns	**	ns	6,19
CDEE	84,12	91,29	96,16	86,73	92,10	**	**	**	ns	7,28
CDPB	67,88	66,49	71,04	64,79	71,16	ns	ns	**	ns	3,56
CDFDN	43,56	39,97	48,25	41,98	47,73	ns	ns	**	ns	19,20
CDFDNcp	46,93	44,65	50,73	46,07	54,46	ns	ns	**	ns	16,30
CDCNFcp	89,08	87,51	91,40	87,14	83,68	ns	ns	ns	ns	3,42
NDT	71,70	68,40	73,43	68,51	71,43	ns	ns	**	ns	5,91

¹CDMS = CD da matéria seca; CDMO = CD da matéria orgânica; CDEE = CD do extrato etéreo; CDPB = CD da proteína bruta; CDFDN = CD da fibra em detergente neutro; CDFDNcp = CD da fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína; CDCNFcp = CD do carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína;

²FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de Ca(OH)₂/kg.

³C = controle (FS vs FM + FMT + TM + TMT); F = fonte de mamona (FM + FMT vs TM + TMT); H = tratamento com Ca(OH)₂ (FM + TM vs FMT + TMT); F x H = interação fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)₂ (FM + TMT vs TM + FMT); ns não significativo (P>0,10). ** (P<0,10).

O maior (P<0,10) CDEE das dietas com mamona em relação à dieta com farelo de soja possivelmente esteja relacionado à maior composição de ácidos graxos (AG) polinsaturados na mamona. Em sementes de mamona o ácido graxo monoinsaturado ricinoléico C18:1 (n-9) representa mais de 90% do total de AG, enquanto em sementes de soja os AG polinsaturados representam 80% do total de AG (Moshkin, 1986; Palmquist & Mattos, 2006). Apesar do ácido ricinoléico apresentar característica laxativa devido à presença de uma hidroxila no carbono 12, os resultados permitem

demonstrar que respeitando os limites de EE na dieta (6% base da MS), o mesmo não se constitui num impedimento para uso da torta de mamona na alimentação de ruminantes.

Não houve efeito de interação entre fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 e entre fonte de mamona (exceto para CDEE) sobre os coeficientes de digestibilidade. O maior ($P < 0,10$) CDEE nas dietas com torta de mamona em relação ao farelo de mamona possivelmente deve-se ao maior ($P < 0,10$) consumo de EE, o qual reduziu a participação da fração endógena de EE em relação ao consumo de EE (Van Soest, 1994).

O tratamento do farelo e torta de mamona com Ca(OH)_2 aumentou ($P < 0,10$) o coeficiente de digestibilidade (exceto CDCNF). Considerando que o coeficiente de digestibilidade efetivo do alimento é determinado pelas características intrínsecas do mesmo (potencialidade) e pela capacidade de atuação dos sistemas enzimáticos microbiano e animal (Detmann et al., 2008), o aumento observado pode estar relacionado com alterações nestes dois fatores, dependendo do nutriente específico.

Sob esta ótica, apesar do ensaio *in situ* ter demonstrado reduções na degradabilidade ruminal da PB ao tratar o FM e TM com Ca(OH)_2 (redução na potencialidade), a maior disponibilidade de nutrientes essenciais proporcionado pelo tratamento com Ca(OH)_2 do FM e TM mais que compensou, ampliando a capacidade de degradação dos compostos nitrogenados (N) disponíveis pelos sistemas enzimáticos microbianos. Neste sentido, elevou a conversão de N dietético em N microbiano, reduzindo perdas fecais de N e, conseqüentemente, aumentando ($P < 0,10$) o CDPB. Comportamento semelhante foi observado por Waltz & Loerch (1986), que ao incluírem 13,8% de farelo de soja tratado com NaOH (0,5N) em dietas de ovinos, observaram aumento da retenção de N ingerido em relação ao tratamento controle, apesar da degradabilidade ruminal *in situ* do farelo de soja ter reduzido com o tratamento alcalino.

O aumento ($P < 0,10$) no CDEE na dieta ao tratar o FM e TM com Ca(OH)_2 pode estar associado ao maior ($P < 0,10$) consumo de EE, por mecanismos discutidos anteriormente.

O aumento ($P < 0,10$) no CDFDN e CDFDNcp nas dietas com o tratamento do FM e TM com Ca(OH)_2 está relacionado com aumento na taxa de degradação (Kd) da FDNpd (Tabela 6). Conforme discutido anteriormente, é possível que o tratamento alcalino tenha rompido parte das ligações tipo ésteres entre os componentes da cutina no FM e TM, reduzindo efeitos de barreira física, facilitando o acesso dos microrganismos ruminais à FDNpd (Van Soest, 1994). Salienta-se que o aumento médio na digestibilidade *in vivo* da FDN (17,1%) foi maior que o aumento estimado *in situ* (5%), indicando que outros fatores relacionados à atividade enzimática, como maior disponibilidade de nutrientes essenciais para a microbiota ruminal, também podem ter contribuído para a ampliação ($P < 0,10$) do CDFDN e CDFDNcp.

Além disso, não podem ser descartados possíveis efeitos da ricina sobre a atividade enzimática digestiva animal e microbiana, bem como sobre a absorção intestinal de nutrientes. A ricina é reconhecida como potente inibidor da síntese protéica em organismos eucarióticos, através da clivagem de ligações N-glicosídicas de adeninas na posição 4324 em RNA ribossomal 28S (Endo & Tsurugi, 1988). Considerando a mucosa gastrintestinal como tecido animal de primeiro contato da ricina ingerida (Audi et al., 2005), é possível que a presença de ricina em níveis subclínicos nos tratamentos FM e TM causaram lesões celulares na mucosa intestinal reduzindo a capacidade de síntese de enzimas digestivas e de absorção de nutrientes (Armién et al., 1996).

As médias para os consumos de MS, MO, PB, EE, FDN, FDNcp e CNFcp digeridos e consumo de NDT são apresentadas na Tabela 9. Verifica-se que não houve efeito entre mamona e soja, de interação entre fonte de mamona e tratamento com

Ca(OH)₂ e de fonte de mamona sobre o consumo, exceto para o consumo de CNFcp digerido, maior (P<0,10) na dieta com FS, e para o consumo de EE digerido, maior (P<0,10) nas dietas contendo torta em relação ao farelo mamona.

Tabela 9 - Consumo de componentes digeridos em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)₂

Itens ¹	Dietas ²					Contrastes (efeito) ³				CV (%)
	FS	FM	FMT	TM	TMT	C	F	H	F x H	
	kg/dia									
CMSD	943,9	750,3	936,7	776,2	947,3	ns	ns	**	Ns	16,81
CMOD	920,9	734,7	909,0	756,4	921,2	ns	ns	**	Ns	16,71
CEED	33,3	32,6	38,9	39,5	44,4	ns	**	ns	Ns	18,05
CPBD	139,6	110,0	136,3	110,7	144,6	ns	ns	**	Ns	15,34
CFDND	193,5	177,3	249,4	187,9	256,3	ns	ns	**	Ns	30,36
CFDNcpD	206,7	194,5	249,5	203,9	283,1	ns	ns	**	Ns	25,40
CCNFcpD	540,8	396,2	483,8	401,0	448,3	**	ns	**	Ns	15,30
CNDT	962,1	774,0	957,2	804,6	975,8	ns	ns	**	Ns	16,63

¹CMSD = consumo de matéria seca digerida; CMOD = consumo de matéria orgânica digerida; CEED = consumo de extrato etéreo digerido; CPBD = consumo de proteína bruta digerida; CFDND = consumo de fibra em detergente neutro digerida; CFDNcpD = consumo de fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína digerida; CNFcpD = consumo de carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína digerido; CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais.

²FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de Ca(OH)₂/kg.

³C = controle (FS vs FM + FMT + TM + TMT); F = fonte de mamona (FM + FMT vs TM + TMT); H = tratamento com Ca(OH)₂ (FM + TM vs FMT + TMT); F x H = interação fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)₂ (FM + TMT vs TM + FMT); ns não significativo (P>0,10). ** (P<0,10).

O tratamento com Ca(OH)₂ aumentou (P<0,10) o consumo de todos os componentes digeridos, exceto para o EE. O consumo de cada componente digerido representa o produto do consumo do nutriente e do coeficiente de digestibilidade total do mesmo. Neste sentido, verifica-se que aumentos (P<0,10) no consumo representaram 73,8, 73,0, 67,8 e 98,2% do aumento (P<0,10) no consumo de MS, MO, PB, e CNFcp digeridos. Por outro lado, aumentos no consumo de FDN e FDNcp digeridos tiveram maior influência do coeficiente de digestibilidade (51,7 e 56,7%), o que era esperado,

pois o tratamento alcalino exerce efeito direto positivo somente sobre os componentes químicos do alimento insolúveis em meio neutro (Berger et al., 1994).

Na Tabela 10 são apresentados às médias para a excreção urinária de derivados de purina, síntese e eficiência de síntese de nitrogênio microbiano ruminal (Nmic) em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)₂.

Tabela 10 – Excreção urinária de purinas, síntese e eficiência de síntese de nitrogênio microbiano ruminal em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)₂

Item ¹	Dietas ²					Contrastes ³ (efeitos)				CV (%)
	FS	FM	FMT	TM	TMT	C	F	H	F x H	
AU (mmol/d)	1,47	0,82	1,77	1,04	1,72	ns	ns	**	ns	28,96
AL (mmol/d)	12,05	9,07	12,60	8,07	11,01	ns	ns	**	ns	23,41
X + H (mmol/d)	0,62	0,87	1,90	0,90	1,42	**	ns	**	ns	26,85
PT (mmol/d)	14,14	10,76	16,27	10,01	14,15	ns	ns	**	ns	22,55
PA (mmol/d)	16,72	12,65	19,33	11,67	16,78	ns	ns	**	ns	23,13
Nmic (g/d)	12,16	9,19	14,05	8,48	12,20	ns	ns	**	ns	23,13
PBmic (g/d)	75,98	57,47	87,81	53,01	76,25	ns	ns	**	ns	23,13
CNDT (g/d) ³	915,68	776,30	956,90	802,54	905,13	ns	ns	**	ns	15,51
gPBmic/kgNDT	81,31	75,85	92,06	66,00	86,57	ns	ns	**	ns	22,33
Ni (g/d)	31,94	26,58	30,70	27,35	30,14	ns	ns	ns	ns	17,46
ECNi	0,38	0,35	0,46	0,31	0,40	ns	ns	**	ns	21,81
NDRing (g/d)	19,69	16,90	19,01	18,20	19,58	ns	ns	**	ns	17,26
ECNd	0,62	0,54	0,74	0,47	0,62	ns	ns	**	ns	21,62

¹AU = ácido úrico; AL = alantoína; X + H = xantina e hipoxantina; PT = purinas totais excretadas na urina; PA = purinas absorvidas no intestino delgado; Nmic = nitrogênio microbiano ruminal; PBmic = proteína bruta microbiana ruminal; CNDT = consumo de NDT; Ni = nitrogênio ingerido; ECNi = eficiência de conversão do Ni em Nmic; NDRing = consumo de N (g/d) x PDR (% PB) da dieta obtido a partir da incubação ruminal *in situ* dos alimentos; ECNd = eficiência de conversão do NDRing em Nmic.

²FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de Ca(OH)₂/kg; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de Ca(OH)₂/kg.

³C = controle (FS vs FM + FMT + TM + TMT); F = fonte de mamona (FM + FMT vs TM + TMT); H = tratamento com Ca(OH)₂ (FM + TM vs FMT + TMT); F x H = interação fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)₂ (FM + TMT vs TM + FMT); ns não significativo (P>0,10). ** (P<0,10).

Verifica-se que não houve efeitos entre mamona e soja, de interação entre fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)₂ e de fonte de mamona sobre a síntese de nitrogênio

microbiano e eficiência de utilização dos substratos energéticos e nitrogenados pelos microrganismos ruminais. Porém, a síntese de nitrogênio microbiano aumentou ($P < 0,10$) com o tratamento do FM e TM com Ca(OH)_2 , em razão da maior ($P < 0,10$) disponibilidade de nutrientes essenciais (Tabela 9) e da maior ($P < 0,10$) eficiência de utilização dos nutrientes disponíveis pela microbiota ruminal.

A eficiência microbiana é comumente medida pela eficiência de uso dos substratos energéticos e nitrogenados dietéticos, os quais constituem em indicadores complementares (Bach et al., 2005). Observa-se que o tratamento com Ca(OH)_2 aumenta ($P < 0,10$) tanto a eficiência da microbiota ruminal na utilização de substratos dietéticos energéticos (gPBmic/kg de NDT) quanto nitrogenados (ECNi, Nmic/Ning). A eficiência energética é afetada pela quantidade de carboidratos disponíveis, tipo de carboidrato, pH, taxa de passagem e disponibilidade sincronizada de substratos essenciais (ATP, carbono, N, AGVCR, S, P, ect) (Valadares Filho & Pina, 2006). Desta forma, o aumento na disponibilidade sincronizada dos substratos essenciais com o tratamento alcalino do FM e TM, pode ter contribuído para o aumento ($P < 0,10$) da eficiência energética.

O processo de conversão do nitrogênio dietético ingerido em N microbiano ruminal (ECNi) pode ser dividido em dois eventos: conversão do N dietético ingerido em N disponível para a microbiota ruminal, medida pela proporção de proteína degradada no rúmen; conversão do N disponível em N microbiano (ECNd). O primeiro evento é afetado principalmente por fatores intrínsecos da fonte protéica, tais como: concentração proporcional de proteína verdadeira; solubilidade; estrutura terciária e quaternária; presença de barreiras inertes, como a parede celular; presença de ligações peptídicas mais resistentes à degradação e fatores antinutricionais (NRC, 2001; Bach et al., 2005). O segundo evento, por sua vez depende principalmente do tipo de composto

nitrogenado disponível, da disponibilidade de outros nutrientes essenciais (carboidratos, enxofre, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada), da taxa de passagem e pH ruminal (Nocek & Russell, 1988; NRC, 2001; Bach et al., 2005).

O ensaio de degradação *in situ* dos alimentos indicou que o tratamento com Ca(OH)_2 reduziu a conversão de N dietético ingerido em N disponível (degradação efetiva da PB) do FM e TM (Tabela 6) e, portanto, não explica o aumento da ECNi. Assim, aumentos ($P<0,10$) da ECNd apresenta-se como principal evento responsável pelo aumento ($P<0,10$) da ECNi. O maior ($P<0,10$) consumo de carboidratos digeridos (Tabela 9) aumentou a disponibilidade de esqueleto de carbonos e de energia, aumentando ($P<0,10$) a conversão de N disponível em N microbiano, reduzindo ($P<0,10$) as perdas de N fecal e possivelmente as perda de N na urina.

Além do aumento no suprimento de nutrientes essenciais, o tratamento com Ca(OH)_2 possivelmente reduziu o efeito inibitório da ricina sobre a síntese protéica microbiana ruminal. Apesar da ricina intacta ou com as frações A e B isoladas não apresentarem atividades em ribossomos intactos de organismos procarióticos (Haas-Kohn et al., 1980; Endo & Tsurugi, 1988), Haas-Kohn et al. (1980) verificaram que dois fragmentos (18 e 22 KDa) de ricina hidrolisada por tripsina digestiva inibiram a síntese protéica de *Escherichia coli*. Assim, é provável que nos tratamentos FM e TM, a maior quantidade desses fragmentos polipeptídicos de ricina hidrolisadas por proteases microbianas extracelulares provocaram inibições na síntese protéica dos microrganismos ruminais, reduzindo a capacidade de degradação dos nutrientes digestíveis. Desta forma, a desnaturação parcial da ricina pelo tratamento com Ca(OH)_2 reduziu a quantidade destes fragmentos polipeptídicos (Haas-Kohn et al., 1980), reduzindo seus efeitos inibitórios sobre a síntese protéica dos microrganismos ruminais

,contribuindo para o aumento ($P<0,10$) da eficiência de conversão dos substratos dietéticos energéticos e nitrogenados em nitrogênio microbiano.

As médias para excreção urinária de N-uréia (EUNU), concentração de nitrogênio-uréico no soro (NUS) e balanço de nitrogênio (BN) em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)_2 são apresentadas na Tabela 11. Verifica-se ausência de efeitos entre mamona e soja, de interação entre fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 e de fonte de mamona sobre a EUNU, NUS, excreção de N nas fezes, urina e balanço de nitrogênio.

Tabela 11 – Excreção urinária de N-uréia (EUNU), concentração de nitrogênio-uréico no soro (NUS) e balanço de nitrogênio (BN) em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona tratados com Ca(OH)_2

Item ¹	Dietas ²					Contrastes ³ (efeitos)				CV (%)
	FS	FM	FMT	TM	TMT	C	F	H	F x H	
EUNU (g/d)	7,51	7,34	9,23	5,92	8,52	ns	ns	**	ns	18,61
EUNU (mg/kg)	125,83	125,36	164,55	113,02	148,20	ns	ns	**	ns	17,93
EUNU (% NU)	70,49	66,43	74,23	60,62	72,89	ns	ns	**	ns	17,77
NUS (mg/dL)	19,27	19,22	21,46	16,15	22,92	ns	ns	**	ns	12,63
NI (g/d)	31,94	26,58	30,70	27,35	30,14	ns	ns	ns	ns	17,46
NF (g/d)	10,72	8,90	8,90	9,78	8,36	ns	ns	**	ns	27,45
NU (g/d)	10,66	11,06	12,44	9,76	11,68	ns	ns	**	ns	14,75
BN (g/d)	10,57	6,62	9,35	7,80	10,09	ns	ns	ns	ns	41,20
NF (% NI)	32,62	33,82	28,96	35,21	27,66	ns	ns	**	ns	13,92
NU (%NI)	34,54	42,54	41,38	36,27	38,97	ns	ns	ns	ns	24,01
BN (% NI)	32,83	23,64	29,66	28,52	33,37	ns	ns	ns	ns	34,12

¹NI = nitrogênio ingerido; NF = nitrogênio excretado nas fezes; NU = nitrogênio excretado na urina.

²FS = farelo de soja; FM = farelo de mamona; FMT = farelo de mamona tratado com 40 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$; TM = torta de mamona; TMT = torta de mamona tratada com 40 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{kg}$.

³C = controle (FS vs FM + FMT + TM + TMT); F = fonte de mamona (FM + FMT vs TM + TMT); H = tratamento com Ca(OH)_2 (FM + TM vs FMT + TMT); F x H = interação fonte de mamona e tratamento com Ca(OH)_2 (FM + TMT vs TM + FMT); ns = não significativo ($P>0,10$). **($P<0,10$).

O tratamento do FM e TM com Ca(OH)_2 ampliou ($P<0,10$) a EUNU e NUS, em razão do aumento no consumo de proteína bruta digerida (Tabela 9), os quais refletem

maior o pool de amônia circulante. Todavia, a maior ($P<0,10$) EUNU (g/d) não refletiu maior perda de N urinário em relação ao N ingerido. Além disso, apesar do aumento de 12,5% na ingestão de N, o BN (% NI) aumentou 21,3% com Ca(OH)_2 , em razão da maior ($P<0,10$) eficiência de conversão de N ingerido em N microbiano (ECNi) (Tabela 10), refletindo em menor ($P<0,10$) perda de N nas fezes. Salienta-se que não ocorreu valor negativo para o BN em todos os tratamentos, indicando que o consumo de nitrogênio atendeu as exigências de compostos nitrogenados dos animais.

Conclusões

O tratamento com hidróxido de cálcio do farelo ou torta de mamona, na dose de 40g/kg, apesar de não desnaturar completamente a ricina, amplia a eficiência de utilização dos componentes energéticos e nitrogenados em dietas para ovinos.

Literatura Citada

- ALBIN, R.C.; DAVIS, W.H.; ZINN, D.W. Castor meal for growing-finishing steers. **Journal of Animal Science**, v.28, n.1, p.133 (Abstract), 1969.
- ANANDAN S.; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH J. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal feed science and technology**, v.120, p.159-168, 2005.
- ANTHONISEN, dD; SCHIRMER, M.; SILVA, S.D.A. et al. Teor de óleo de sementes de mamona de variedades introduzidas na zona sul do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 2., 2006. Aracajú. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão. [2006] (CD-Rom).
- ARMIÉN, A.G.; D'ANGELIS, F.H.F.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental pelas sementes de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.4, p.99-106, 1996.
- ASLANI, M.R.; MALEKI, M.; MOHRI, M. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, v.49, n.1, p.400-406, 2007.

- AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M. et al. Ricin poisoning: A comprehensive review. **The Journal of the American Medical Association**, v.294, n.9, p.2342-2351, 2005.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, Suppl. E., p.9-21, 2005.
- BERGER, L.L.; FAHEY, G.C.; BOURQUIN, Jr. L.D. et al. Modification of forage quality after harvest. In: **Forage quality, evaluation, and utilization**. ed. FAHEY, G.C.; COLLINS, M.; MERTENS, D.R. et al. Madison: American Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America, p.922-966, 1994.
- BORCHERS, R. Castor bean meal. Part 1: Destruction of the toxic factor. **Poultry Science**, v.28, p.568-570, 1949.
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CANNAS, A.; TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G. et al. A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. **Journal of Animal Science**, v.82, p.149-169, 2004.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (occasional publication). 1992. 21p.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos da nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979, 380p.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: VI Simpósio Internacional de Gado de Corte. **Anais...** Eds.: VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; PAULINO, P.V.R. et al. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, p.21-52, 2008.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of Ricin A-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.18, p.8735-8739, 1988.
- FAHEY, G.C.; BOURQUIN, L.D.; TITGEMEYER, E.C. et al. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. In: **Forage cell wall structure and digestibility**. ed. JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. et al.

- Madison: America Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America, p.715-766, 1993.
- GALLUP, W.D.; BRIGGS, H.M.; HATFIELD, E.E. The comparative value of hydraulic expeller and solvent processed oil meals for ruminants. **Journal of Animal Science**, v.9, p.194-200, 1950.
- GARDNER JR., H.K.; D'AQUIN, E.L.; KOULTUN, S.P. et al. Detoxification and deallergenization of Castor Beans. **The Journal of the American Oil Chemists Society**. v.37, p.142-148, 1960.
- HADDAD, S.G.; GRANT, R.J.; KLOPFENSTEIN, T.J. Digestibility of alkali-treated wheat straw measured in vitro or in vivo using holstein heifers. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3258-3265, 1995.
- HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. University of Florida, 2000. P.A-25 (Bulletin 339, April-2000).
- HAAS-KOHN, L.J.G.; LUGNIER, A.A.J.; TIBONI, O. et al. Inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis by a limited tryptic digest of ricin, the toxin of *Ricinus communis* L. seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.97, n.3, p. 962-967, 1980.
- JONES, D.B. Proteins of the castor bean – their preparation, properties and utilization. **The Journal of the American Oil Chemists Society**. v.24, p.247-251, 1947.
- KODRAS RUDOLPH, C.K.; WHITEHAIR, R.M. Studies on the detoxification of castor seed pomace. **Journal of the American Oil Chemistry Society**. v.26, p.641–644, 1949.
- KUMAR, O.; SUGENDRAN, K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. **Toxicol**, v.41, p.333-338, 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.
- MATOS, L.L. **Substituição do farelo de algodão pelo farelo de mamona destoxificado, na alimentação suplementar de vacas em lactação**. Viçosa, MG:

- Universidade Federal de Viçosa, 1976. 39p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1976.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.
- MILANI, M.; ANDRADE, F.P.; DA SILVA, G.A. et al. **Avaliação de genótipos de porte baixo de mamona na região de Irecê-BA**. 3p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 279), 2006.
- MIRANDA, R.M.; BARREIRA, H.A.; FARIA, E.V. et al. **O farelo de mamona destoxificado na alimentação de novilhas leiteiras**. Rio de Janeiro, Instituto de Zootecnia, Publicação 41, 1961, 12p.
- MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986. 315p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.
- NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2070-2107, 1988.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. Estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v.249, p.627-631, 1974.
- PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, A.G. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006, p.287-310.
- PINKERTON, S.D.; ROLFE, R.; AULD, D.L. et al. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, v.39, p.353-357, 1999.
- RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 9. ed., 2002, 1737p.

- RETAMAL, C.A.; THIEBAUT, P.; ALVES, E.W. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. **Analytical Biochemistry**, v.268, p.15–20, 1999.
- ROBB, J.G.; LABEN, R.C.; WALKER Jr., H.G. et al. Castor meal in dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v.47, n.4, p.443-450, 1974.
- SANTANA, O.P.; CALDAS, G.C.; ARAÚJO, P.E.S. Resposta comparativa de bovinos jovens em confinamento, ao farelo de mamona adubo e lex protéico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 8., 1971, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1971, p.144-145.
- SEVERINO, L.S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. 31p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134), 2005.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS/STAT user's guide**. 4.ed. v.2. Cary: 1989. v.2, 846p.
- STERN, M.D.; VARGA, G.A.; CLARK, J.H. et al. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2762-2786, 1994.
- TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. Imunidade cruzada pelas sementes de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p.25-35, 1997.
- VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, A.G. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006, p.151-182.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.
- WANNEMACHER Jr., R.W.; HEWETSON, J.F.; LEMLEY, M.A. et al. Comparison of detection of ricin in castor bean extracts by biosassays, immunoassays, and chemical procedures. **Toxicon**, v.30, n.5-6, p.562, 1992.

- WALTZ, D.M.; LOERCH, S.C. Effect of acid and alkali treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, p.879-887, 1986.
- WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, **Proceeding**, Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.

Degradação ruminal da ricina e seu efeito sobre o crescimento microbiano

RESUMO - A ricina é uma proteína tóxica presente no endosperma de sementes de mamona (*Ricinus Communis* L.). Conjecturou-se que a microbiota ruminal seja capaz de destoxificar a ricina, mas não se conhece seu efeito sobre o crescimento microbiano ruminal. Nesse sentido, avaliou-se a capacidade *in vitro* dos microrganismos ruminais em destoxificar a ricina do farelo de mamona (FM), bem como o efeito da desnaturação de proteínas solúveis do FM por meio de tratamento alcalino, sobre a taxa de crescimento microbiano (μ) e a concentração média de amônia ao longo da incubação. Foram avaliadas três fontes de proteína solúvel (tripticase, extrato bruto de farelo de mamona (EBP) em estado intacto; e EBP em estado desnaturado com óxido de cálcio) em três doses de proteína (0,42; 0,84 e 1,64 g/L), em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 3x3. Foram coletadas amostras do meio de cultivo nos tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas para: análise de ricina, mediante eletroforese em gel (SDS-PAGE), densitometria e dosagem de proteína total; avaliação do crescimento microbiano (DO-600 nm); e dosagem de amônia. As sub-unidades de ricina não desaparecem na ausência de inóculo ruminal, mas foram degradadas a taxas de 0,2725; 0,1504 e 0,0648h⁻¹ com inóculo ruminal nas concentrações iniciais de 61, 122 e 243 μ g de ricina/mL do meio de cultivo. Estas concentrações de ricina representaram uma relação de 0,15; 0,30 e 0,60 kg de FM por litro de meio de cultivo ruminal. Houve interações (P<0,05) na taxa instantânea de crescimento microbiano (μ) entre dose e fonte de proteína solúvel e entre dose e desnaturação do EBP de FM. Houve incremento linear (P<0,05) na μ com aumento na dose de tripticase, e redução (P<0,05) de forma quadrática com aumento na dose de EBP intacto de FM, sendo estimando o valor mínimo de -0,0038h⁻¹ na μ , na dose de 1,444 g/L. A μ aumenta (P<0,05) com desnaturação do EBP de farelo de mamona, mas não é afetada pela dose de EBP de mamona em estado desnaturado. A concentração média de amônia foi menor (P<0,05) para o tratamento com EBP de FM em relação à tripticase, não sendo observado efeitos de desnaturação. Os resultados indicam que apesar da microbiota ruminal ser capaz de degradar a ricina, reduzindo sua ação tóxica no animal hospedeiro, a toxina inibe o crescimento microbiano ruminal. Recomenda-se a completa destoxificação do farelo de mamona para seu uso na alimentação de ruminantes.

Palavras-chave: destoxificação, eletroforese

Ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth

ABSTRACT – Ricin is a toxic protein present in castor seed (*Ricinus communis* L.) endosperm. It was thought that rumen microbion population is capable to detoxify ricin, but its effect on rumen microbial growth is not known. So, it was evaluated the rumen microorganisms *in vitro* capacity to detoxification the ricin, as an effect of solvent castor seed meal (SCM) soluble proteins (containing ricin) denaturation on microbial growth rate (μ) and ammonium average concentration. Rumen *in vitro* incubations containing three soluble protein sources (tripticase, SCM crude extract protein (CEP) intact or in denaturated state with calcium oxide) were evaluated in three doses (0.42, 0.84 and 1.64 g.L⁻¹), in a completely randomized design, with three repetitions, in a 3x3 factorial scheme. At the times 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours, culture medium samples were collected to analysis of: ricin, by gel eletroforesis means (SDS-PAGE), densitometry and total protein dosage; microbial growth (DO-600 nm); and ammonium dosage. Ricin subunits do not disappear in the absence of rumen inoculums, but are degraded to rates of 0.2725, 0.1504 and 0.0648 h⁻¹ with rumen inoculums initial concentrations of 61, 122 and 243 μ g.mL of ricin in culture medium. These ricin concentrations represent a ratio of 0.15, 0.30 and 0.60 kg of SCM per liter of rumen culture medium. There were interactions (P<0.05) in instantaneous rate of microbial growth (μ) between dose and soluble protein source and between dose and CEP of SCM denaturizing. Linear increase (P<0.05) of μ is observed with increase of tripticase dose, but quadratic reduction (P<0.05) with increase of CEP intact SCM dose, and estimating the minimum value of -0,0038h⁻¹ in μ , at dose of 1,444 g/L. The μ increase (P<0.05) with denaturation of CEP of SCM. The average concentration of ammonium was lesser (P<0.05) in CEP of SCM treatment relative to tripticase, with no denaturation effect observed. The results indicate that, despite rumen microorganisms are capable of degrade ricin, reducting its toxic action in host animal, the toxin inhibits rumen microbial growth. Therefore, castor seed meal complete detoxication is recommended for used in ruminant feeding.

Key Words: detoxification, electrophoresis

Introdução

O principal fator limitante ao uso dos co-produtos da extração de óleo de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) na alimentação animal é a presença de uma potente glicoproteína tóxica no endosperma das sementes, denominada ricina. A toxina é constituída por duas sub-unidades, com 36 KDa (A) e 29KDa, aproximadamente (Audi et al., 2005). A sub-unidade A é uma enzima que inativa irreversivelmente os ribossomos eucarióticos, enquanto a subunidade B é uma lecitina que se encontra ligada à subunidade A através de pontes dissulfídicas, e permite a entrada desta última, por endocitose, para o citosol. Assim, se forem quebradas as ligações entre as duas sub-unidades, as partes resultantes não são tóxicas em células eucarióticas (Audi et al., 2005). Em organismos procarióticos, a ricina nas formas intacta ou com as sub-unidades isoladas não apresentaram efeitos tóxicos, mas polipeptídios ativos obtidos da hidrólise da ricina por tripsina foram capazes de inibir a síntese protéica e o crescimento microbiano de *Escherichia coli* (Hass-Kohn, 1980).

Sintomas tóxicos e mortes de animais por ingestões de sementes de mamona foram descritos em espécies de não-ruminantes e ruminantes (Armién et al., 1996; Tokarnia & Dobereiner, 1997; Kumar et al., 2003; Aslani et al., 2007). Por outro lado, em diversos estudos foram observados tolerância de animais ruminantes recebendo dietas contendo entre 10 a 15% de farelo ou torta de mamona não destoxificados (Albin et al., 1969; Santana et al., 1971; Oliveira et al., 2008). Em razão da intensa atividade proteolítica microbiana ruminal (Wallace et al., 1997) especula-se que a ricina seja total ou parcialmente hidrolisada no rúmen, reduzindo seu efeito tóxico no animal hospedeiro quando ingerida (Oliveira et al., 2008).

Adicionalmente, aumentos na síntese e eficiência de síntese de proteína microbiana ruminal com a destoxificação do farelo de mamona foram observados em

ovinos, mas confundimentos provocados pelo maior consumo de componentes digestíveis da dieta não permitiram avaliações do efeito isolado da inativação da ricina sobre a microbiota ruminal (Oliveira et al., 2008). A eliminação de confundimentos desta natureza, por sua vez, pode ser alcançada utilizando-se sistemas *in vitro* de crescimento microbiano. Especula-se que a hidrólise da ricina por proteases microbianas possa disponibilizar polipeptídios ativos de ricina, reduzindo a síntese protéica microbiana, semelhante aos efeitos observados dos hidrolisados por tripsina em *Escherichia coli* (Hass-Kohn, 1980).

Para avaliação da atividade proteolítica ruminal sobre proteínas específicas faz-se necessário o uso de técnicas que permitam separar, identificar e quantificar proteínas. Entre as técnicas disponíveis, a eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) seguidos por análise densitométrica e dosagem de proteína total se destacam pela relativa simplicidade, rapidez e alto valor informativo. Em função destas características, esta tem sido extensivamente utilizada para avaliações de proteólise e degradação ruminal de grupos específicos de proteínas de alimentos em sistemas *in vitro* ou *in situ*, permitindo ainda estimações dos parâmetros de cinética de proteólise e degradação dos mesmos (Nugent et al., 1983; Spencer et al., 1988; Romagnoto et al., 1994; Tanner et al., 1994; Chiou et al., 1999; Sadeghi & Shawrang, 2008).

Em razão da ausência de comprovações sobre a capacidade de proteólise ruminal da ricina bem como seus efeitos sobre a microbiota ruminal, avaliou-se o efeito da incubação de inóculo ruminal *in vitro* com proteínas solúveis de mamona sobre a degradação da ricina por meio de análise eletroforética e densitométrica, bem como o efeito da desnaturação de proteínas solúveis de mamona sobre a taxa instantânea de crescimento microbiano (DO-600nm) e a concentração média de amônia no meio.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 3x3 referente a três fontes de proteína solúvel (tripticase, farelo de mamona em estado intacto ou em estado desnaturado com óxido de cálcio) e três doses de proteína solúvel (0,42, 0,84 e 1,64 g/L). Foram realizadas incubações ruminais *in vitro* em frascos de vidro de 50 mL hermeticamente fechados. As proporções de tampão, inóculo ruminal, soluções nutritivas e fontes de proteína estão apresentadas na Tabela 1. Para análise da degradação ruminal da ricina, ainda avaliou-se branco (sem inóculo) do tratamento com extrato bruto de proteína intacta de FM na dose de 0,83g/L e tratamento com inóculo, mas sem fonte de proteína.

A solução tampão de McDougall constituiu-se de 9,80 g de NaHCO₃; 4,65 g de Na₂HPO₄*2H₂O; 0,57 g de KCl; 0,12 g de MgSO₄*7H₂O e 0,04g de CaCL₂, diluídos com água destilada até o volume de 1.000 mL, cujo valor de pH foi ajustado para 6,7, imediatamente antes da incubação, utilizando-se CO₂. Foi utilizado líquido de rúmen de um bovino em crescimento fistulado no rúmen, recebendo dieta contendo, com base na MS, 70% de silagem de milho e 30% de ração concentrada (77,90% de milho grão moído, 18,31% de farelo de soja, 0,80% de uréia + sulfato de amônio, 1% de cloreto de sódio, 1% de fosfato bicálcico, 0,66% de bicarbonato de sódio e 0,34% de óxido de magnésio). Após a coleta, o líquido foi filtrado em quatro camadas de gaze, acondicionado em garrafa térmica com fechamento hermético e transportado imediatamente para o laboratório, aonde foi mantido a 39°C por 30 minutos. Posteriormente, com a separação das partículas, foi obtido o líquido da fase mediana do frasco, sendo esse utilizado como inóculo.

Tabela 1 – Quantidades (mL) de tampão McDougall, inóculo ruminal, soluções nutritivas e fontes de proteína utilizadas nos meios de cultivo *in vitro* dos tratamentos experimentais

	Fontes de proteína solúveis (g/L)								
	Trypticase			Extrato bruto de farelo de mamona solúvel em pH 3,8 (EBP)					
				Intacto			Desnaturado ¹		
	0,42	0,83	1,67	0,42	0,83	1,67	0,42	0,83	1,67
Solução McDougall	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00
Líquido ruminal	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Solução de 5%glicose	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Trypticase (10g/L)	1,25	2,50	5,00						
EBP intacto (10g/L)				1,25	2,50	5,00			
EBP desnaturado (10g/L) ¹							1,25	2,50	5,00
Água deionizada	3,75	2,50		3,75	2,50		3,75	2,50	
Total	30,0	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00		30,00	30,00

¹obtido de farelo de mamona tratado com 60g de CaO/kg.

Para obtenção do extrato bruto protéico, duas amostras contendo 300 gramas cada de farelo de mamona foram submetidas ao tratamento com 0 (proteína intacta) ou com 60g (proteína desnaturada) de CaO/kg de farelo. O produto alcalino foi diluído em água na relação 1:10, misturado ao farelo de mamona, permanecendo por um período de 18 horas (uma noite), sendo então seco em estufa ventilada à 65°C durante 72 horas. Após este procedimento foram retiradas 30 alíquotas de 10 g de cada tratamento, para posterior extração das proteínas solúveis.

O extrato bruto concentrado (10 g/L) de proteínas solúveis do farelo mamona (EBP) em estado intacto ou desnaturado foi obtido da seguinte maneira: Adicionou-se uma alíquota (10 g) de FM (estado intacto ou desnaturado), em 30 tubos tipo Falcon (30 tubos por tratamento). Em seguida, foram adicionados em cada tudo 40 mL de tampão de extração TRIS 0,5 M (pH 3,8 ajustado com ácido sulfúrico 37%) por tudo e centrifugados a 9.739 xg durante 20 minutos. Os sobrenadantes de cada tratamento (855 mL) foram então misturados, sendo medido o volume. Após serem coletadas alíquotas de 5 mL do sobrenadante para dosagem de proteína total e análise eletroforética, o líquido restante foi imediatamente concentrado (em média 10x) em liofilizador para obtenção de concentração final de 10 g/L de proteína, ressuspendendo-se em água deionizada. Ao final, obteve-se uma relação de 3,53 g de farelo de mamona por mL de EBP concentrado de mamona (10 g/L de proteína), os quais permitiram obter relações de 0,15; 0,30 e 0,60 kg de farelo de mamona por litro de meio de cultivo ruminal *in vitro*, para doses 0,42; 0,84 e 1,68 g/L de proteína total. Essas relações foram utilizadas para estimar a capacidade de destoxificação da ricina pela microbiota ruminal, em equivalente massa de faralo de mamona sem tratamento alcalino.

Os frascos de vidro contendo meios de cultura foram saturados com gás dióxido de carbono e incubados à temperatura de 39°C, por 48 horas. Foram retiradas amostras

de 3 mL nos tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas a partir do início da incubação, sendo 1mL para análise imediata de crescimento microbiano, via variação da densidade óptica (DO – 600 nm) e os 2 mL restantes submetidos à centrifugação a 9.739 xg durante 20 minutos. Do sobrenadante, foram retiradas duas alíquotas, sendo uma imediatamente congelada a -20°C para posterior avaliação da concentração de amônia (Chaney & Marbach, 1962) e outra para análise de ricina.

Para avaliação da capacidade de destoxificação da ricina pela microbiota ruminal, analisou-se o desaparecimento das bandas de ricina ao longo do tempo (análise qualitativa), separadas por eletroforese em gel a 15% de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) de acordo com o método proposto por Laemmli (1970), seguidos de quantificação do teor de ricina no meio de cultivo após análise densitométrica dos géis e dosagem de proteína total. A alíquota do meio de cultivo para análise de ricina foi concentrada em liofilizador de maneira a obter concentração final acima de 1g/L para análise densitométrica.

Realizou-se corrida eletroforética de alíquotas de EBP não concentrado do FM e do meio de cultivo ao longo do tempo de incubação. As alíquotas do meio de cultivo foram concentradas em liofilizador, obtendo-se concentrações de proteína acima de 1g/L de modo a permitir a visualização das frações proteicas no gel (SDS-PAGE). Alíquotas de 30 µL do meio de cultivo concentrado (com 1g de proteína/L) foram colocadas em tubos “eppendorf”, sendo adicionado 10µL de tampão de amostra (4X), contendo solução tampão Tris HCL 60 mM, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,025% de azul de bromofenol e 0,025% de B-mercaptoetanol. Logo em seguida, ferveu-se por 5 minutos a 100°C, sendo então aplicado 20 µL desta mistura em cada poço do gel. A corrida eletroforética foi inicialmente conduzida a 50 Volts, até a banda do corante atingir a superfície do gel de separação, quando foi

aumentada para 140 Volts, permanecendo assim até o final da corrida, definido quando o corante se aproximou da extremidade inferior do gel. Terminada a corrida, os géis foram retirados da placa e colocados em solução corante (1,5 g de Coomassie Brilliant Blue G, 90 mL de ácido acético glacial, 450 mL de metanol e 460 mL de água deionizada) por 24 horas e logo depois em solução descorante (100 mL de ácido acético glacial, 500 mL de metanol e 400 mL de água deionizada) por 12 horas. Os géis, após a descoloração, foram scaneados, sendo as imagens utilizadas para análise de densitometria. A identificação das frações de ricina foi realizada utilizando-se marcadores de massa molecular entre 14 a 66 KDa (Sigma, USA).

Uma outra alíquota do extrato bruto protéico e do meio de cultivo foi retirado para determinação de proteína total utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A análise de densitometria dos géis foi realizada nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, obtendo-se as áreas totais e aquelas correspondentes às frações da ricina, segundo procedimentos descritos por Retamal et al. (1999). A concentração de ricina no extrato bruto protéico e no meio de cultivo foi determinado conforme equação a seguir: concentração de ricina ($\mu\text{g/mL}$) = PTN total x (área ricina/área total), em que: PTN total = concentração de proteína total no extrato bruto ou na alíquota do meio de cultivo ($\mu\text{g/mL}$); área ricina = área correspondente às frações A e B da ricina presente no extrato bruto, obtida por análise densitométrica; área total = área total de proteínas presentes no extrato bruto obtida por análise densitométrica.

Para avaliação da cinética de degradação ruminal da ricina, os valores de concentração de ricina no meio de cultura ao longo do tempo de incubação *in vitro*, nas três doses de proteína do tratamento com farelo de mamona controle, foram submetidas ao modelo de crescimento assintótico de primeira ordem $Y = b*(1-\text{Exp}^{-c.t})$, em que: Y

= desaparecimento da ricina no tempo t (horas); b = fração da ricina potencialmente degradável no rúmen (%); c = taxa de degradação da fração b (h^{-1}). A fração efetivamente degradada no rúmen da ricina (ED) foi determinada pela seguinte equação: $ED (\%) = b \cdot (c / (c + td))$, em que td corresponde a taxa de diluição ruminal (h^{-1}), sendo utilizados valores fixos de 0,05, 0,10 e 0,15. Os parâmetros de cinética de degradação da ricina foram avaliados em função da dose de proteína, estimados por equações de regressões em função da concentração inicial de ricina e da relação em equivalente massa de faralo de mamona não destoxificado.

A taxa de crescimento microbiano (μ) de cada tratamento foi estimada segundo equação descrita em Russell (2002): $\mu = (\ln DO_t - \ln DO_0) / t$, em que: $\ln DO_t$ = logaritmo natural da densidade óptica no tempo que inicia a fase estacionária de crescimento; $\ln DO_0$ = logaritmo natural da densidade óptica no tempo zero; t = tempo que inicia a fase estacionária de crescimento.

As observações de taxa de crescimento microbiano e de concentração amônia (média ao longo do tempo de incubação) foram submetidas à análise de variância e aplicados os seguintes contrastes: fonte de proteína solúvel (tripticase vs mamona); dose de proteína solúvel; interação entre fonte e dose de proteína solúvel; desnaturação de proteína solúvel de mamona (mamona em estado intacto vs desnaturado); interação entre desnaturação e dose de proteína solúvel de mamona; efeito de dose dentro de fonte de proteína solúvel. Em todos os procedimentos estatísticos utilizou-se nível de 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

Resultados e Discussão

As análises eletroforética (PAGE) e densitométrica dos extratos brutos de proteínas solúveis em pH 3,8 de farelo de mamona (EBP) em estado intacto ou desnaturado constam na Figura 1. Verifica-se a presença de dois grupos no EBP em estado intacto, a ricina (aproximadamente 36 e 29 KDa) e um grupo de proteínas de reserva de sementes (aproximadamente 18 KDa) (Campos et al., 2008).

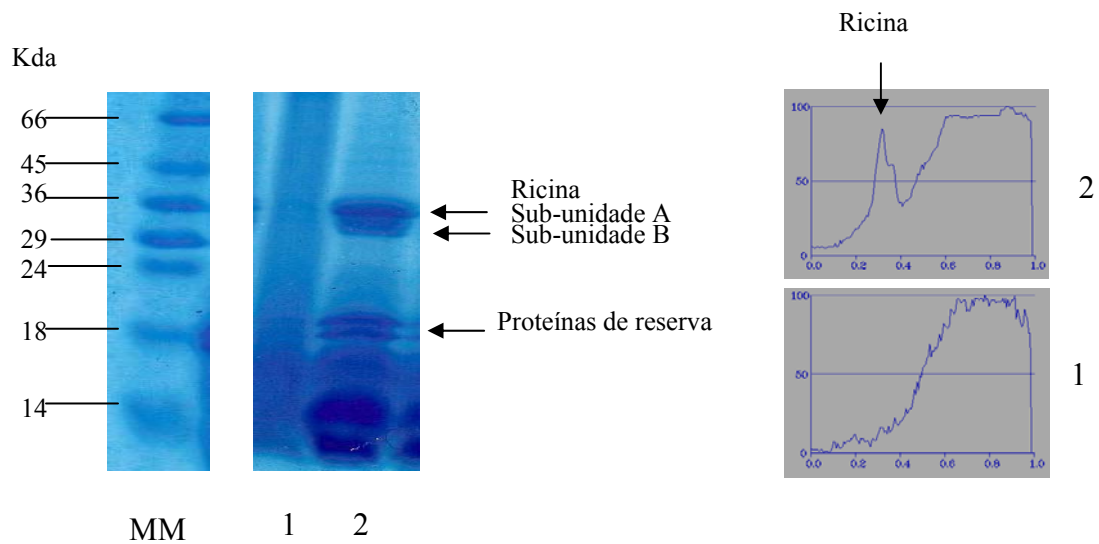


Figura 1 – Eletroforese em gel (SDS-PAGE) do marcador de massa molecular (MM) entre 66 a 14 KDa e do extrato bruto de proteínas solúveis em pH 3,8 não concentrado de farelo de mamona intacto (controle, 1,045 g/L de proteína tota, poço 2) e desnaturado com 60g de CaO/kg (poço 1 contendo 0,965 g/L de proteína total). A ricina é identificada pelas duas bandas (A com aproximadamente 36 KDa e B com 29 KDa). As proteínas com 18 KDa representam um grupo de proteínas de reserva de sementes de mamona. Análise densitométrica do gel dos extratos protéicos (poço 1 e poço 2) com os picos de ricina indicados pela seta. A ricina representou 14,6% da área protéica do poço 1 e 0,4% do poço 2.

No EBP desnaturado não se visualiza as frações protéicas, notadamente da ricina, demonstrando a eficácia de destoxificação do tratamento com 60 g de CaO/kg de farelo de mamona. Em adição, fragmentos de polipeptídios (22 e 18 KDa) ativos de ricina descritos como inibidores da síntese protéica em células procarióticas (Creppy et al., 1980; Hass-Kohn, 1980), também não estão presentes no EBP tratado com CaO, garantindo-se a inibição de efeitos tóxicos da ricina sobre a microbiota ruminal, para este tratamento.

De acordo com a análise densitométrica, a ricina representou 14,6% da área total das proteínas solúveis intactas (poço 1) e 0,4% das proteínas desnaturadas com CaO (poço 2), estimando-se concentrações de 1,46 g/L e 0,04 g/L de ricina nos respectivos EBP concentrados. Portanto, a eficácia de desnaturação da ricina com tratamento alcalino foi de 97,3%. A partir desses resultados, estima-se concentrações iniciais de ricina (sem efeito de inóculo ruminal) no meio de cultivo de 61, 122 e 243 µg/mL, para as doses de 0,42, 0,84 e 1,68 g/L de proteínas total, no tratamento com EBP em estado intacto.

A análise eletroforética do meio de cultivo microbiano ruminal *in vitro* com ausência de proteína no meio e com ausência de inóculo ruminal (branco) é apresentada na Figura 2. Observam-se no meio sem proteína, ausências das frações protéicas de massa molecular similares às observadas no EBP de mamona, indicando ausência de contaminação da proteína microbiana sobre a análise. Além disso, as frações de ricina e outras proteínas estão presentes em todos os tempos de incubação (39⁰C) e na mesma intensidade no meio sem inóculo ruminal. Desta forma, garante-se que os desaparecimentos das frações protéicas (ricina e outras) nos géis (SDS-PAGE) seriam influenciados apenas pela atividade microbiana ruminal.

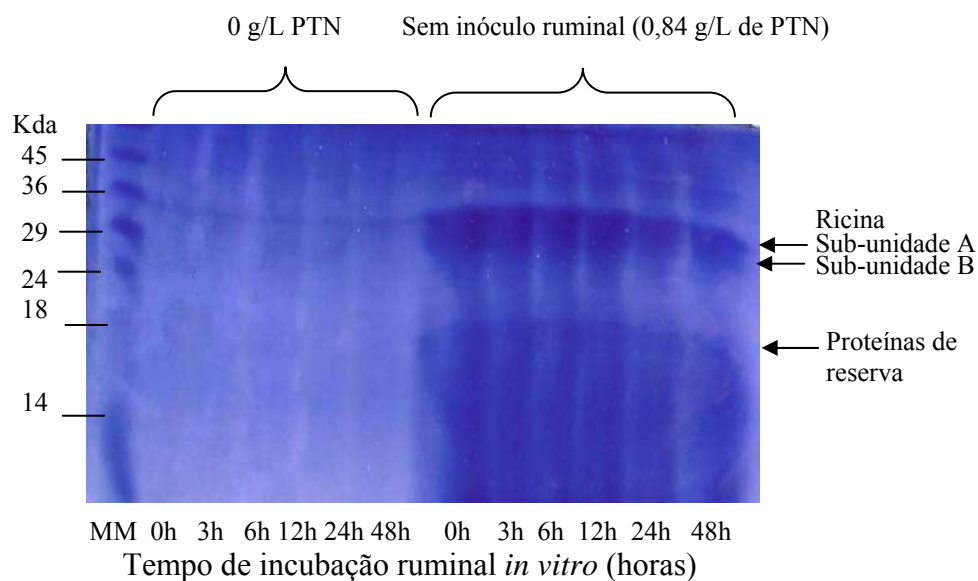


Figura 2 – Análise eletroforética (SDS-PAGE) do meio de cultivo microbiano ruminal *in vitro* função do tempo de incubação, com ausência de proteína no meio e com ausência de inóculo ruminal (branco, contendo inicialmente 0,84g/L de proteína). A ricina é identificada pelas duas bandas (A com aproximadamente 36 KDa e B com 29 KDa) e um grupo de proteínas de reserva de sementes de mamona com 18 KDa.

Os resultados da análise eletroforética da degradação ruminal *in vitro* de três doses de proteína solúvel em pH 3,8 de farelo de mamona em função do tempo de incubação estão apresentados na Figura 3, enquanto a análise densitométrica na Figura 4. As ausências de visualizações das sub-unidades de ricina nos géis e de picos de unidade de densidade relativa referente à ricina, é reflexo da atividade proteolítica microbiana ruminal sobre a toxina. Neste sentido, verifica-se o desaparecimento das sub-unidades de ricina no gel (SDS-PAGE) entre os tempos 3 a 12 horas de incubação ruminal entre as doses 0,42 a 1,68 g/L de proteína total, demonstrando a capacidade da microbiota ruminal em destoxificar a ricina. Em adição, observa-se menor velocidade de redução dos picos referentes à ricina na análise densitométrica em função do tempo, com o aumento na dose de proteína total, decorrência da saturação dos sistemas enzimáticos microbianos responsáveis pela degradação da ricina.

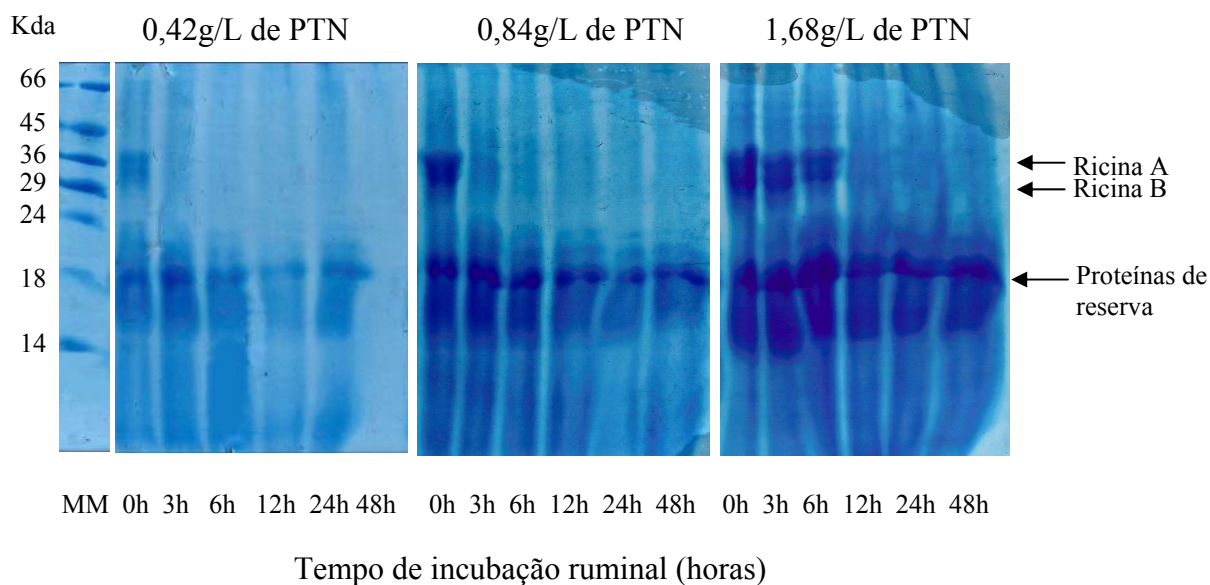


Figura 3 – Análise eletroforética (SDS-PAGE) do meio de cultivo microbiano ruminal *in vitro* em função do tempo de incubação, em três doses de extrato bruto de proteínas solúveis em pH 3,8 de farelo de mamona (0,42, 0,84 e 1,68 g/L). A ricina é identificada pelas duas bandas (A com aproximadamente 36 KDa e B com 29 KDa) e um grupo de proteínas de reserva de sementes de mamona com 18 KDa. Marcador de massa molecular (MM) entre 14 a 66 KDa.

No entanto, o grupo de proteínas de reservas de sementes de mamona identificadas com aproximadamente 18 KDa mostrou-se resistente a proteólise ruminal. As proteínas de reservas compreendem grupo amplamente distribuído em sementes de oleaginosas e de outras plantas, formado por diversas classes de proteínas, entre as quais se destacam as proteinases e os inibidores de proteinases. Os inibidores de proteinases desempenham importante função na regulação de proteínas endógenas das sementes, bem como proteção contra ação de proteinases microbianas e de insetos (Ryan, 1973). Por outro lado, os mesmos são reconhecidamente resistentes à ação proteolítica em razão da elevada presença de pontes dissulfeto (Lajolo & Genovese, 2002).

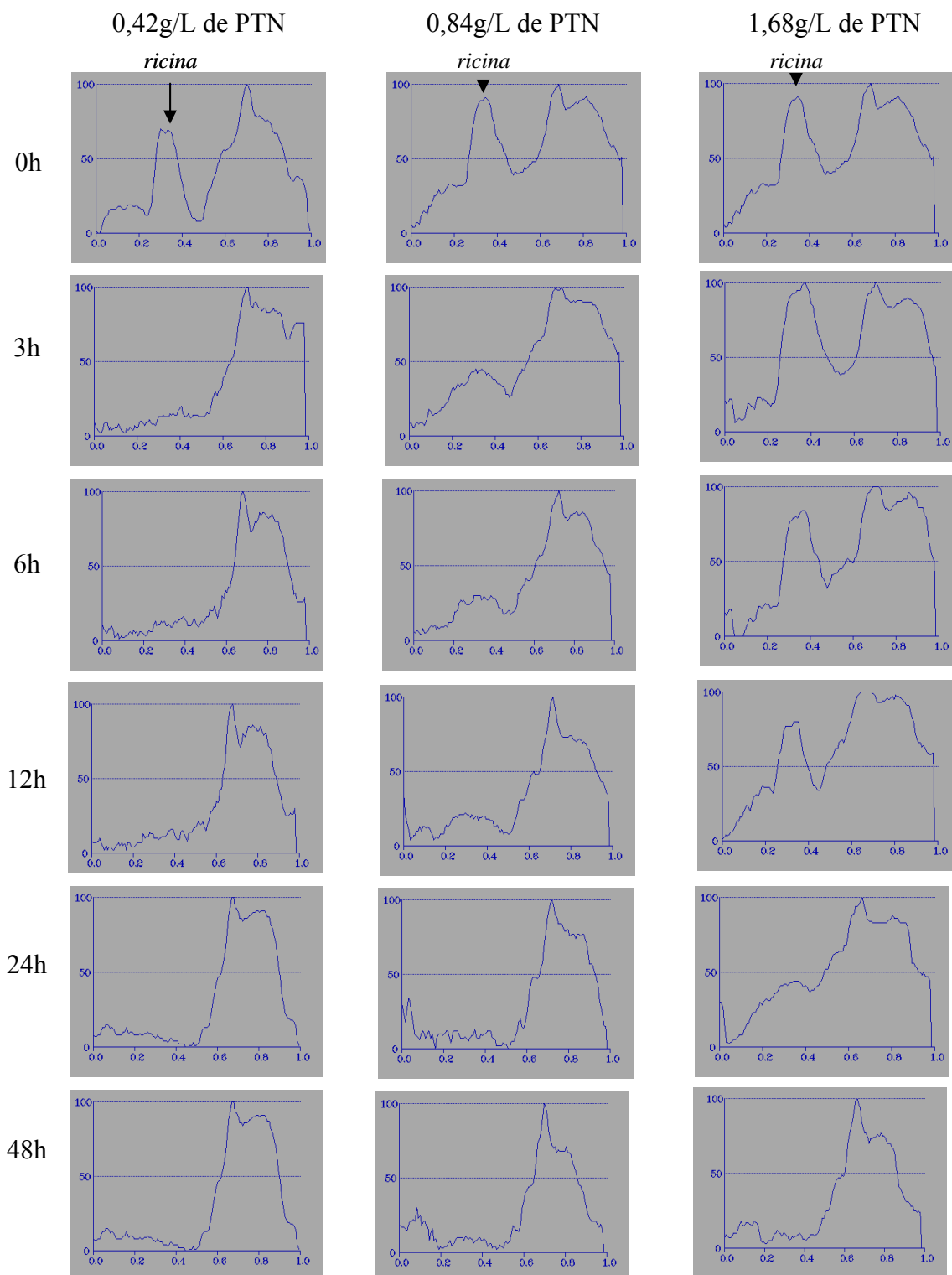


Figura 4 – Análise densitométrica de gel (SDS-PAGE) de proteínas presentes no meio de cultivo microbiano ruminal *in vitro* função do tempo de incubação, em três doses de extrato bruto de proteínas solúveis em pH 3,8 de farelo de mamona (0,42; 0,84 e 1,68 g/L). O eixo das ordenadas representa unidade de densidade relativa e no eixo das abscissas as frações protéicas expressas em unidade de massa molecular relativa (do maior para o menor valor). Os picos entre as frações 0,3 e 0,4 representam as subunidades de ricina, indicadas pela seta.

Na Figura 5 podem ser verificados as concentrações médias de ricina no meio de cultivo microbiano ruminal *in vitro*, bem como seu perfil médio de desaparecimento ao longo do tempo de incubação, nas três doses de proteína total de EBP intacto. Os parâmetros de cinética de proteólise ruminal da ricina em função de três doses de EBP são apresentados na Tabela 2, enquanto as equações de regressão em função da concentração inicial de ricina ou da quantidade em equivalente farelo de mamona no meio de cultivo ruminal, estão descritas na Tabela 3.

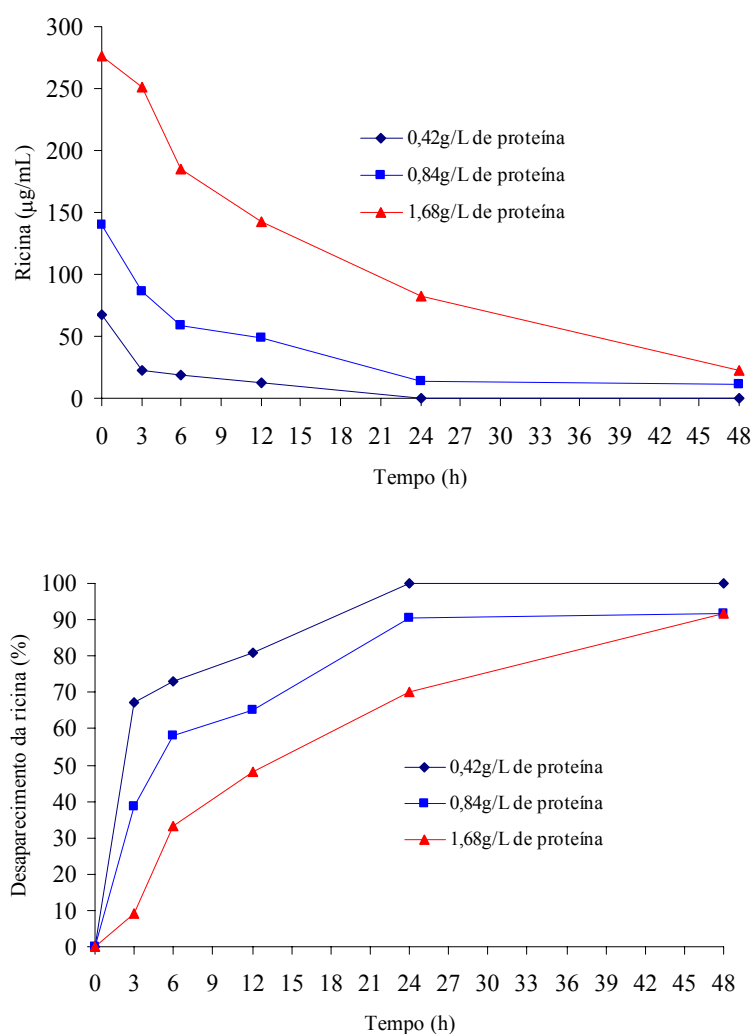


Figura 5 - Concentração média de ricina no meio de cultivo microbiano ruminal *in vitro* e perfil médio de desaparecimento da ricina ao longo do tempo de incubação, nas doses de 0,42; 0,84 e 1,68 g/L de EBP intacto.

Tabela 2 – Médias para os parâmetros de degradação ruminal *in vitro* da ricina em função da dose de proteínas de extrato bruto de proteico solúvel em pH 3,8 de farelo de mamona (EBP) em estado intacto

Itens	Dose de EBP (g/L)			Valor-P	CV (%)
	0,42	0,84	1,68		
Fração b ¹ , %	100,00	90,37	91,77	0,0001	1,19
Taxa de degradação da fração b ¹ , %/h	0,2725	0,1504	0,0648	<0,0001	14,74
Fração ED ² (td ³ de 0,05), %	84,50	67,82	51,78	<0,0001	3,21
Fração ED ² (td ³ de 0,10), %	73,15	54,28	36,07	<0,0001	4,57
Fração ED ² (td ³ de 0,15), %	64,50	45,25	27,67	<0,0001	5,62

¹Fração b = potencialmente degradável; ²ED = efetivamente degradada; ³td = taxa de diluição (h⁻¹).

Tabela 3 - Regressões lineares significativas para a fração potencialmente degradável no rúmen da ricina (b), a taxa de degradação ruminal da fração b da ricina (kd) e frações efetivamente degradada no rúmen da ricina (ED) nas taxas de diluição (td) de 0,05, 0,10 e 0,15h⁻¹, em função da concentração inicial de ricina no meio de cultivo (µg/mL) ou da quantidade farelo de mamona não destoxificado (FM) no meio de cultivo (kg/L)

Variável (Y)	Parâmetros da equação	R ²
b (%)	$\hat{Y} = 159,52^* + 0,42^* \times \text{Ricina} - 10,92^* \times \text{Ricina}^{0,5}$	0,96
	$\hat{Y} = 159,53^* + 170,98^* \times \text{FM} - 219,92^* \times \text{FM}^{0,5}$	0,96
kd (h ⁻¹)	$\hat{Y} = 0,3153^* - 0,0011^* \times \text{Ricina}$	0,92
	$\hat{Y} = 0,3143^* - 0,4347^* \times \text{FM}$	0,92
ED com td de 0,05h ⁻¹ (%)	$\hat{Y} = 92,52^* - 0,17^* \times \text{Ricina}$	0,96
	$\hat{Y} = 92,33^* - 69,63^* \times \text{FM}$	0,96
ED com td de 0,10h ⁻¹ (%)	$\hat{Y} = 82,26^* - 0,20^* \times \text{Ricina}$	0,96
	$\hat{Y} = 82,06^* - 79,95^* \times \text{FM}$	0,96
ED com td de 0,15h ⁻¹ (%)	$\hat{Y} = 73,29^* - 0,19^* \times \text{Ricina}$	0,96
	$\hat{Y} = 73,08^* - 78,16^* \times \text{FM}$	0,96

* significativo a 5%.

Verificou-se elevada fração potencialmente degradável ruminal (b) da ricina (entre 90,33 a 100%) e um comportamento raiz-quadrático ($P < 0,05$) com aumento na dose de proteína do EBP de mamona intacto, estimando-se valores máximos de 88,82% na concentração inicial de ricina de 112,83 $\mu\text{g/mL}$ e de 88,81% na quantidade de 0,4136 kg de FM/L de meio de cultivo ruminal. A fração efetivamente degradada ruminal (ED) da ricina decresce linearmente ($P < 0,05$) com aumento na concentração inicial de ricina ou na quantidade de FM, em razão da redução ($P < 0,05$) linear na taxa de degradação da fração potencialmente degradável, por mecanismos de saturação dos sistemas enzimáticos à concentração de substratos (Lehninger et al., 1995). Apesar disso, observou-se elevada taxa de degradação da ricina ($0,2725 \text{ h}^{-1}$) notadamente na dose de 0,42 g/L de proteína, equivalente à concentração inicial de 60,83 μg de ricina/mL ou 0,15 kg de FM/L de meio de cultivo ruminal.

As curvas de crescimento microbiano ruminal (densidade óptica – 600 nm) e concentração de amônia, ao longo de 48 horas de fermentação *in vitro*, encontram-se nas Figuras 6 e 7. Os efeitos de fontes e doses de proteína solúvel sobre a taxa específica de crescimento microbiano ruminal (μ) e concentração média de amônia em meios de cultura ao longo de 48 horas de fermentação *in vitro* estão descritos na Tabela 4. Houve interação ($P < 0,05$) sobre a taxa instantânea de crescimento microbiano (μ) entre dose e fonte de proteína solúvel e entre dose e desnaturação do extrato bruto protéico (EBP) de farelo de mamona (EBP). Incremento linear ($P < 0,05$) na μ é observado com aumento na dose de tripticase. Por outro lado, aumento na dose de EBP intacto de farelo de mamona reduz ($P < 0,05$) de forma quadrática a μ , sendo estimando o valor mínimo de $-0,0038 \text{ h}^{-1}$ na dose de 1,444 g/L. A μ aumenta ($P < 0,05$) com desnaturação do EBP de farelo de mamona, mas não é afetado pela dose de EBP de mamona em estado desnaturado.

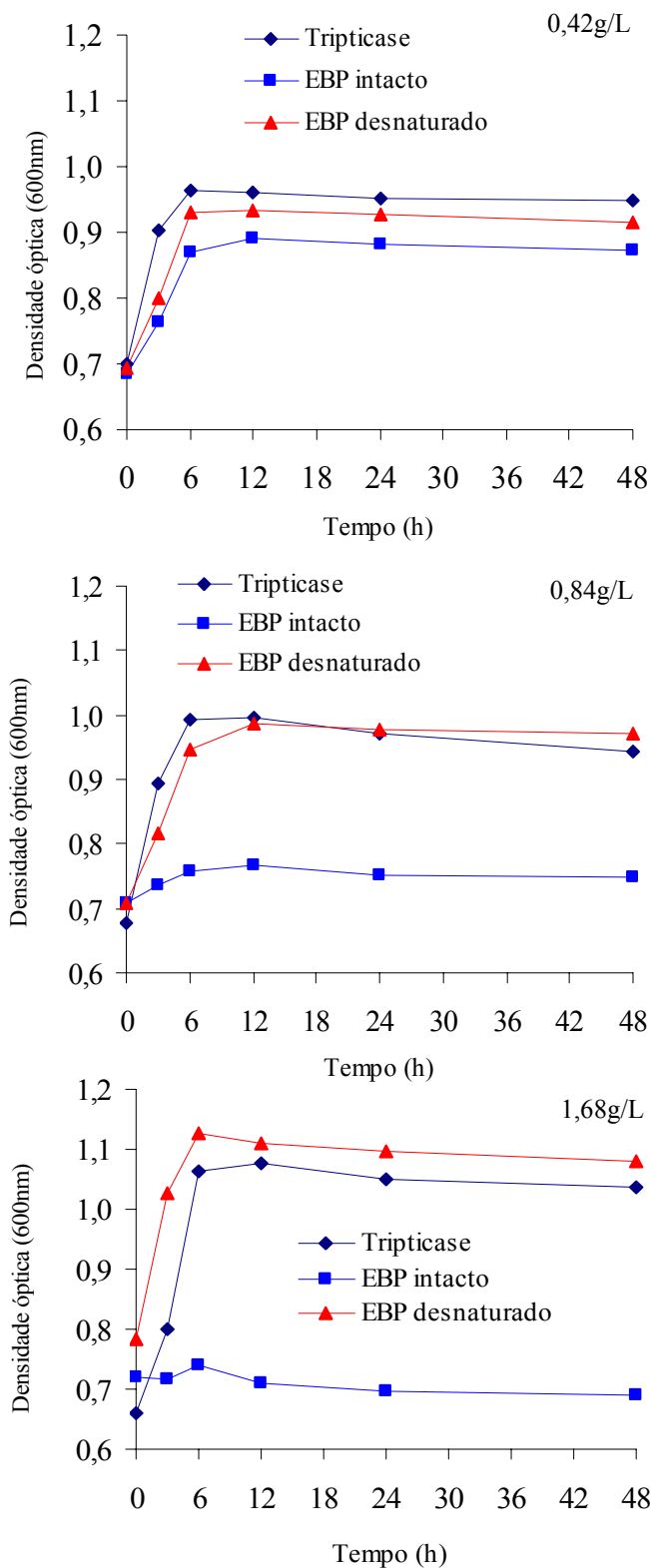


Figura 6 – Crescimento microbiano ruminal (densidade óptica – 600 nm) ao longo de 48 horas de fermentação *in vitro* em função de três fontes de proteína solúvel (tripticase, extrato bruto de farelo de mamona (EBP) em estado intacto ou em estado desnaturado com óxido de cálcio) e três doses de proteína solúvel (0,42; 0,84 e 1,68 g/L).

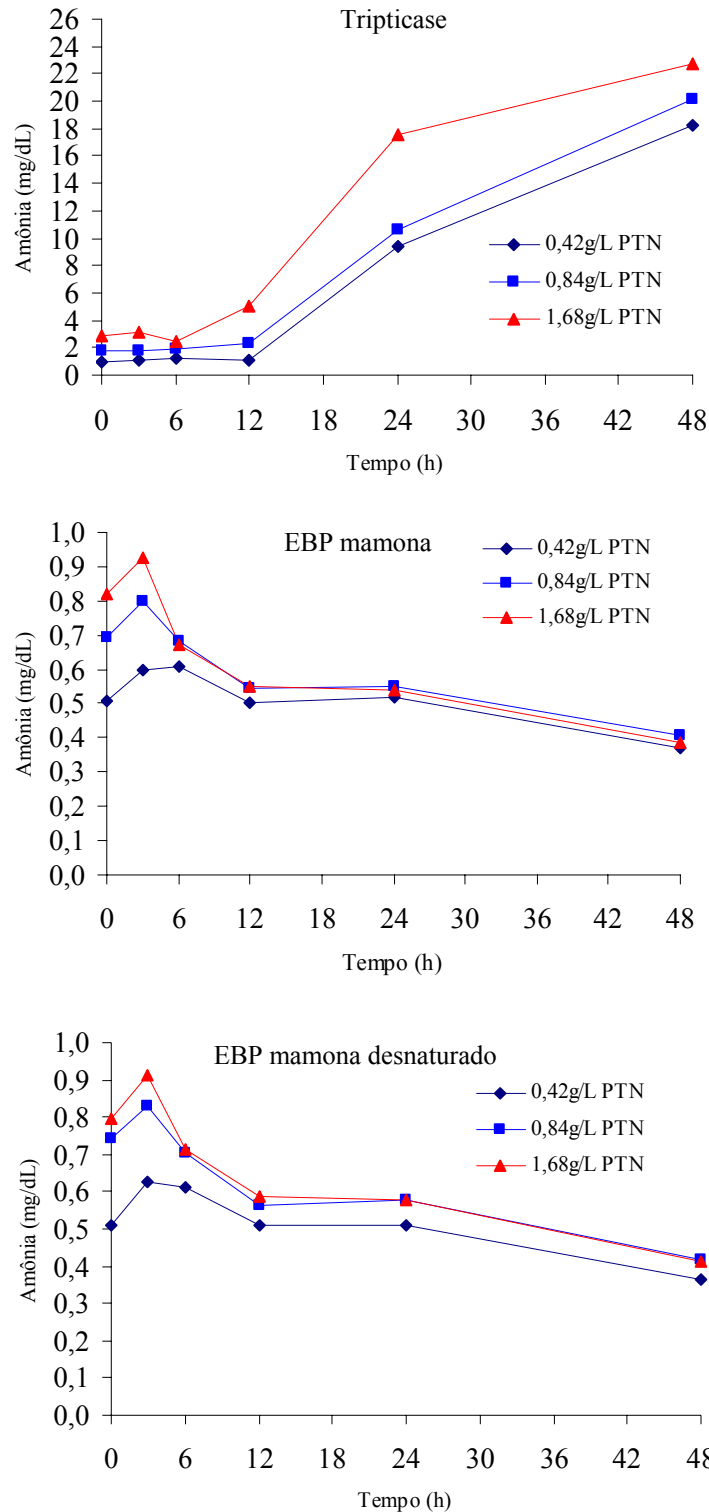


Figura 7 – Concentração de amônia no meio de cultivo microbiano ruminal ao longo de 48 horas de fermentação *in vitro*, em função de três fontes de proteína solúvel (tripticase, extrato bruto de farelo de mamona (EBP) em estado intacto ou em estado desnaturado com óxido de cálcio) e três doses de proteína solúvel (0,42; 0,84 e 1,68 g/L).

Tabela 4 - Efeitos de fontes e doses de proteína solúvel sobre a taxa específica de crescimento microbiano ruminal (μ) e concentração média de amônia em meios de cultura ao longo de 48 horas de fermentação *in vitro*

Itens	μ (%/h)	Amônia (mg/dL)
Fonte e dose de proteína		
Trypticase		
0,42g/L	0,0533	5,33
0,84g/L	0,0639	6,45
1,68g/L	0,0797	8,94
Extrato bruto protéico solúvel de farelo de mamona (EBP) ¹		
Intacto		
0,42g/L	0,0394	0,52
0,84g/L	0,0112	0,61
1,68g/L	-0,0016	0,65
Desnaturado ²		
0,42g/L	0,0492	0,52
0,84g/L	0,0484	0,64
1,68g/L	0,0607	0,67
Efeitos (valor-P)		
Fonte (tripticase vs EBP)	<0,0001	<0,0001
Dose de proteína	0,8019	0,0003
Fonte x dose de proteína	0,0380	<0,0001
Desnaturação do EBP de farelo de mamona	<0,0001	0,9560
Desnaturação x dose de proteína de EBP	0,0201	0,9928
Dose de proteína (fonte)		
Trypticase	0,0030 ³	<0,0001 ⁵
EBP de mamona		
Intacto	0,0001 ⁴	0,9650
Destoxificado	0,1394	0,9540
Coefficiente de variação (%)	17,66	22,78

^{1/} extrato bruto de proteínas solúveis em tampão pH 3,8 do farelo de mamona; ^{2/} farelo de mamona tratado com 60g de CaO/kg, diluído em água (1:10).

^{3/} $\hat{Y} = 0,0454 + 0,0207.X$ ($R^2 = 0,99$). ^{4/} $\hat{Y} = 0,0821 - 0,1190.X + 0,0412.X^2$ ($R^2 = 0,91$). ^{5/} $\hat{Y} = 4,0810 + 2,8795.X$ ($R^2 = 0,99$).

Esses resultados indicam efeitos inibitórios da ricina ou de oligopeptídios derivados da proteólise extracelular microbiana da ricina, sobre a síntese de proteína microbiana ruminal, à semelhança do observado por Hass-Kohn et al. (1980).

Nesse trabalho, os autores ao avaliarem o efeito da disponibilidade de ricina (450 µg/mL) na formas intacta; com as sub-unidades A e B separadas; hidrolisados de ricina por tripsina, com massa molecular 22 e 18 KDa (Creppy et al., 1980); ou os mesmos hidrolisados mas desnaturados com fervura, observaram elevada inibição da síntese protéica em células livres ou em ribossomos purificados de *Escherichia coli* (72,7 a 94,5%), somente na presença dos hidrolisados de ricina não desnaturados.

Em adição, salienta-se que o processo de desnaturação protéica, por si, apresenta-se como fator negativo sobre a síntese de proteína microbiana, pois reduz a disponibilidade de amoníacos da proteína dietética por redução na taxa de proteólise (Broderick et al., 1991; Stern et al., 1994). Assim, reforçam-se os argumentos apresentados que o aumento ($P < 0,05$) da taxa de crescimento microbiano ruminal com a desnaturação do EBP de farelo de mamona com CaO ocorreu por reduções de efeitos inibitórios da ricina (ou hidrolisados por proteases microbianas) sobre a síntese protéica.

O mecanismo de ação da ricina ou de seus hidrolisados sobre a microbiota ruminal até o momento não foi descrito, mas em células eucarióticas os mecanismos estão bem estabelecidos (Olsnes et al., 1974; Endo & Tsuguri, 1987; Endo et al., 1987; Endo & Tsuguri, 1988). A sub-unidade A da ricina é uma enzima que inativa irreversivelmente os ribossomos eucarióticos pela clivagem de ligações N-glicosídicas no RNA ribossomal 28 S na posição 4324, removendo-se o resíduo adenina, impedindo o processo de alongamento da cadeia polipeptídica (Endo & Tsuguri, 1988). A sub-unidade B é uma lecitina que se encontra ligada à subunidade A através de pontes dissulfeto, e permite a entrada desta última, por endocitose, para o citosol. Assim, se for

quebrada as ligações entre as duas sub-unidades as partes resultantes não são tóxicas em células eucarióticas (Audi et al., 2005).

Endo & Tsuguri (1988) observaram que, embora a subunidade A da ricina tenha sítios de ligação na posição A-2600 de RNA ribossomal 23S de *Escherichia coli*, a toxina não inativa ribossomos intactos em razão da presença de proteínas ribossomais, que protegem a organela contra a ação da ricina.

Diante do exposto, verifica-se que os mecanismos de ação da ricina ou de seus hidrolisados por proteases em organismos procarióticos ainda não estão claros, o que remete à necessidade de estudos mais detalhados, notadamente sobre a diversa população microbiana ruminal.

Interações ($P < 0,05$) também foram observadas na concentração média de amônia entre dose e fonte de proteína solúvel, mas não houve efeitos de desnaturação do EBP de farelo de mamona e de interações entre desnaturação e dose de EBP.

Basicamente, a concentração de amônia ruminal em sistemas fechados representa o balanço entre produção (desaminação de aminoácidos disponíveis) e utilização (assimilação de amônia para síntese de aminoácidos) de amônia (Broderick et al., 1991). A desaminação depende principalmente da população microbiana predominante e aumenta em situações de excesso de aminoácidos disponíveis associado à deficiência de esqueletos de carbono e de energia. A assimilação da amônia, por sua vez, depende da disponibilidade de energia, de esqueletos de carbono e de nutrientes essenciais (ácidos graxos de cadeia ramificada, minerais e outros-cofatores) (Owens & Zinn, 1988; Wallace et al., 1997). Neste sentido, como a disponibilidade de energia foi mantida estável entre os tratamentos, a menor ($P < 0,05$) concentração média de amônia no tratamento com EBP de farelo de mamona em relação à tripticase, pode ser reflexo da menor disponibilidade de aminoácidos em razão da incompleta degradação do grupo de

proteínas de reservas com 18 KDa (principalmente inibidores de proteases) e de outras de proteínas de baixa massa molecular, majoritárias, conforme verificado na Figura 3.

Por outro lado, esperar-se-ia reduções na concentração de amônia com a desnaturação do EBP de farelo de mamona com o tratamento alcalino (Waltz & Loerch, 1986), pois além de perda da função, grupos hidrofóbicos são expostos durante a desnaturação, resultando numa diminuição da solubilidade da proteína em soluções aquosas. A solubilidade da proteína, por sua vez, é um dos fatores chaves para iniciar a atividade proteolítica, pois favorece os mecanismos de adesão da proteína alimentar à superfície bacteriana (Broderick et al., 1991). Desta forma, a desnaturação, por si, pode ter reduzido a disponibilidade de aminoácidos para a microbiota ruminal e consequentemente a produção de amônia.

Assim, a ausência de efeito da desnaturação do EBP de farelo de mamona sobre a concentração de amônia indica inibições da ricina ou de seus hidrolisados, sobre a utilização da amônia disponível, o que compensou a possível maior produção de amônia.

Os decréscimos na taxa de crescimento microbiano ruminal *in vitro* em função da concentração inicial de ricina ou da quantidade em equivalente farelo de mamona no meio de cultivo, estão apresentados na Figura 7. Verificou-se decréscimo de 100% no crescimento microbiano na concentração inicial no meio de cultivo de ricina de 232 µg/mL ou 0,548 kg de farelo de mamona/L. A concentração de ricina que inibe 50% do crescimento microbiano foi estimada em 89 µg/mL, valor inferior ao observado por Hass-Kohn et al. (1980) de 125 µg/mL sobre a síntese protéica em *Escherichia coli*. Além disso, a dose observada no presente trabalho, representou 8.900 vezes a concentração necessária para inibir 50% de ribossomos em células eucarióticas (Lugnier

et al, 1976), confirmando a menor sensibilidade de organismos procarióticos à ação tóxica da ricina (Hass-Kohn et al., 1980).

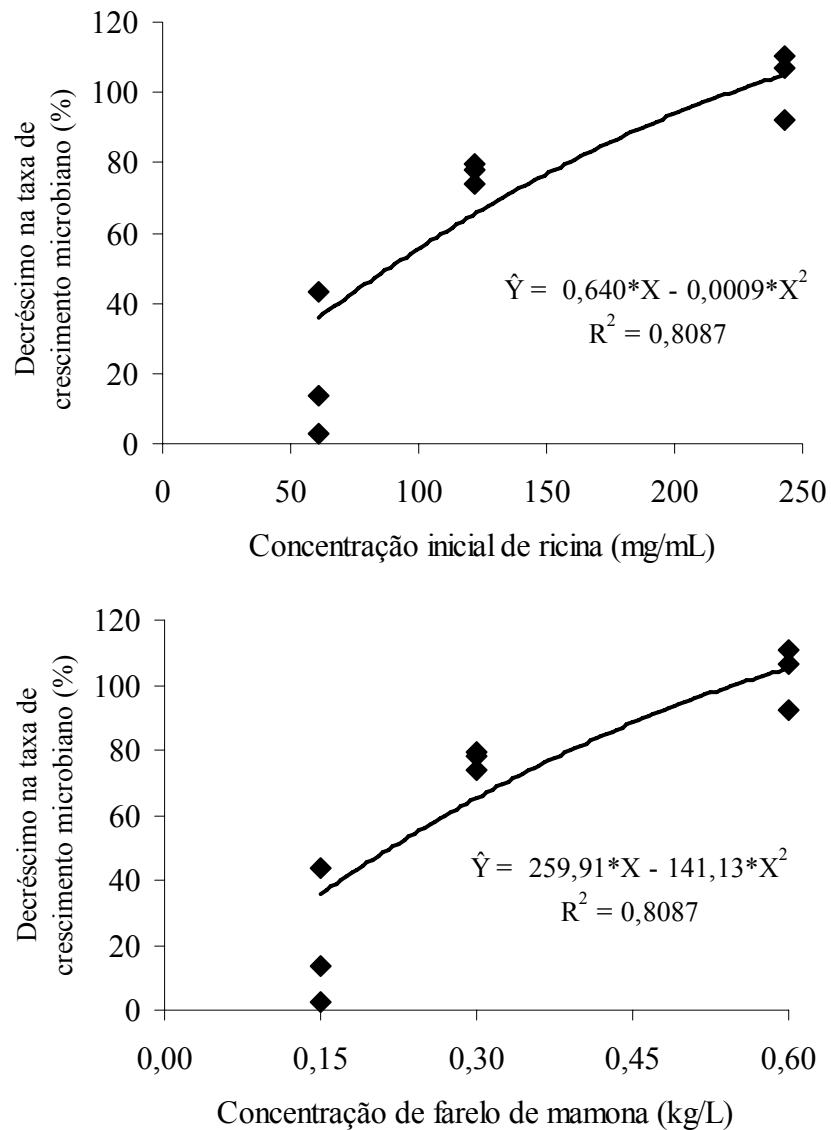


Figura 7 – Decréscimo (%) na taxa de crescimento microbiano ruminal *in vitro* em função da concentração inicial de ricina no meio de cultivo ($\mu\text{g/mL}$) ou em função da quantidade de equivalente farelo de mamona no meio de cultivo (kg/L). Decréscimo (%) = $((\text{taxa de crescimento do tratamento com proteína desnaturada} - \text{taxa de crescimento do tratamento com proteína intacta}) / \text{taxa de crescimento do tratamento com proteína desnaturada}) \times 100$.

* significativo ($P < 0,05$)

Em suma, os resultados permitem demonstrar que a microbiota ruminal é capaz de degradar a ricina, apresentando-se como mecanismo de proteção ao animal hospedeiro contra os seus efeitos tóxicos, uma vez que somente em sua forma intacta (com as duas frações) inativa a síntese protéica em células eucarióticas (Audi et al., 2005). Assim, podem-se explicar as tolerâncias observadas em animais ruminantes alimentados com farelos ou tortas de sementes de mamona sem destoxificação (Albin et al., 1969; Santana et al., 1971; Olveira et al., 2008). Por outro lado, a ricina e/ou produtos da proteólise ruminal da ricina são capazes de inibir a síntese protéica microbiana ruminal, e também pode explicar, pelo menos em parte, o aumento da síntese de nitrogênio microbiano ruminal em ovinos alimentados com farelo ou torta de mamona destoxificado, em relação aos tratamentos sem destoxificação, conforme verificado por Oliveira et al. (2008).

Conclusões

A microbiota ruminal é capaz de degradar a ricina a taxas variáveis, *in vitro*, dependendo da concentração inicial de ricina. Todavia, a desnaturação da toxina com tratamento alcalino aumenta a taxa de crescimento microbiano ruminal *in vitro*, indicando efeitos inibitórios sobre a microbiota ruminal. Neste sentido, recomenda-se a completa destoxificação da ricina no farelo de mamona para seu uso na alimentação de ruminantes. São necessários estudos sobre mecanismos de ação da ricina na diversa população microbiana ruminal.

Literatura Citada

- ALBIN, R.C.; DAVIS, W.H.; ZINN, D.W. Castor meal for growing-finishing steers. **Journal of Animal Science**, v.28, n.1, p.133 (Abstract), 1969.
- ANANDAN S.; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH. J. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal feed science and technology**, v.120, p.159-168, 2005.
- ARMIÉN, A.G.; D'ANGELIS, F.H.F.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental pelas sementes de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.4, p.99-106, 1996.
- ASLANI, M.R.; MALEKI, M.; MOHRI, M. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, v.49, n.1, p.400-406, 2007.
- AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M. et al. Ricin poisoning: A comprehensive review. **The Journal of the American Medical Association**, v.294, n.9, p.2342-2351, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRODERICK, G.A.; WALLACE, R.J.; ORSKOV, E.R. Control of rate and extent of protein degradation. In: **Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants**. Eds.: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. Academic Press, Orlando, FL, p.541-592, 1991.
- CAMPOS, F.A.P.; NOGUEIRA, T.L.; MOURA, F.C.S. et al. Análise proteômica das sementes em desenvolvimento de mamona (*Ricinus communis*). In: Congresso Brasileiro de Mamona, 3., 2008. Salvador. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão. [2008] (CD-Rom).
- CHIOU, P.W.S; WU, B.Y.S.S. Protein sub-fractions and amino acid profiles of rumen-undegradable protein in dairy cows from soybean, cottonseed and fish meals. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, p.65-80, 1999.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962
- CREPPY, E.E.; LUGNIER, A.A.J.; DIRHEIMER, G. Isolation and properties of two toxic tryptic peptides from ricin, the toxin of *Ricinus communis* L. (castor bean) seeds. **Toxicon**, v.18, n.5-6, p.649-660, 1980.

- ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M. et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.12, p.5908-5912,1987.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.17, p.8128-8130,1987.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of Ricin A-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.18, p.8735-8739,1988.
- HAAS-KOHN, L. J. G.; LUGNIER, A.A.J.; TIBONI, O. et al. Inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis by a limited tryptic digest of ricin, the toxin of *Ricinus communis* L. seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.97, n.3, p.962-967, 1980.
- KUMAR, O.; SUGENDRAN, K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. **Toxicol**, v.41, p.333-338, 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.F. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6592-6598, 2002.
- LUGNIER, A.A.J.; LE MEUR, M.A.; GERLINDER, P. et al. Isolation and biochemical properties of toxic tryptic peptides of ricinotoxin from *Ricinus communis* seeds. **European Journal of Toxicology and Environmental Hygiene**, v. 9, n.6, p.323-333, 1976.
- NUGENT, J.H.A.; JONES, W.T.; JORDAN, D.J. Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein Fraction I (18S) leaf protein bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. **British Journal of Nutrition**, v.50, n.2, p.357-368, 1983
- OLIVEIRA, A.S.; CAMPOS, J.M.S.; DETMANN, E. et al. Eficiência de utilização de nutrientes e função hepática de ovinos alimentados com dietas contendo farelo ou torta de mamona tratado com hidróxido de cálcio, no prelo, 2008.
- OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v.249, p. 627-631, 1974.

- OWENS, F.N.; ZINN, R. Protein metabolism of nutrition animals. In: **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**, Ed.: Church, D.C. Prentice Hall, New Jersey-USA, p.227-249, 1988.
- PINKERTON, S.D.; ROLFE, R.; AULD, D.L. et al. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, v.39, p.353-357, 1999.
- RETAMAL, C.A.; THIEBAUT, P; ALVES, E.W. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. **Analytical Biochemistry**, v.268, p.15–20, 1999.
- ROMAGNOLO, D.C.; POLAN, C.E.; BARBEAU, W.E. Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1093-1099, 1994.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**, Ithaca, NY, 2002, 119p.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annual Reviews of Plant Physiology**, v.24, p.173-196, 1973.
- SADEGHI, A.A.; SHAWRANG, P. Effects of microwave irradiation on ruminal dry matter, protein and starch degradation characteristics of barley grain. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p.184-194. 2008.
- SANTANA, O.P.; CALDAS, G.C.; ARAÚJO, P.E.S. Resposta comparativa de bovinos jovens em confinamento, ao farelo de mamona adubo e lex protéico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 8., 1971, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.144-145, 1971.
- SEVERINO, L.S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. 31p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134), 2005.
- STERN, M.D.; VARGA, G.A.; CLARK, J.H. et al. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2762-2786, 1994.
- SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V.; FREER, M. et al . Monitoring the fate of dietary proteins in rumen fluid using gel eletrophoresis. **British Journal of Nutrition**, v.60, p.241-247, 1988.

- TANNER, G.J.; MOORES, A.E.; LARKIN, P.J. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora in vitro. **British Journal of Nutrition**, v.71, n.6, p.947-958, 1994.
- TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. Imunidade cruzada pelas sementes de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p.25-35, 1997.
- WALLACE, R.J.; ONODERA, R.; COTTA, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem**, 2.ed. Chapman & Hall, 1997. p.283-328.
- WALTZ, D.M.; LOERCH, S. C. Effect of acid and alkali treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, p.879-887, 1986.

Eficácia de destoxificação da ricina por meio de tratamento alcalino ou térmico e seus efeitos sobre o valor nutritivo do farelo de mamona para ruminantes

RESUMO – A utilização do farelo de mamona (FM) na alimentação animal é limitada pela presença de uma potente proteína tóxica (ricina), o que reduz a competitividade da cadeia produtiva do biodiesel. Objetivando definir o método de destoxificação, avaliou-se a eficácia de destoxificação do FM por meio de tratamento alcalino (Ca(OH)_2 ou CaO , nas doses de 20, 40 ou 60 g/kg, diluído ou não em água) ou térmico (autoclave com pressão de 1,23 kgf/cm² ou 15 psi a 123°C, durante 30, 60 ou 90 minutos) e seus efeitos sobre a composição química, cinética de degradação ruminal *in situ* da proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), matéria seca (MS) e digestibilidade verdadeira intestinal *in vitro* da proteína não-degradada no rúmen (DIV-PNDR). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. A eficácia dos tratamentos foi avaliada com base na presença das sub-unidades de ricina em gel a 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condição desnaturante, análise densitométrica e dosagem de proteína total. Observou-se teor 831g de ricina/kg de MS no FM controle. A eficácia de 100% de destoxificação com Ca(OH)_2 na dose de 40 g/kg de farelo ou com autoclave em 15 psi durante 60 minutos, observada em pesquisas anteriores, não se confirmou no presente estudo. Somente os tratamentos com Ca(OH)_2 ou CaO , diluídos em água (1:10), na dose de 60 g/kg de farelo, ou com autoclave (90 minutos) mostram-se eficazes ($P < 0,05$) em destoxificar a ricina. Os tratamentos alcalino, independente da fonte, e térmico reduzem ($P < 0,05$) a taxa e a degradabilidade ruminal efetiva da PB, mas sem afetar a extensão de degradação e a DIV-PNDR. Somente o tratamento alcalino promove reduções ($P < 0,05$) nas estimativas de repleção ruminal da fração potencialmente degradável da FDN, em razão do aumento na taxa de degradação ruminal. Estimam-se custos com aquisição do agente alcalino equivalentes a 6% do preço FOB (livre de frete e imposto) do FM comercializado como fertilizante. Os tratamentos alcalinos com Ca(OH)_2 ou CaO na dose de 60g/kg de farelo, ou com 90 minutos de autoclave (1,23 kgf/cm², 123°C) poderão permitir o uso da FM na alimentação de ruminantes, mas sua aplicação em escala industrial depende de estudos sobre viabilidade operacional e econômica.

Palavras-chave: biodiesel, co-produtos, degradação ruminal, digestibilidade intestinal, hidróxido de cálcio, óxido de cálcio, *Ricinus communis* L.

Efficacy of ricin detoxification by means of alkaline or heat treatment and its effects on nutritive value of castor bean meal for ruminants

ABSTRACT – Castor seed meal (CSM) use in animal nutrition is limited by the presence of a powerful toxic protein (ricin), what reduce the biodiesel productive chain competitiveness. With the objective of defining the detoxification method, detoxification efficacy (DE) of CSM was evaluated by means of alkaline treatment ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ or CaO , in 20, 40 or 60 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ doses, diluted or not in water) or heat (autoclave with 1.23 kgf/cm^2 pressure or 15 psi at 123°C , during 30, 60 or 90 minutes) and its effects on chemical composition, *in situ* rumen degradation kinetics of crude protein, neutral detergent fiber, dry matter (DM) and *in vitro* true intestinal digestibility of rumen undegradable protein (RUP-IVD). The experiment was carried out in a completely randomized design, with five repetitions. Treatments efficacy was evaluated based on the presence of ricin subunits in 15% policramida gel (SDS-PAGE) in denaturizing condition, densitometric analysis and total protein dosage. It was observed 831 g of ricina. kg^{-1} of DM in CSM control. The 100% detoxification efficacy with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in 40 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose of meal or with autoclave at 15 psi during 60 minutes, observed in previous researches, was not confirmed in the present study. Only the treatments with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or CaO , diluted in water (1:10), in 60 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose of meal, or with autoclave (90 minutes) are efficient ($P<0.05$) in detoxify ricin. The alkaline treatment, independent of the source, and thermal treatment reduce ($P<0.05$) the rate and CP effective ruminal degradability, but without effect on degradation extension and RUP-IVD. Only the alkaline treatment promotes reductions ($P<0.05$) in ruminal repletion estimates of NDF potentially digestible fraction, because of the rumen degradation rate increase. The costs with alkaline agent acquisition are estimated to be equivalent to 6% of the CSM FOB price commercialized as fertilizer. The alkaline treatments with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or CaO in 60 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose of meal, or with 90 minutes of autoclave (1.23 kgf/cm^2 , 123°C) can permit the use of CSM in ruminant feeding, but its application in industrial scale dependent of studies on operational and economic viability.

Key Words: biodiesel, co-products, ruminal degradation, intestinal digestibility, calcium hydroxide, calcium oxide, *Ricinus communis* L.

Introdução

A expectativa de crescimento do cultivo de oleaginosas para produção de biodiesel criou nova oportunidade para a produção de ruminantes, através da oferta potencial de farelos e/ou tortas protéicos obtidos após a extração do óleo. Desta forma, há possibilidade de integração das cadeias de produção de agroenergia e de pecuária, otimizando a geração de emprego e renda e minimizando os passivos ambientais. Assim, estudos nos quais se gerem informações sobre a melhor forma de utilização dos co-produtos protéicos na alimentação animal fazem-se necessários para garantir a sustentabilidade desta integração.

Dentre as oleaginosas disponíveis, a mamona (*Ricinus communis* L.) se destaca pelo potencial de exploração em regiões marginalizadas do processo de desenvolvimento econômico e pela maior intensidade no uso de mão-de-obra. Apesar do potencial de utilização na alimentação de ruminantes o farelo e torta de mamona tem sido empregado exclusivamente como fertilizante orgânico, o que reduz a competitividade em relação às outras oleaginosas. A presença de uma potente toxina (ricina) bem como a carência tecnológica que propicie a obtenção de um alimento seguro com preços competitivos, em escala industrial, tem impedido a sua adoção na alimentação animal (Severino, 2005).

A ricina é uma proteína solúvel encontrada principalmente no endosperma da mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas e caules (Bandeira et al., 2004), componente do grupo das “proteínas inativadoras de ribossomos”, compostas por duas subunidades de funções biológicas distintas. A subunidade A inativa especificamente e irreversivelmente os ribossomos eucarióticos, impedindo a síntese protéica. Já a subunidade B encontra-se ligada à parede celular e a

subunidade A e permite a entrada da subunidade A, por endocitose, para o citossol (Audi et al., 2005).

Apesar da alta toxicidade da semente, o óleo de mamona não é tóxico, pois a ricina não é solúvel em lipídios, ficando todo o componente tóxico na torta/farelo (Gaillard & Pepin, 1999). A concentração dessa proteína em sementes de mamona apresenta variabilidade entre diferentes genótipos, tendo sido detectados teores entre 1,9 a 16 mg/g em 263 acessos de um banco de germoplasma nos EUA oriundos de 36 países (Pinkerton et al., 1999).

Embora alguns métodos de destoxificação sejam conhecidos desde o final da década de 1940 (Borchers, 1949; Kodras et al., 1949; Gardner et al., 1960), bem como a susceptibilidade da ricina ao efeito do pH e temperatura (Levy & Benaglia, 1950), somente recentemente foi desenvolvido trabalho conclusivo (Anandan et al., 2005). Entre diversos métodos químicos e físicos para o tratamento de farelo de mamona originário da Índia, somente o autoclave (15 psi, 60 min) e o tratamento com hidróxido de cálcio (40g/kg de farelo de mamona) provocaram completa desnaturação da toxina (Anandan et al., 2005). Todavia, antes de recomendar a utilização desses métodos, faz-se necessário desenvolvimento de estudos que validem a eficácia de destoxificação da ricina nas condições brasileiras, bem como seus efeitos sobre o valor nutritivo do farelo de mamona, ainda inexistentes.

Desta forma, desenvolveu-se esta pesquisa com objetivo de avaliar a eficácia de destoxificação da ricina do farelo de mamona por meio tratamento alcalino (hidróxido de cálcio ou óxido de cálcio) ou térmico (autoclave) e seus efeitos sobre a composição química, degradação ruminal *in situ* da proteína bruta, fibra em detergente neutro e matéria seca e sobre a digestibilidade verdadeira intestinal *in vitro* da proteína não-degradada no rúmen.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). O farelo de mamona (FM) foi adquirido de agroindústria localizada na região metropolitana de Salvador-BA, obtido após extração do óleo de sementes de mamona utilizando-se solventes orgânicos e, segundo o fabricante, impróprio para alimentação animal.

Eficácia de destoxificação da ricina

Para avaliação da eficácia de destoxificação, 85 amostras com 250 gramas cada de FM moído foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e submetidos a 17 tratamentos referentes aos métodos de destoxificação por tratamento alcalino (efeitos de fonte, dose e diluição em água) e térmico (efeito do tempo de exposição), assim distribuídos: controle, sem tratamento; controle, sem tratamento, seco a temperatura de 65°C durante 8 horas em estufa ventilada a fim de verificar o efeito do procedimento convencional de pré-secagem na desnaturação da ricina; tratamento alcalino com hidróxido de cálcio - Ca(OH)_2 , diluído ou não em água, nas doses de 20, 40 ou 60 g/kg de FM, base da matéria natural; tratamento alcalino com óxido de cálcio - CaO , diluído ou não em água, nas doses de 20, 40 ou 60 g/kg de farelo, base da matéria natural; e tratamento térmico em autoclave com pressão de 1,23 kg/cm^2 (15 psi) e temperatura de 123°C durante 30, 60 ou 90 minutos.

Os tratamentos com Ca(OH)_2 e CaO diluídos em água seguiram as especificações descritas em Anandan et al. (2005). Inicialmente, foram diluídos em água na relação 1:10, misturados ao farelo de mamona, permanecendo por um período de 18 horas (uma noite). Em ambos os tratamentos, após a mistura do agente alcalinizante com água, o pH

da solução foi medido, mantendo-se sempre superior a 12,5. Utilizaram-se hidróxido de cálcio destinado à construção civil e óxido de cálcio micropulverizada, contendo, segundo os fabricantes, mínimos de 88% e 90% de óxidos totais, respectivamente.

Nos tratamentos com autoclave, as amostras de FM foram acondicionadas em frascos de vidro e mantidas à pressão de 1,23 kg/cm² (15 psi), conforme Anandan et al. (2005), com temperatura média de 123°C durante 30, 60 ou 90 minutos.

Imediatamente após os tratamentos, retirou-se alíquotas de 50 gramas de cada amostra de FM, secas em liofilizador e armazenadas para posterior análise de ricina e matéria seca. O restante das amostras foram secas em estufa ventilada a 65°C, parte moída em peneiras de 1mm para posterior avaliação da composição química e outra fração em peneiras de 2mm para avaliação da degradação ruminal *in situ* e da digestibilidade intestinal verdadeira *in vitro* da proteína não-degradável no rúmen (DIV-PNDR).

A avaliação da concentração de ricina no FM foi realizada através da separação das frações A (36 kDa) e B (29 kDa) por eletroforese em gel de 15% de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE), de acordo com o método proposto por Laemmli (1970) e por análise densitométrica.

Inicialmente, 250 mg de FM foi colocados em tubos “eppendorf” de 2 mL, adicionando-se 1 mL de tampão de extração TRIS 0,5 M (pH 3,8 ajustado com ácido sulfúrico 37%) e centrifugados a 9.739 xg durante 20 minutos. Retirou-se o sobrenadante, adicionou em outro tubo “eppendorf” o qual foi armazenado entre 2 a 6°C para análise imediata, sendo este denominado de extrato bruto protéico.

Para realizar a corrida eletroforética, foram retirados alíquotas de 30 µL do extrato bruto protéico, colocados em tubos “eppendorf” e adicionado 10 µL de tampão de amostra (4X), contendo solução tampão Tris HCL 60 mM pH 6,8 (10% de glicerol,

2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,025% de azul de bromofenol e 0,025% de B-mercaptoetanol). Em seguida submeteu-se o material à temperatura de 100°C por 5 minutos a sendo então aplicado 20 µL desta mistura em cada poço do gel. A corrida eletroforética foi inicialmente conduzida a 50 Volts, até a banda do corante atingir a superfície do gel de separação, quando foi aumentada para 140 Volts, permanecendo assim até o final da corrida, definido quando o corante se aproximou da extremidade inferior do gel. Terminada a corrida, os géis foram retirados da placa e colocados em solução corante (1,5 g de Coomassie Brilliant Blue G, 90 mL de ácido acético glacial, 450 mL de metanol e 460 mL de água deionizada) por 24 horas e logo depois em solução descorante (100 mL de ácido acético glacial, 500 mL de metanol e 400 mL de água deionizada) por 12 horas. Os géis foram então scaneados, sendo as imagens utilizadas para análise de densitometria. A identificação das frações de ricina foi realizada utilizando-se marcadores de massa molecular entre 14 a 66 KDa (Sigma, USA).

Outra alíquota do extrato bruto protéico foi retirada para avaliação de proteína total utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A análise de densitometria dos géis foi realizada nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, obtendo-se as áreas totais e aquelas correspondentes às frações da ricina, segundo procedimentos descritos por Retamal et al. (1999). O teor de ricina no FM foi estimado conforme a equação: teor de ricina (mg/kg de MS) = $[(V_1 \times \text{PTN total}) * (\text{área ricina}/\text{área total})] / \text{peso da MS da amostra em contato com a solução tampão de extração (gramas)}] * 1.000$, em que: V_1 = volume utilizado da solução tampão de extração (1 mL); PTN total = concentração de proteína total no extrato bruto (mg/mL); área ricina = área correspondente às frações A e B da ricina presente no extrato bruto, obtida por análise densitométrica; área total =

área total de proteínas presentes no extrato bruto obtida por análise densitométrica. Para apresentação dos resultados foram apresentados um dos cinco géis com respectiva análise densitométrica.

O tratamento foi considerado eficaz na destoxificação do farelo de mamona somente com o completo desaparecimento das sub-unidades da ricina, conforme Anandan et al. (2005), e com o valor médio de eficácia de destoxificação semelhante a 100%, mediante análise de intervalo de confiança (95%) após realização de testes quanto à conformidade da homogeneidade da variância (Cochran) e normalidade do conjunto de dados (Lilliefors). A eficácia de destoxificação (ED) foi calculada por meio da seguinte equação: $ED (\%) = ((\text{controle} - \text{tratamento}) / \text{controle}) \times 100$, em que: controle corresponde à concentração de ricina no farelo de mamona sem tratamento; e tratamento a concentração de ricina no farelo de mamona tratado.

Para verificar os efeitos dos tratamentos do FM sobre teor de ricina e a ED da mesma, as observações foram submetidas à análise de variância e aplicados os seguintes contrastes: secagem em estufa ventilada a 65°C (controle vs controle seco); destoxificação (controle seco vs destoxificação); método de destoxificação (alcalino vs térmico); fonte de agente alcalino (hidróxido de cálcio vs óxido de cálcio); dose de agente alcalino; interação entre fonte e dose de agente alcalino; diluição em água do agente alcalino (hidróxido e óxido de cálcio em água vs hidróxido e óxido de cálcio não diluído em água); interação entre fonte de agente alcalino e diluição em água; dose de agente alcalino (linear e quadrático); e tempo de tratamento térmico (linear e quadrático). Em todos os procedimentos estatísticos utilizou-se nível de 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

Efeito sobre a composição química, degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal da proteína não-degradada no rúmen

Os tratamentos avaliados foram os mesmos descritos anteriormente, com exceção para o efeito de diluição em água do agente alcalino. Considerou-se o farelo de mamona seco em estufa ventilada à 65°C sem destoxificação como o tratamento controle, de forma a eliminar efeitos de secagem da água utilizada na diluição dos agentes alcalinos sobre os resultados.

As análises dos teores de MS, proteína bruta (PB, nitrogênio total x 6,25), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (H₂SO₄ 72% p/p) foram realizadas segundo métodos descritos em Silva & Queiroz (2002). A quantificação de cutina foi realizada mediante hidrólise do resíduo de FDA com H₂SO₄ 72% p/p, seguido de oxidação do resíduo da hidrólise com KMnO₄ e queima em mufla à 550°C, segundo decrito por Van Soest (1994). Para análise da concentração de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com alfa amilase termo-estáveis sem uso de sulfito de sódio, corrigidas para o resíduo de cinzas (Mertens, 2002) e para o resíduo de compostos nitrogenados (Licitra et al., 1996). As análises de FDN e FDA foram realizadas em sistema Ankon[®], utilizando sacos de TNT (tecido-não-tecido), com dimensões de 5cm x 5cm, mantendo-se relações média de 14 mg de MS /cm² de tecido e 100 mL de detergente neutro/g de amostra seca ao ar. A quantificação de nitrogênio não protéico (NNP) dos alimentos foi realizada segundo Licitra et al. (1996). Os teores de carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (CNF_{cp}), foram calculados em adaptação ao proposto por Hall (2000), sendo: $CNF_{cp} = 100 - (\%PB + \%FDN_{cp} + \%EE + \%Cinzas)$.

Para avaliação dos efeitos dos métodos de destoxificação sobre a cinética de degradação ruminal da PB, FDN e PB realizou-se ensaio *in situ* conforme descrição a

seguir: Em sacos de poliéster medindo 20x10 cm, com porosidade de 60 μ , foram adicionados 6g de amostras de farelo de mamona submetidos aos tratamentos. Os tempos de incubação utilizados para avaliação da cinética de degradação da PB e MS foram de 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo incluídos os tempos de 240 horas para avaliações da degradação da FDN. Utilizou-se esquema de incubação sequencial e remoção simultânea. As amostras foram incubadas no rúmen de três bovinos por intermédio da fistula ruminal, os quais receberam dietas à base de silagem de milho e 2 kg/cab/dia de ração concentrada (contendo 77,90% de milho grão moído, 18,31% de farelo de soja, 0,80% de uréia + sulfato de amônio, 1% de cloreto de sódio, 1% de fosfato bicálcico, 0,66% de bicarbonato de sódio e 0,34% de óxido de magnésio, base da matéria seca). Cada animal representou uma repetição, sendo utilizados três repetições por tratamento para avaliações de cinética de degradação ruminal. Decorrido o tempo de incubação, os sacos foram lavados em água e levados à estufa a 65°C por 72 horas, sendo posteriormente avaliados os teores de MS e PB e FDN dos resíduos da incubação.

Os parâmetros da dinâmica de degradação da PB e MS foram estimados utilizando o modelo de crescimento assintótico de primeira ordem reparametrizado por Ørskov & McDonald (1979) descrito pela função: $Y_t = a + b * (1 - e^{-kd*t})$; em que: Y_t = fração degradada no tempo “t” (%); a = fração solúvel (%); b = fração insolúvel potencialmente degradável (%); kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); e t = variável independente tempo (h). Os parâmetros da dinâmica de degradação da FDN foram estimados utilizando o modelo apresentado por Mertens & Loften (1980), descrito pela função: $Y_t = b * e^{(-kd*(t-L))} + I$; em que: Y_t = resíduo não degradado no tempo “t” (%); b = fração potencialmente degradável da FDN (%); kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); e t = variável independente tempo (h); L = latência discreta (h); e I = fração indegradável

da FDN (%), sendo utilizado o valor do resíduo após 240 horas de incubação. A fração efetivamente degradada no rúmen (DE) da PB e MS foram calculadas pelo modelo: $DE = a + b \cdot [kd / (kd + kp)]$; em que: k_p representa a taxa de passagem do alimento pelo rúmen (h^{-1}), assumindo valor de $0,05 h^{-1}$. A fração efetivamente degradada no rúmen (DE) da FDN foi calculada pelo modelo: $DE = b \cdot [kd / (kd + kp)]$; em que: k_p representa a taxa de passagem do alimento pelo rúmen (h^{-1}), assumindo valor de $0,05 h^{-1}$.

Estimou-se o efeito de repleção ruminal da fração potencialmente degradável da FDN (b) pela equação: $RRb \text{ (horas)} = (b / (kd + kp))$, em que: b = fração potencialmente degradável da FDN, como fração centesimal da FDN; kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); k_p = taxa de passagem do alimento pelo rúmen, assumindo valor de $0,05 h^{-1}$.

A digestibilidade intestinal verdadeira da proteína não-degradada no rúmen (DI-PNDR) foi avaliada pela técnica de três estágios desenvolvido por Calsamiglia & Stern (1995), utilizando-se adaptações descritas por Marcondes (2007). Inicialmente, em sacos de poliéster medindo 20×10 cm, com porosidade de $60 \mu m$, foram adicionados 6 g de amostras de farelo de mamona e incubados no rúmen de um bovino durante 16 horas. Após a incubação ruminal, os sacos foram lavados em água corrente e secos em estufa de ventilação forçada a $60^\circ C$ durante 72 horas. Após análise do teor de nitrogênio total dos resíduos de incubação, foram pesados resíduos contendo aproximadamente 15 mg de NT (em média 316 mg de amostra) e adicionados em béqueres de 50 mL. Posteriormente adicionou-se 10 mL de solução 0,1 N de HCl contendo 1 g/L de pepsina (pH = 1,9) sendo então tampados com papel alumínio e incubados a $39^\circ C$ sob agitação durante 1 hora. Decorrido esse tempo, foram adicionados 0,5 mL de solução 1 N de NaOH para neutralização do pH e 13,5 mL de solução de pancreatina (0,5 M de solução de KH_2PO_4 , pH = 7,8) contendo 50 ppm de thymol, para prevenir o crescimento

microbiano, e 3 g/L de pancreatina durante mais 24 horas. Ao final da digestão, os resíduos foram imediatamente filtrados em papel de filtro, lavados com 200 mL de água destilada e digeridos em H₂SO₄ juntamente com o papel de filtro, sendo o nitrogênio residual estimado pelo método Kjeldahl. A digestibilidade verdadeira intestinal da PNDR (%) foi calculada conforme equação: $PNDR (\%) = ((\text{quantidade de NT do resíduo incubado} - \text{quantidade de NT do resíduo após incubação com pepsina e pancreatina}) / \text{quantidade de NT do resíduo incubado}) \times 100$.

Para verificar os efeitos dos tratamentos de destoxificação sobre a composição química, degradabilidade ruminal dos nutrientes e DI-PNDR do FM, as observações foram submetidas à análise de variância e aplicados os seguintes contrastes: secagem em estufa ventilada a 65° C (controle vs controle seco); destoxificação (controle seco vs destoxificação); método de destoxificação (alcalino vs térmico); fonte de agente alcalino (hidróxido de cálcio vs óxido de cálcio); dose de agente alcalino; interação entre fonte e dose de agente alcalino; dose de agente alcalino (linear e quadrático); e tempo de tratamento térmico (linear e quadrático). Em todos os procedimentos estatísticos utilizou-se nível de 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

Resultados e Discussão

Eficácia de destoxificação da ricina

O resultado da análise eletroforética para avaliação da destoxificação da ricina do farelo de mamona submetido aos tratamentos alcalinos e térmicos encontra-se na Figura 1 e a análise densitométrica nas Figura 2 e 3. As sub-unidades da ricina podem ser identificadas com base na sua massa molecular. Neste sentido, pode-se observar no gel (SDS-PAGE) uma sub-unidade com aproximadamente 35 KDa (sub-unidade A) e outra com cerca de 29 KDa (sub-unidade B), com funções biológicas distintas. Na

análise densitométrica os picos de unidade de densidade indicadas pelas setas representam as subunidades de ricina.

A sub-unidade A é uma enzima que inativa irreversivelmente os ribossomos eucarióticos pela remoção de resíduo adenina no RNA ribossomal 28 S, impedindo o processo de alongamento da cadeia polipeptídica (Olsnes et al., 1974. Endo & Tsuguri, 1988). O principal resultado tóxico é a inibição da síntese protéica, mas outros mecanismos como apoptose, lesão de membrana celular e aumento de mediadores inflamatórios também são descritos (Audi et al., 2005). A subunidade B é uma lecitina que se encontra ligada à subunidade A através de pontes dissulfeto, e permite a entrada desta última, por endocitose, para o citossol. Assim, se for quebrada as ligações entre as duas sub-unidades, as partes resultantes não são tóxicas em células eucarióticas (Audi et al., 2005).

Ribossomos ativos de organismos procarióticos foram considerados resistentes a ação da ricina nas formas intacta ou com as sub-unidades isoladas (Hass-Kohn, 1980; Endo & Tsuguri, 1988), mas fragmentos polipeptídicos ativos (22 e 18 KDa) obtidos pela hidrólise de ricina por tripsina (Creppy et al., 1980) foram capazes de inibir em 94,5% a síntese protéica em sistemas de células livres de *Escherichia coli* (Hass-Kohn et al., 1980). Em adição, em estudo de incubação ruminal *in vitro* foi observado aumento na taxa de crescimento microbiano quando proteínas solúveis de farelo de mamona foram adicionadas ao meio de cultura (Oliveira et al., 2008b). Desta forma, apenas com a completa desnaturação da ricina garante-se a inibição dos efeitos tóxicos sobre os sistemas microbiológicos e microbiológicos.

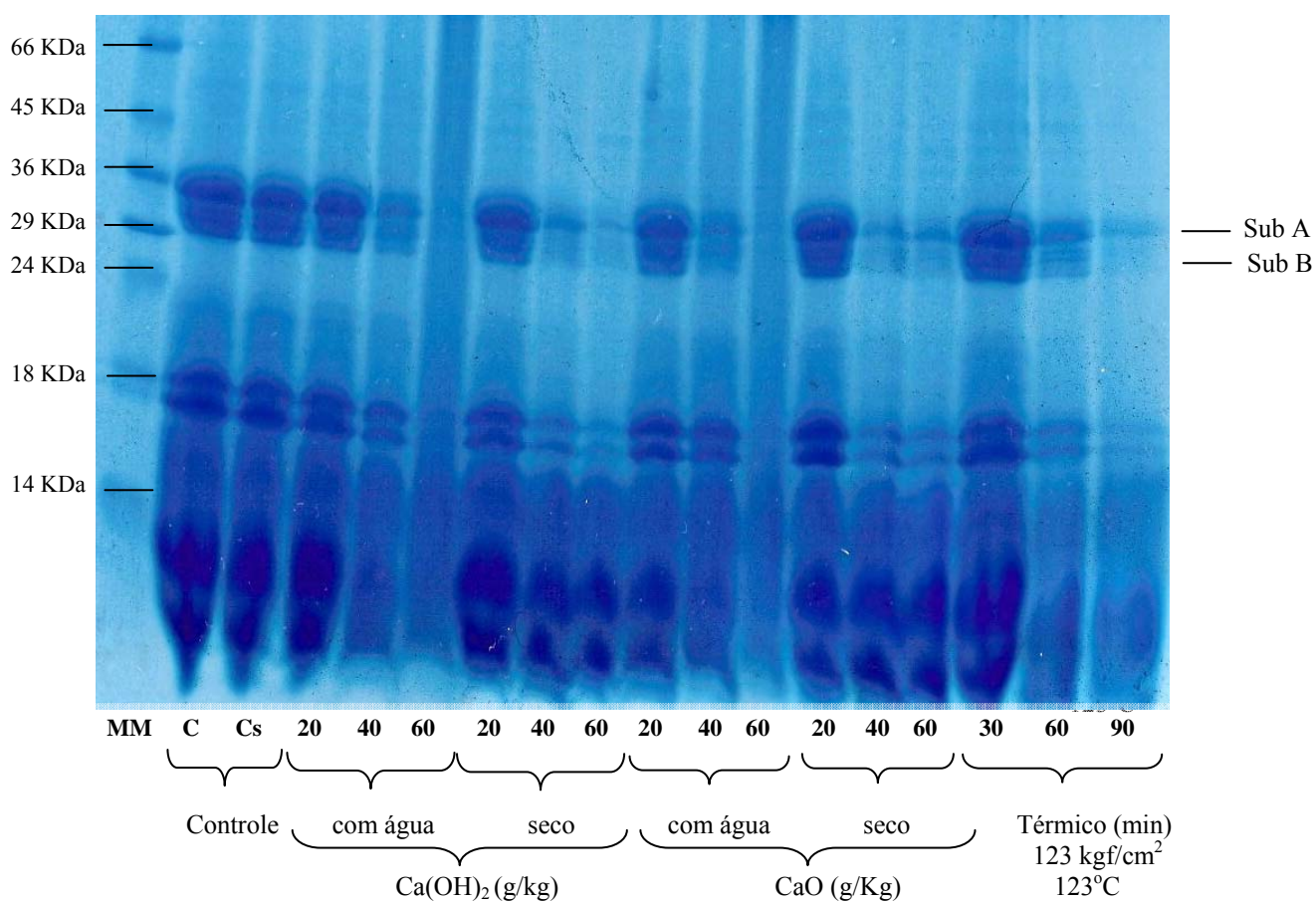


Figura 1 - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para avaliação dos efeitos de tratamentos alcalinos ou térmico do farelo de mamona (FM) no desaparecimento das duas sub-unidades de ricina (A com 35 KDa e B com 29 KDa). MM = marcador de massa molecular (14 a 66 KDa). Controle: controle (C) e controle seco a temperatura de 65°C durante 8 horas (Cs); Alcalino: 20, 40 e 60 g de Ca(OH)₂ ou CaO / kg de FM, diluídos ou não em água; Térmico: 30, 60 e 90 minutos de autoclave (123 kgf/cm², 123°C).

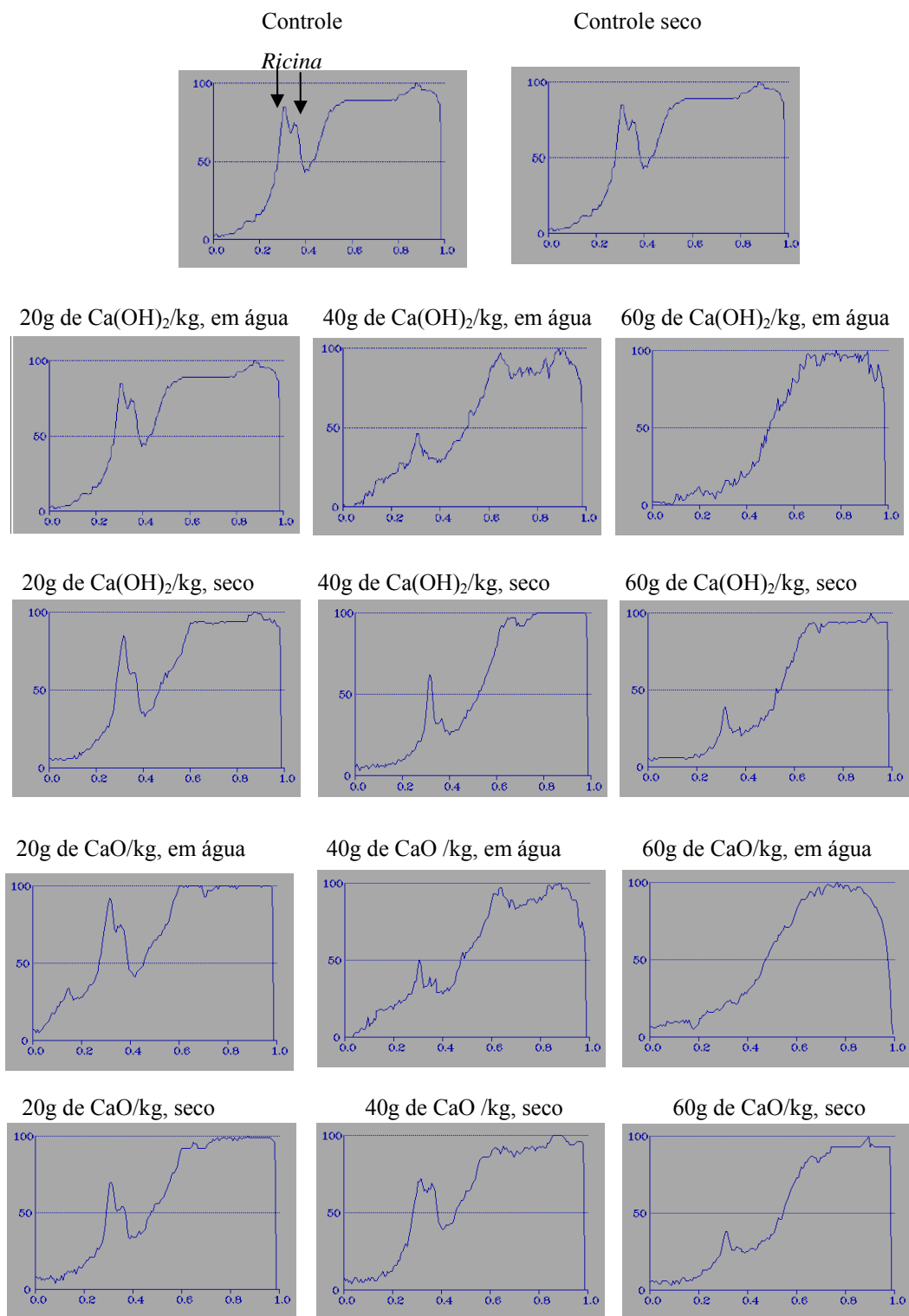


Figura 2 – Análise densitométrica de gel (SDS-PAGE) contendo proteínas solúveis em tampão pH 3,8 de farelo de mamona submetido a três doses de tratamento alcalino e duas fontes de agente alcalino, diluídos ou não em água. O eixo das ordenadas representa unidade de densidade relativa e no eixo das abscissas as frações protéicas expressas em unidade de massa molecular relativa (do maior para o menor valor). Os picos entre as frações 0,3 e 0,4 representam as subunidades de ricina.

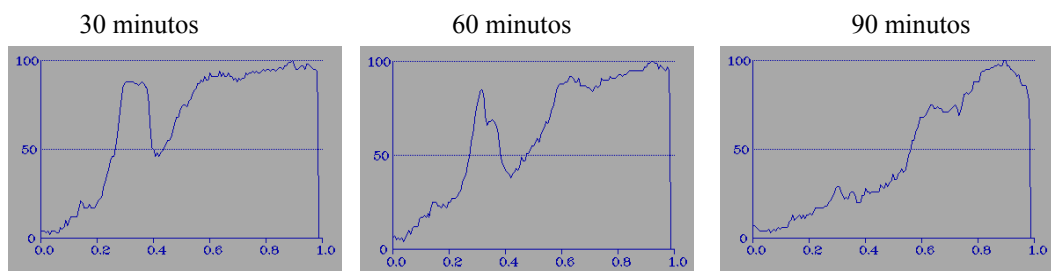


Figura 3 – Análise densitométrica de gel (SDS-PAGE) contendo proteínas solúveis em tampão pH 3,8 de farelo de mamona submetido a três tempos de tratamento térmico (autoclave 1,23 kgf/cm² e 123°C). O eixo das ordenadas representa unidade de densidade relativa e no eixo das abscissas as frações protéicas expressas em unidade de massa molecular relativa (do maior para o menor valor). Os picos entre as frações 0,3 e 0,4 representam as subunidades de ricina.

Observa-se a presença das duas sub-unidades da ricina e de outras proteínas solúveis em tampão pH 3,8 no farelo de mamona sem tratamento, indicando que embora o processo de extração do óleo por solvente seja capaz de destruir a toxina (Kim, 2001), ainda apresenta resíduos, necessitando de procedimentos para destoxificação.

As diferenças na intensidade das sub-unidades de ricina no gel (SDS-PAGE) e dos picos de unidade de densidade relativa entre os diferentes tratamentos é reflexo das diferenças na eficácia dos mesmos. Ausências de visualização das sub-unidades nos tratamentos com 60 g de Ca(OH)₂ ou CaO por kg de farelo de mamona, ambos diluídos em água, e com autoclave de 1,23 kgf/cm² (15 psi) por 90 minutos, indica eficácia próxima a 100% de desnaturação da toxina (Anandan et al. 2005). Nos demais tratamentos, em razão da visualização das sub-unidades de ricina, a desnaturação não foi completa.

A desnaturação representa alterações extremas na estrutura tridimensional de uma proteína que não envolve quebra de ligações peptídicas, e quase sempre está associada à perda de função. Com o tratamento alcalino, os valores de pH (12,5)

superam o valor de ponto isoelétrico da ricina de 5,2 a 5,5 (Kabat et al., 1947), tornando a carga líquida da proteína negativa, provocando repulsão eletrostática e rompimentos de pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura tridimensional. O calor, por sua vez, é reconhecidamente um dos principais fatores que afetam a integridade das interações fracas que mantêm a estrutura tridimensional de proteínas (Lehninger et al., 1995).

Além de perda da função, grupos hidrofóbicos são expostos durante a desnaturação, resultando em diminuição da solubilidade da proteína em soluções aquosas. Assim, o desaparecimento das sub-unidades de ricina indica ausência de solubilidade das mesmas ao tampão pH 3,8 (valor ótimo de extração da ricina, segundo Waller & Negi (1958)), em razão das mudanças para o estado desnaturado da toxina quando submetida ao tratamento alcalino (60 g/kg) ou térmico (90 minutos).

Os teores médios de ricina no farelo de mamona e a eficácia de destoxificação dos tratamentos alcalinos e térmicos encontram-se na Tabela 1. As equações de regressão para os efeitos ($P < 0,05$) de dose de agente alcalino, diluído ou não em água, e de tempo de exposição em autoclave constam na Tabela 2. Os resultados da análise quantitativa de ricina refletem os observados pela análise eletroforética e densitométrica. Verifica-se que procedimento de secagem em estufa ventilada à 65°C durante 8 horas do farelo de mamona controle, etapa necessária para armazenamento do farelo tratado com Ca(OH)_2 ou CaO diluídos em água, não altera a concentração de ricina. Desta forma, os efeitos dos tratamentos ocorreram exclusivamente pelo efeito do tratamento alcalino.

Tabela 1 - Médias para o teor de ricina (mg/kg matéria seca) e para eficácia de destoxificação (%), e estimativas do intervalo de confiança (IC) para a eficácia de destoxificação do farelo de mamona submetido a diferentes tratamentos de destoxificação

Item	Ricina (mg/kg de MS)	Eficácia de destoxificação (%)	
		Média	± IC (μ) _{95%}
Tratamentos			
Controle			
sem secar	831	-	
seco à 65°C em estufa ventilada	752	9,5	6,8
Alcalino			
Ca(OH) ₂ diluído em água (1:10)			
20 g/kg	563	32,3	8,4
40 g/kg	369	55,6	21,0
60 g/kg	36	95,7*	5,6
Ca(OH) ₂ sem água			
20 g/kg	604	27,3	13,4
40 g/kg	557	33,0	22,0
60 g/kg	343	58,7	7,3
CaO diluído em água (1:10)			
20 g/kg	531	36,1	22,8
40 g/kg	332	60,0	16,9
60 g/kg	45	94,6*	7,0
CaO sem água			
20 g/kg	607	26,9	10,7
40 g/kg	470	43,4	18,4
60 g/kg	366	56,0	13,9
Térmico (autoclave, 1,23 kgf/cm ² , 123°C)			
30 minutos	701	15,7	5,2
60 minutos	447	46,2	15,4
90 minutos	77	90,7	3,6
Efeitos (valor-P)			
Destoxificação (controle seco x destoxificação)	*	*	
Alcalino x térmico	ns	ns	
Fonte de agente alcalino (FA)	ns	ns	
Dose de agente alcalino	*	*	
FA x dose de agente alcalino	ns	ns	
Diluição em água do agente alcalino	*	*	
Diluição em água x FA	ns	ns	
Diluição em água x dose de agente alcalino	*	*	
Dose FA em água	linear	*	*
	quadrático	ns	ns
Dose FA sem água	linear	*	*
	quadrático	ns	ns
Tempo em autoclave	linear	*	*
	quadrático	ns	ns
Coefficiente de variação (%)	28,66	23,47	

*significativamente igual a 100% (P<0,05)

Tabela 2 - Regressões lineares significativas para o teor de ricina no farelo de mamona e eficácia de destoxificação (ED) em função da dose de agente alcalino (AA) (Ca(OH)₂ e/ou CaO) diluído ou não em água (1:10) ou do tempo de autoclavagem (123 kgf/cm² e 123°C)

Variável (Y)	Parâmetros da equação	R ²
Ricina (mg/kg)		
	$\hat{Y} = 827,3914^* - 12,8418^* \times \text{Dose de AA diluído em água (g/kg)}$	0,99
	$\hat{Y} = 804,2885^* - 7,6091^* \times \text{Dose de AA sem água (g/kg)}$	0,97
	$\hat{Y} = 891,1443^* - 8,3826^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,96
ED (%)		
	$\hat{Y} = 0,9695^{ns} + 1,5383^* \times \text{Dose de AA diluído em água (g/kg)}$	0,99
	$\hat{Y} = 3,6483^{ns} + 0,9183^* \times \text{Dose de AA sem água (g/kg)}$	0,97
	$\hat{Y} = -7,3781^{ns} + 1,0067^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,96

* significativo (P<0,05). ^{ns} não significativo (P>0,05)

A destoxificação, independente do tratamento (alcalino ou térmico) reduz (P<0,05) a concentração de ricina no farelo de mamona. Não observou-se diferença entre fontes de agente alcalino (FA) indicando que o Ca(OH)₂ pode ser substituído com eficácia pelo CaO na destoxificação da ricina do farelo de mamona, pois em solução, o CaO converte-se em Ca(OH)₂. Desta forma, permite-se redução nos custos de destoxificação em razão do menor preço do CaO (70% do Ca(OH)₂) e minimizar riscos de acidentes de trabalho devido ao menor poder corrosivo.

A eficácia de destoxificação (ED) aumenta (P<0,05) linearmente com a dose de FA em proporção 67,5% superior quando diluídos em água, em relação ao uso do agente químico seco (1,5383 vs 0,9183). Desta forma, para potencializar o tratamento alcalino do FM faz-se necessário a diluição em água (10 partes de água: 1 parte de agente alcalinizante). A presença da água em quantidades adequadas permite a dissociação da base, liberando as moléculas de hidróxido, os quais resultam em aumentos do pH da solução para níveis que permitem a desnaturação da toxina.

Aumentos no tempo de exposição do FM ao tratamento térmico também proporciona aumentos ($P < 0,05$) lineares na ED da ricina.

Em suma, a análise quantitativa confirma avaliações qualitativas anteriores, em que apenas os tratamentos Ca(OH)_2 ou CaO , na dose de 60g/kg de FM, apresentam eficácia de 100% ($P < 0,05$) de destoxificação da ricina, enquanto o tratamento em autoclave por 90 minutos a eficácia é de 95% ($P < 0,05$). Nos demais tratamentos, a eficácia máxima (média + intervalo de confiança) foi de 76,9% ($P < 0,05$) e, portanto, são inadequados para destoxificar o farelo de mamona.

A partir das regressões lineares estima-se que seja necessário 108,9 g de Ca(OH)_2 ou CaO , sem diluição em água, para alcançar 100% de eficácia de destoxificação. Esse valor supera em 81,5% a dose eficaz quando os agentes alcalinos são diluídos em água (1:10). Assim, apesar do inconveniente da secagem para o armazenamento do FM submetido ao tratamento alcalino, não se recomenda o uso de agentes alcalinos sem a diluição em água por possíveis limitações nutricionais e econômicas.

Os resultados obtidos por Anandan et al. (2005), que observaram completo desaparecimento das sub-unidades da ricina nos tratamentos do farelo de mamona com Ca(OH)_2 na dose de 40g/kg de farelo e com autoclave (15 psi) por 60 minutos, não foram confirmados no presente trabalho. A concentração dessa proteína apresenta variabilidade entre diferentes genótipos, tendo sido detectados teores entre 1,9 a 16 mg/g em 263 acessos de um banco de germoplasma nos EUA oriundos de 36 países (Pinkerton et al., 1999). Assim, o maior teor de ricina obtido para o FM controle (831 mg/kg de MS) em relação do determinado por Anandan et al. (2005) (381 mg/kg), pode explicar parte das diferenças. Porém salienta-se que o procedimento utilizado por Anandan et al. (2005) para quantificação da ricina (purificação da ricina seguido por

dosagem de proteína total) difere do utilizado no presente trabalho (análise densitométrica de gel SDS-PAGE seguido dosagem de proteína total), o que pode implicar diferenças nas estimativas de ricina (Wannemacher Jr. et al, 1992). A menor pureza dos agentes alcalinos utilizados no presente trabalho (mínimo de 88% óxidos totais) também pode ter contribuído para as diferenças nos resultados de eficácia de destoxificação, apesar de não ter sido reportado por Anandan et al. (2005).

Considerando preço aproximado do óxido de cálcio micropulverizado de R\$ 0,40/kg comercializado em varejos no município de Viçosa-MG (Agosto de 2008), estima-se custos operacionais do tratamento alcalino, com 60g de CaO/kg de FM, de R\$ 24,0/tonelada de FM, inclusos apenas o custo de aquisição do produto alcalino. Esse valor representa cerca de 6% do valor FOB (livre de frete e imposto) do farelo de mamona comercializado como fertilizante orgânico no estado de Minas Gerais. Desta forma, vislumbra-se o emprego deste processo de destoxificação nas próprias unidades de extração de óleo de mamona de pequena escala e/ou nos sistemas de produção animal, com importantes implicações econômicas para as cadeias da agroenergia e da produção animal. Todavia, estudos quanto à viabilidade operacional e econômica são necessários, notadamente, para seu uso em escala industrial.

Efeito sobre a composição química, degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal da proteína não-degradada no rúmen

Os efeitos da destoxificação por meio de tratamento alcalino ou térmico sobre a composição química do FM estão apresentados na Tabela 3. Os parâmetros das regressões significativas ($P < 0,05$) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3 - Efeito da destoxificação do farelo de mamona por meio de tratamento alcalino ou térmico (autoclave 1,23 Kg/cm² e 123°C) sobre a composição química

Item ¹	Tratamento para destoxificação										Efeitos (Valor – P) ⁴								CV (%)
	Contro le	Alcalino – fonte (g/kg)						Térmico (minutos)			D	A x T	FA	FA x D	Dose		Tempo		
		Ca(OH) ₂			CaO			30	60	90					L	Q	L	Q	
		20	40	60	20	40	60												
MS (%)	90,94	92,71	92,45	91,43	92,64	92,09	91,82	90,17	89,89	89,95	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,08
Cinzas ¹	8,58	10,72	12,30	14,71	10,42	12,79	14,63	8,10	8,83	8,88	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	7,28
EE ²	2,83	2,90	2,92	2,94	2,94	2,92	2,99	2,88	2,89	2,78	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,91
PB ²	39,73	39,85	39,35	38,48	39,58	38,77	38,01	39,73	40,84	39,54	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,70
NNP ³	24,65	27,92	23,86	27,16	24,62	27,86	28,26	25,15	25,84	25,29	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	11,01
NIDN ³	16,94	22,07	23,61	29,00	23,53	25,83	28,53	19,31	24,18	28,25	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	15,52
NIDA ³	6,15	5,82	6,11	6,03	6,03	6,17	6,03	6,26	6,34	5,89	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	20,64
B ₃ (NIDN -NIDA) ³	10,78	16,26	17,50	22,97	17,49	19,67	22,50	13,05	17,84	22,36	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	8,75
B ₁ + B ₂ ³	58,42	50,01	52,53	43,84	51,86	46,30	43,21	55,54	49,99	46,46	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	8,75
FDN ²	51,93	54,12	55,69	57,53	53,72	54,80	57,47	53,15	53,74	55,94	*	*	ns	ns	*	ns	*	ns	3,29
FDNcp ²	42,55	41,92	42,05	41,96	42,01	41,41	42,26	43,20	42,01	42,65	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,20
CNFcp ²	6,31	4,61	3,38	1,91	5,05	4,11	2,11	6,09	5,43	6,15	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	45,42
FDA ²	41,68	41,67	40,95	39,76	42,89	42,85	38,64	39,80	40,29	42,39	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	8,12
LigninaH ₂ SO ₄ ²	4,95	4,99	5,33	4,71	4,67	5,34	4,48	4,75	4,91	5,44	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	13,15
Cutina ²	27,88	27,80	26,75	25,22	27,75	27,18	25,29	26,96	26,54	27,92	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	6,91
Lignina/FDNcp, %	11,64	11,90	12,67	11,23	11,13	12,90	10,60	11,00	11,69	12,76	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	13,94
Cutina/FDNcp, %	65,53	66,31	63,61	60,11	66,05	65,64	59,84	62,42	63,19	65,47	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	6,94

¹ MS = matéria seca; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; NNP = nitrogênio não-protéico; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; B₁ + B₂ = (NNP – NIDN); FDN = fibra em detergente neutro; FDNcp = FDN corrigido para cinza e proteína; CNFcp = carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína; FDA = fibra em detergente ácido. ² expresso em % da matéria seca; ³ expressos em % do nitrogênio total; ⁴ D = controle vs tratamento para destoxificação; A x T = alcalino vs térmico; FA = fonte de agente alcalino, Ca(OH)₂ vs CaO; FA x D = interação entre fonte e dose de agente alcalino; L = linear; Q = quadrático; ns = não significativo (P>0,05), * = significativo (P<0,05). CV = coeficiente de variação.

Tabela 4 - Regressões lineares significativas ($P < 0,05$) da composição química do farelo de mamona em função da dose de agente alcalino (Ca(OH)_2 ou CaO) ou do tempo de autoclavagem ($1,23 \text{ kg/cm}^2$)

Variável (Y) ¹	Equação	R ²
Cinzas (% MS)	$\hat{Y} = 8,556^* + 0,1012^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,99
NIDN (% NT)	$\hat{Y} = 17,695^* + 0,1870^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,96
	$\hat{Y} = 16,345^* + 0,1294^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,98
B ₃ (% NT)	$\hat{Y} = 11,208^* + 0,1890^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,95
	$\hat{Y} = 10,08^* + 0,1317^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,98
B ₁ + B ₂ (% NT)	$\hat{Y} = 57,378^* - 0,2060^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,78
	$\hat{Y} = 58,814^* - 0,1380^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,99
FDN (% MS)	$\hat{Y} = 51,940^* + 0,0902^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,99
	$\hat{Y} = 51,795^* + 0,0422^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,94
CNFcp (% MS)	$\hat{Y} = 6,3215^* - 0,0699^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,99
Cutina (% MS)	$\hat{Y} = 28,272^* - 0,0434^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,85
Cutina/FDNcp (%)	$\hat{Y} = 66,869^* - 0,0917^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,71

¹ NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; B₃ = (NIDN – nitrogênio insolúvel em detergente ácido); B₁ + B₂ = (nitrogênio não-proteico – NIDN); FDN = fibra em detergente neutro; CNFcp = carboidrato não-fibroso corrigido para cinza e proteína. * significativo ($P < 0,05$).

A destoxificação apresenta efeito ($P < 0,05$) somente sobre os teores de cinzas, nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), frações B₃ (NIDN – NIDA) e B₁+B₂ (NT – (NNP + NIDN)) da proteína, fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos corrigidos para cinza e proteína (CNFcp). Como esperado, a destoxificação do FM aumenta ($P < 0,05$) o teor de cinzas em razão da adição de minerais no tratamento químico, observando-se aumento ($P < 0,05$) de 1,012 unidades percentuais de cinzas (%MS) para cada aumento de 10g Ca(OH)_2 ou CaO /kg de FM.

Aumentos ($P < 0,05$) na fração NIDN apresentam-se como principal alteração na composição química do FM submetido à destoxificação. Observam-se aumentos ($P < 0,05$) de 1,187 de NIDN (% do NT) para cada aumento de 10g Ca(OH)_2 ou CaO /kg de FM e 1,294 de NIDN (% do NT) para cada aumento de 10 minuto de autoclavagem ($1,23$

kg/cm²), sem haver diferenças entre os métodos. Salienta-se que o FM controle permaneceu em estufa a 65°C durante o mesmo tempo que o FM submetido ao tratamento químico e, portanto, o processo de secagem em estufa ventilada não interferiu nos resultados.

A fração NIDN representa os compostos nitrogenados associados à carboidratos e lignina da parede celular. Apesar da elevada temperatura (123°C) que o FM foi submetido no tratamento térmico, em razão da baixa umidade (<11%) do FM não houve efeito sobre a fração de nitrogênio insolúvel em meio ácido (NIDA), fração esta associada à lignina e considerada de baixa disponível aos microrganismos ruminais e de baixa digestibilidade intestinal (Van Soest, 1994; Detmann et al., 2006; Henriques et al., 2007). Estes resultados indicam que as proteínas verdadeiras solúveis do FM ao serem desnaturadas por tratamentos alcalinos ou físicos (Figura 1) tornaram-se insolúveis em meio neutro, aumentando-se (P<0,05) a fração B₃ (NIDN-NIDA), de menor degradabilidade ruminal, em detrimento (P<0,05) da fração B₁ + B₂, de mais rápida degradação (Sniffen et al., 1992).

O teor de FDN aumenta (P<0,05) em 0,902 e 0,422 unidades percentuais (%MS) para cada aumento de 10g Ca(OH)₂ ou CaO /kg de FM e de 10 minutos de autoclavagem (1,23 kg/cm²). Além disso, o teor de FDN do FM submetido ao tratamento químico é maior (P<0,05) que o tratamento térmico. A ausência de efeitos sobre o teor de FDN corrigido para cinzas e proteínas (FDN_{cp}) indica que o aumento (P<0,05) no teor de FDN ocorreu por contaminações provocadas pelo aumento (P<0,05) nas cinzas e NIDN. A contaminação tanto por cinzas quanto por NIDN do tratamento químico explica o maior (P<0,05) valor de FDN em relação ao tratamento térmico, o qual apresenta efeito (P<0,05) somente sobre a fração de NIDN.

Nota-se que o tratamento alcalino térmico não alterou o teor de FDN_{cp} e de lignina do FM. Em diversos estudos foram demonstrados que tratamentos alcalinos e com pressão (acima de 4 kgf/cm²) de materiais ricos em parede celular lignificadas removem ligações tipo ésteres entre lignina e hemicelulose, tornando a hemicelulose e parte da lignina solúvel em meio neutro. Todavia, a eficácia dos tratamentos depende da presença de ligações tipo ésteres entre carboidratos e lignina, as quais são minoritárias em dicotiledôneas (Fahey et al., 1993; Van Soest, 1994). Desta forma, a baixa presença de interações carboidratos-lignina do tipo ésteres na parede celular do FM, possivelmente apresenta-se como um dos fatores que explica a ausência de efeitos dos tratamentos alcalino e térmicos sobre a fração lignina e FDN_{cp}.

Observa-se reduções ($P < 0,05$) lineares no teor de CNF_{cp} com aumento na dose de agente alcalino, independente da fonte. Como essa fração é determinada por diferença ($100 - (PB + EE + Cinzas + FDN_{cp})$), as modificações ocorreram devido ao aumento no teor de cinzas e não por alterações na composição dos CNF_{cp}, a semelhança do observado para FDN.

Todavia, verifica-se que os teor de cutina (% MS) bem como sua participação na FDN_{cp} reduzem ($P < 0,05$) em 0,434 e 0,917 unidades percentuais para cada aumento de 10 g de Ca(OH)₂ ou CaO/kg de FM. A participação majoritária da cutina na FDN do FM (63,82% da FDN) indica elevada presença de casca da semente de mamona (Van Soest, 1994). A cutina é principal fração não fenólica da lignina bruta, composta por polímeros de ésteres de hidroxi-ácidos graxos de cadeia longa e álcoois, presente na epiderme de tecidos de plantas, conferindo proteção superficial as mesmas. Embora não forma ligações com carboidratos, por ser indigestível, apresenta-se como barreira à entrada de microrganismos ruminais reduzindo a extensão da digestão (Van Soest, 1994). Apesar de modesta (máximo

de 2,6 unidades percentuais na dose 60 g/kg), a reduções no teor de cutina é indicativo de rompimento de parte das ligações tipo ésteres entre os polímeros, por saponificação, solubilizando-os (Van Soest, 1994).

Apesar da cutina apresentar características que à diferem da fração lignina, sua separação não é rotineiramente adotada nas análises de alimentos para ruminantes, o que pode ampliar os erros de predição dos efeitos da lignina sobre os processos de digestão e passagem da fração insolúvel em detergente neutro, notadamente em alimentos à base de cascas de cereais e de oleaginosas (Van Soest, 1994).

Na Tabela 5 são apresentados os efeitos da destoxificação do FM por meio de tratamento alcalino ou térmico sobre os parâmetros de cinática de degradação ruminal da PB, FDN e MS, por meio de incubação *in situ* e, sobre a digestibilidade verdadeira intestinal *in vitro* da proteína não-degradada no rúmen. Na Tabela 6 estão descritas as regressões significativas para efeito da dose de agente alcalino ou tempo de autoclave sobre os parâmetros de cinética de degradação ruminal da PB, FDN e MS. Observa-se que a destoxificação não afeta as estimativas das frações solúvel (a) e insolúvel potencialmente degradável (b) da PB do FM, mas reduz ($P<0,05$) a taxa de degradação da fração b em ambos os métodos, sem haver diferenças entre os mesmos. Não houve efeito de interação entre fonte e dose de agente alcalino para todos os parâmetros, porém a taxa de degradação e conseqüentemente a fração efetivamente degradada no rúmen da PB (DEPB) reduzem ($P<0,05$) em 0,004 unidades percentuais/hora e 1,587 unidades percentuais para cada aumento de 10g de Ca(OH)_2 ou CaO/kg de FM. O aumento no tempo de tratamento térmico exerceu o mesmo efeito, sendo observado reduções ($P<0,05$) de 0,002 unidades percentuais/hora e 1,206 unidades percentuais para cada aumento de 10 minutos no tempo de autoclave (1,23 kgf/cm² e 123°C).

Tabela 5 - Efeito da destoxificação do farelo de mamona por meio de tratamento alcalino ou térmico sobre os parâmetros de cinética de degradação ruminal da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) obtidos por meio de incubação *in situ*, e sobre a digestibilidade intestinal verdadeira da proteína não degradável no rúmen *in vitro* (DI-PNDR)

Item ¹	Controle	Tratamento para destoxificação									Efeitos (Valor - P) ²								CV (%)
		Alcalino - fonte (g/kg)						Térmico (minutos)			D	A x T	FA	FA x D	Dose		Tempo		
		Ca(OH) ₂			CaO			20	60	90					L	Q	L	Q	
20	40	60	20	40	60	30	60	90											
PB																			
a, %	24,52	25,55	29,23	21,56	27,36	26,79	26,77	24,19	20,56	22,56	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	16,45
b, %	66,45	67,93	62,88	67,72	61,48	63,96	61,53	68,04	68,64	67,70	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	8,59
Kd, h ⁻¹	0,0536	0,0406	0,0344	0,0336	0,0435	0,0359	0,0308	0,0449	0,0428	0,0314	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	21,67
DE %	58,90	55,83	54,86	48,78	55,96	53,52	50,22	56,38	52,22	48,68	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	5,23
DI - PNDR, %	65,30	68,96	67,73	64,59	67,72	63,08	62,99	65,60	65,60	67,36	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	7,12
FDN																			
b, %	32,64	33,15	32,90	32,04	35,53	34,12	32,38	33,05	35,30	33,07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	4,83
I, % ¹	67,36	66,85	67,10	67,96	64,47	65,88	67,62	66,95	64,70	66,93	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,43
Kd, h ⁻¹	0,0461	0,0522	0,0542	0,0571	0,0463	0,0517	0,0577	0,0458	0,0477	0,0473	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	18,27
L, h	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	10,79
DE, %	15,66	16,93	17,11	17,08	17,08	17,35	17,35	15,80	17,23	16,08	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,605
RRb, h	3,40	3,24	3,16	2,99	3,69	3,35	3,01	3,45	3,61	3,40	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	11,15
MS																			
a, %	19,24	21,44	19,58	17,80	20,76	19,11	19,85	18,75	15,43	18,01	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	14,01
b, %	36,89	40,36	41,24	41,55	39,60	39,80	38,49	39,06	40,66	39,45	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	16,36
Kd, h ⁻¹	0,0531	0,0334	0,0512	0,0368	0,0426	0,0496	0,0350	0,0476	0,0499	0,0401	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	42,58
DE %	38,24	37,53	37,1	35,42	38,98	38,93	35,70	37,80	35,74	35,57	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	3,99

¹a = fração solúvel, b = fração insolúvel potencialmente degradável no rúmen, I = fração indegradável no rúmen; kd = taxa de degradação da fração b, I = latência discreta; DE = fração efetivamente degradada considerando taxa de passagem (kp) de 0,05; RRb = efeito de repleção ruminal da fração b da FDN, em horas = ((b/100)/(kd+0,05)).²D = controle vs tratamento para destoxificação; A x T = alcalino vs térmico; FA = fonte de agente alcalino, Ca(OH)₂ vs CaO; FA x D = interação entre fonte e dose de agente alcalino; L = linear; Q = quadrático; Ns = não significativo (P>0,05), * = significativo (P<0,05). CV = coeficiente de variação.

Tabela 6 - Regressões lineares significativas dos parâmetros de cinética de degradação ruminal *in situ* da proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e matéria seca (MS) do farelo de mamona em função da dose de agente alcalino (Ca(OH)₂ e/ou CaO) ou do tempo de autoclavagem (15 psi)

Variável (Y) ¹	Equação	R ²
PB		
Kd, h ⁻¹	$\hat{Y} = 0,0514^* - 0,0004^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,9321
	$\hat{Y} = 0,0535^* - 0,0002^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,9416
DE, %	$\hat{Y} = 59,1545^* - 0,1587^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,9781
	$\hat{Y} = 59,3010^* - 0,1206^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,9934
FDN		
RRb, h	$\hat{Y} = 3,5469^* - 0,0078^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,8740
MS		
DE, %	$\hat{Y} = 38,7855^* - 0,0506^* \times \text{Dose de agente alcalino (g/kg)}$	0,7773
	$\hat{Y} = 38,3931^* - 0,0429^* \times \text{Tempo de autoclavagem (minutos)}$	0,9211

¹k_d = taxa de degradação da fração potencialmente degradável; DE = fração efetivamente degradada no rúmen, considerando taxa de passagem (kp) de 0,05; RRb = efeito de repleção ruminal da fração b da FDN.

* significativo a 5%.

Reduções na degradabilidade ruminal de farelos de oleaginosas submetidos a tratamentos térmicos e alcalinos também foram descritos (NRC, 2001). O mecanismo de proteção ruminal promovido por tratamentos térmicos envolve principalmente formações de interações aminoácidos-carboidratos (reação de Maillard), aminoácidos-aminoácidos e desnaturação. Em tratamentos alcalinos a desnaturação das proteínas é considerado o principal mecanismo de proteção ruminal (Broderick et al., 1991). A ausência de efeito dos tratamentos alcalino ou térmico sobre a fração NIDA (Tabela 3) indica a não ocorrência de reações aminoácidos-carboidratos. Em adição, o desaparecimento das proteínas solúveis em pH com a destoxificação do FM (Figura 1), sugere que a desnaturação das proteínas foi o principal fator responsável pela redução (P<0,05) na taxa de degradação da fração potencialmente degradável da PB, com a destoxificação do FM, independente do método (alcalino ou térmico).

Com a quebra de interações não covalentes que mantêm as estruturas secundária e terciárias de proteínas (desnaturação), grupos hidrofóbicos são expostos, resultando na diminuição da solubilidade da proteína em soluções aquosas. A solubilidade da proteína, por sua vez, é um dos fatores-chaves para iniciar a atividade proteolítica, pois favorece os mecanismos de adesão da proteína alimentar à superfície bacteriana, sendo utilizada mais como índice de taxa do que de extensão de proteólise (Owens & Zinn, 1988; Bach et al., 2005). Desta forma, a desnaturação das proteínas solúveis promovida pelo tratamento alcalino e térmico resultou em redução na solubilidade e, por conseguinte, na taxa de degradação ruminal, mas sem afetar a fração potencialmente degradada da PB (fração A + B) do FM.

Conforme discutido anteriormente, a destoxificação do FM causou aumento na fração B₃ (NIDN-NIDA), de mais lenta degradação, em detrimento da fração B₁ + B₂, de mais rápida degradação (Tabela 3). Este comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 4, onde observa-se na curva de desaparecimento ruminal da PB, duas frações distintas da fração B, uma mais rapidamente degradada (até 4 horas) e outra fração mais lentamente degradada. Verificam-se nas maiores doses de agente alcalino e nos maiores tempos de autoclave, reduções na fração mais rapidamente degradada e aumento na fração lentamente degradada, em relação ao tratamento controle, mas sem afetar a extensão da degradação. Este comportamento reforça os argumentos anteriormente apresentados que a destoxificação do FM com tratamento alcalino ou térmico não afeta a extensão (fração a + b), mas a efetividade da degradação ruminal devido às mudanças na composição da fração potencialmente degradável da PB.

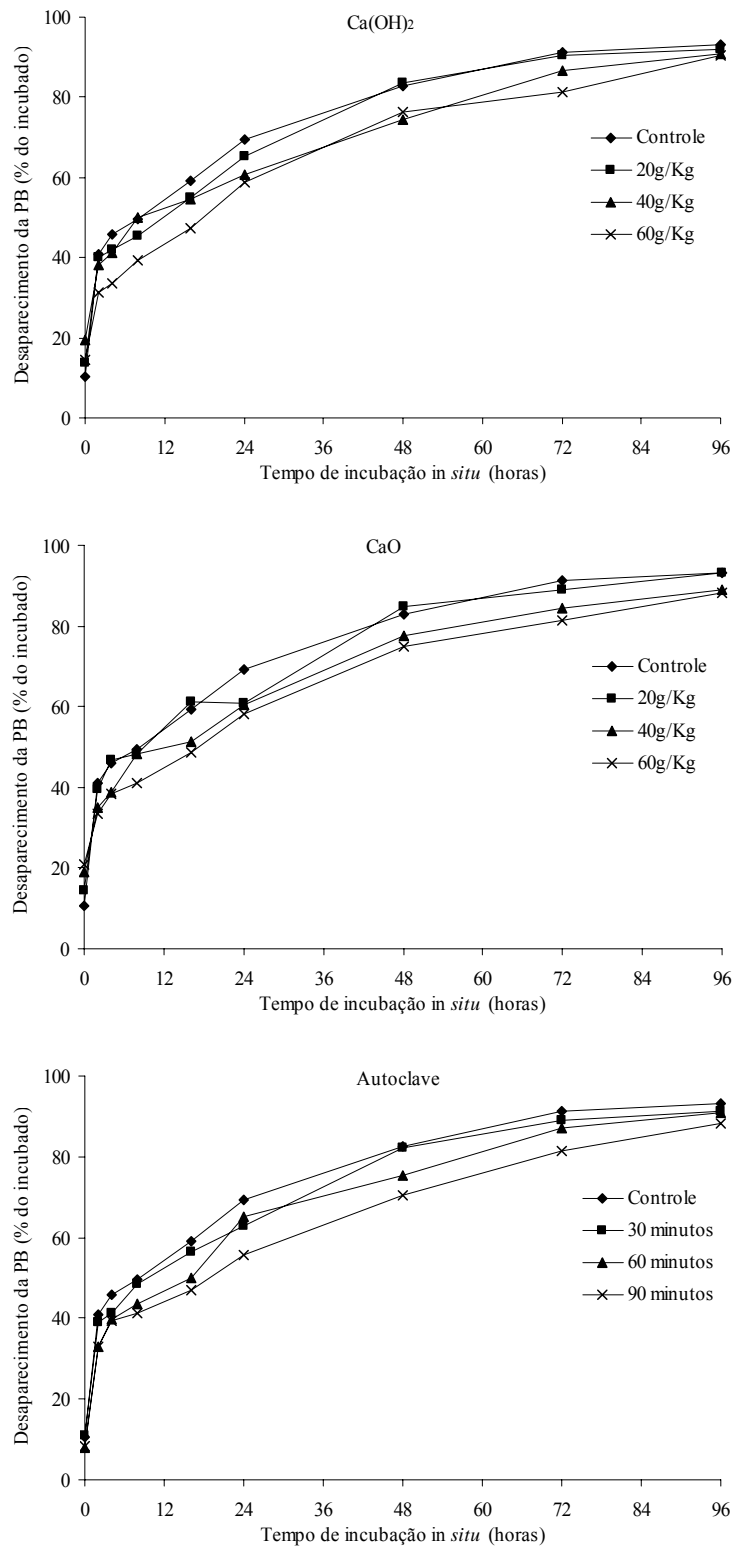


Figura 4 – Perfil médio de desaparecimento cumulativo ruminal *in situ* da proteína bruta (PB) do farelo de mamona tratado com diferentes doses de Ca(OH)₂ ou CaO (20, 40 e 60 g/kg) ou com diferentes tempos de autoclavagem à 123°C (30, 60 e 90 minutos).

A degradação de proteína dietética no rúmen constitui evento chave para disponibilização de compostos nitrogenados essenciais para a microbiota ruminal, fonte majoritária de aminoácidos essenciais absorvidos no intestino delgado em animais ruminantes. Considerando a deficiência de aminoácidos essenciais do farelo de mamona (principalmente lisina, metionina e histidina) em relação à proteína de origem microbiana ruminal, a redução ($P < 0,05$) na degradabilidade ruminal *in situ* com a destoxificação do farelo de mamona, por si, poderá reduzir o suprimento de aminoácidos essenciais limitantes no intestino delgado afetando o desempenho animal (NRC, 2001; Valadares Filho et al., 2006).

Todavia, salienta-se que avaliações *in situ* refletem as características intrínsecas do alimento, os quais determinam sua potencialidade. A expressão efetiva da disponibilidade *in vivo* dos nutrientes no alimento, por sua vez, depende da ação dos sistemas enzimáticos (Detmann et al., 2008). Sob estes pressupostos, o aumento na atividade dos sistemas enzimáticos microbianos e animal por redução dos efeitos inibitórios da ricina sobre a síntese protéica (Hass-Kohn et al., 1980; Endo & Tsurugi, 1988; Olveira et al., 2008a,b), apresenta-se como fator compensatório da queda ($P < 0,05$) na potencialidade da degradação ruminal da PB com a destoxificação do farelo de mamona.

As ausências de efeitos sobre a extensão de degradação ruminal e digestibilidade intestinal verdadeira *in vitro* da proteína não-degradada no rúmen (DIV-PNDR) são esperados, em razão da ausência de efeito na fração NIDA (Tabela 3). A fração NIDA por apresentar baixa degradação ruminal e baixa digestibilidade intestinal é adotada como indicador da indegradabilidade ruminal e indigestibilidade intestinal da proteína dietética (Van Soest, 1994; NRC, 2001; Detmann et al., 2006; Henriques et al., 2007; Detmann et al., 2008).

Os métodos de destoxificação não afetam os parâmetros de cinética de degradação ruminal *in situ* da FDN. Apesar de não haver diferenças significativas para a taxa de degradação ruminal (kd) da fração potencialmente degradável da FDN (b), em termos absolutos, observou-se aumento médio 24,5% na dose de 60 g de agente alcalino/kg de FM em relação ao controle.

O incremento obtido sobre a taxa de degradação ruminal da fração potencialmente degradável da FDN com os tratamentos alcalinos do FM pode ser melhor visualizado por intermédio da Figura 5, onde se verifica maior velocidade de utilização do substrato (FDN) nas maiores doses de agente alcalino sem, contudo, afetar os resíduos não degradados (extensão da degradação). O aumento no valor absoluto da kd, por sua vez, promoveu reduções ($P < 0,05$) lineares do efeito repleção ruminal da FDN potencialmente degradável (RRb) com aumento da dose de agente alcalino.

O efeito de repleção ruminal, em suma, representa o tempo que a fibra permanece ocupando espaço no rúmen, com implicações negativas sobre o consumo (Van Soest, 1994). Em adição, conforme abordado por Costa et al., (2008), os processos de trânsito e passagem ruminal são interligados e, neste sentido, incrementos na taxa de degradação propicia ampliações sobre a taxa de passagem ruminal, indicando que os efeitos sobre a repleção ruminal seriam mais proeminentes *in vivo* do que aqueles observados *in situ* ou *in vitro*.

O maior valor absoluto para taxa de degradação ruminal da fração potencialmente degradável da FDN pode estar relacionado aos efeitos do tratamento alcalino sobre o rompimento de ligações ésteres entre os polímeros de cutina (Van Soest, 1994), reduzindo seu efeito de barreira física e, conseqüentemente, aumentando-se a exposição da fração potencialmente degradável da FDN à ação microbiana. Relatos de aumentos na degradação ruminal da FDN de materiais ricos em lignina submetidos à

pressão foram verificados, mas com pressão quatro vezes superior à utilizada no presente trabalho (Garcia & Pires, 1998), o que pode explicar as ausências de efeito do tratamento térmico nos parâmetros de cinética de degradação da FDN.

A cinética de degradação ruminal da MS é reflexo do comportamento das frações de nutrientes que os compõem (Figura 6). Neste sentido, as reduções ($P < 0,05$) lineares na degradabilidade ruminal efetiva com aumento da dose de agente alcalino ou no tempo de autoclave, são reflexos dos efeitos sobre a degradabilidade da PB.

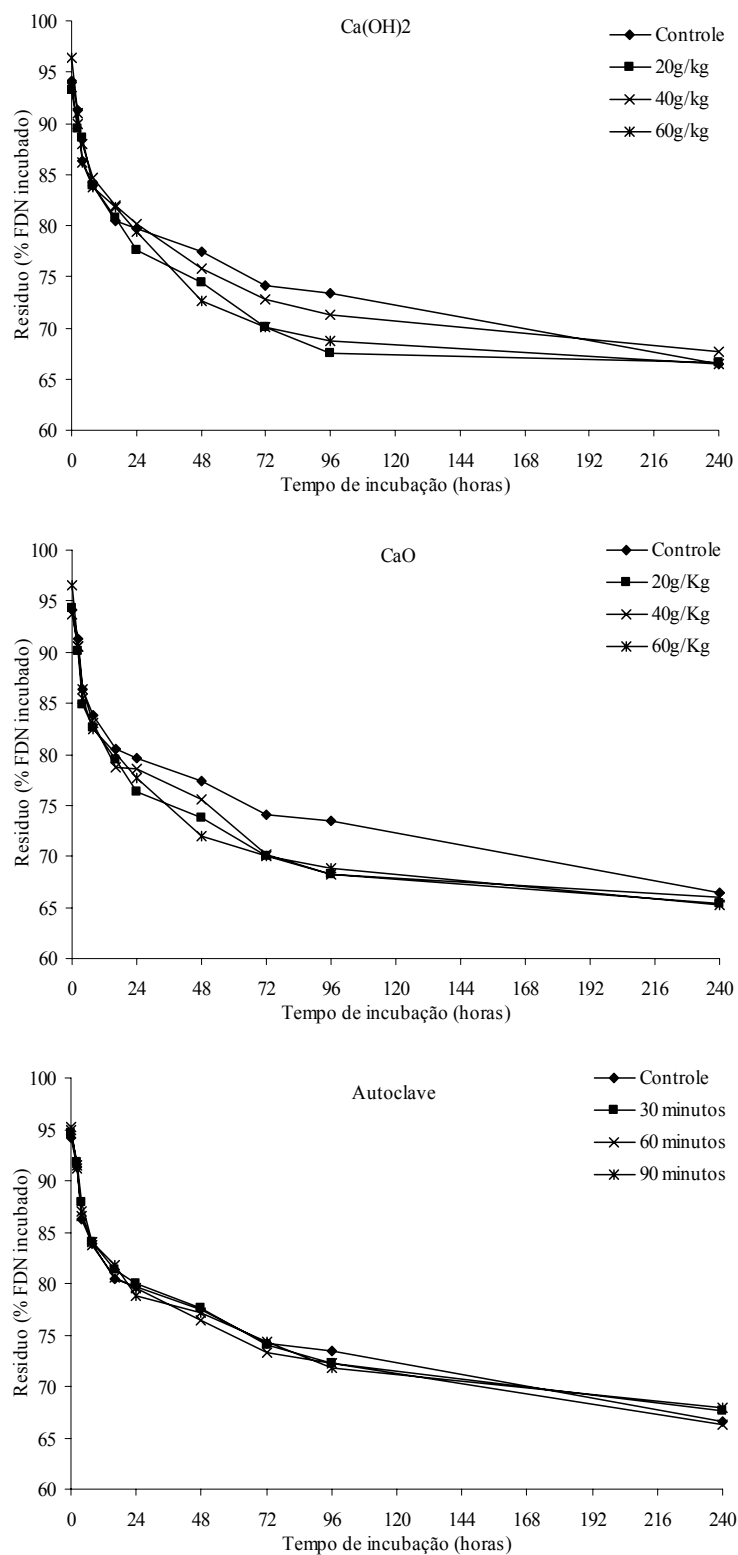


Figura 5 – Médias para os resíduos de fibra em detergente neutro (FDN) em função do tempo de incubação ruminal *in situ* do farelo de mamona tratado com diferentes doses de Ca(OH)₂ ou CaO (20, 40 e 60 g/kg) ou com diferentes tempos de autoclavagem a 123^oC (30, 60 e 90 minutos).

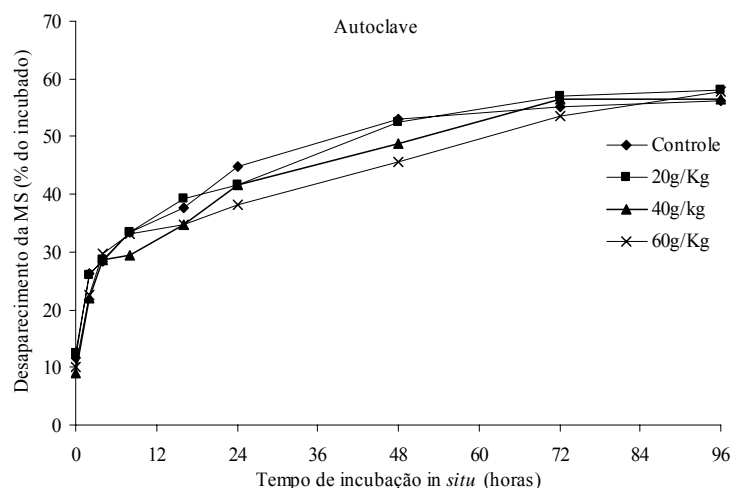
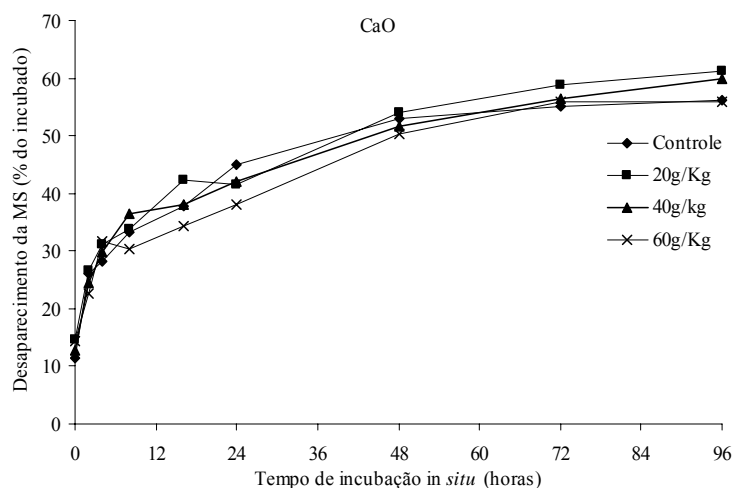
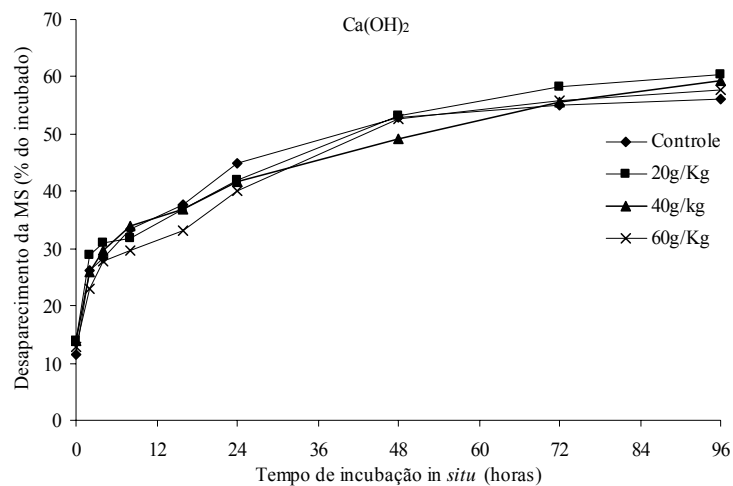


Figura 6 – Médias do perfil de desaparecimento cumulativo ruminal *in situ* da matéria seca (MS) do farelo de mamona tratado com diferentes doses de Ca(OH)₂ ou CaO (20, 40 e 60 g/kg) ou com diferentes tempos de autoclavagem 123^oC (30, 60 e 90 minutos).

Conclusões

O tratamento térmico com autoclave a 1,23 kg/cm² (15 psi) durante 90 minutos, ou o tratamento alcalino com hidróxido de cálcio ou óxido de cálcio, diluídos em água (1:10), na dose de 60 g/kg de farelo, mostram-se eficazes em desnaturar a ricina.

O tratamento térmico ou alcalino do farelo de mamona reduz a degradabilidade ruminal *in situ* da proteína bruta e da matéria seca, mas não afeta a digestibilidade intestinal da proteína não-degradável no rúmen e a degradabilidade ruminal *in situ* da FDN. Todavia, o tratamento alcalino reduz o efeito de repleção ruminal da FDN potencialmente degradável e, portanto, apresenta maior potencial de melhoria no valor nutritivo do farelo de mamona em relação ao tratamento térmico.

Literatura Citada

- ANANDAN S.; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH J. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal feed science and technology**, v.120, p.159-168, 2005.
- ASLANI, M.R.; MALEKI, M.; MOHRI, M. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, v.49, n.1, p.400-406, 2007.
- AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M. et al. Ricin poisoning: a comprehensive review. **The Journal of the American Medical Association**, v.294, n.9, p.2342-2351, 2005.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, Suppl. E., p.9-21, 2005.
- BANDEIRA, D.A.; CARTACHO, W.V.; SEVERINO, L.S. et al. Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. In: I Congresso Brasileiro de Mamona, 2004. **Anais ...** Campina Grande. Disponível em: www.cnpa.embrapa.br.
- BORCHERS, R. Castor bean meal. Part 1: Destruction of the toxic factor. **Poultry Science**, v.28, p.568-570, 1949.
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

- BRODERICK, G.A.; WALLACE, R.J.; ORSKOV, E.R. Control of rate and extent of protein degradation. In: **Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants**. Eds.: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. Orlando, FL: Academic Press, 1991, p.541-592.
- CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1459-1465, 1995.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.3, p.495-503, 2008.
- CREPPY, E.E.; LUGNIER, A.A.J.; DIRHEIMER, G. Isolation and properties of two toxic tryptic peptides from ricin, the toxin of *Ricinus communis* L. (castor bean) seeds. **Toxicon**, v.18, n.5-6, p.649-660, 1980.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Digestibilidade dos compostos nitrogenados insolúveis em detergente ácido em bovinos manejados em pastagens de capim braquiária. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1463-1468, 2006.
- DETMANN, E. ; PAULINO, M.F. ; VALADARES FILHO, S.C.. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: II Simpósio Internacional de Gado de Corte. **Anais...** Eds.: VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; PAULINO, P.V.R. et al. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, p.21-52, 2008.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of Ricin A-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.18, p.8735-8739, 1988.
- FAHEY, G.C.; BOURQUIN, L.D.; TITGEMEYER, E.C. et al. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. In: **Forage cell wall structure and digestibility**. ed. JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATIFIELD, R.D. et al. Madison: America Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America, p.715-766, 1993.
- GAILLARD, Y.; PEPIN, G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by higher-performance liquid chromatography- (tandem) mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.733, p.181-229, 1999.

- GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. Tratamento de volumosos de baixa qualidade para utilização na alimentação de ruminantes. In: Congresso Nacional dos Estudantes de Zootecnia, 1998, Viçosa. **Anais...** Ed.: PEREIRA, A.L.; FARIAS, D.E.; CARDOSO, G.N et al. Viçosa: Associação Mineira dos Estudantes de Zootecnia, p.33-62, 1998.
- GARDNER, H.K.; D'AQUI, E.L.; KOLTUN, S.P. et al. Destoxification and deallergenization of castor beans. **Journal of the American Oil Chemistry Society**. v.37, p.142-148, 1960.
- HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. University of Florida, 2000. P.A-25(Bulletin 339, April-2000).
- HAAS-KOHN, L.J.G.; LUGNIER, A.A.J.; TIBONI, O. et al. Inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis by a limited tryptic digest of ricin, the toxin of *Ricinus communis* L. seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.97, n.3, p.962-967, 1980.
- HENRIQUES, L.T.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C. et al. Frações dos compostos nitrogenados associados à parede celular em forragens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.258-263, 2007.
- KABAT, E.A.; HEIDELBERGER, M.; BEZER, A.E. A study of the purification and properties of ricin. **Journal of Biological Chemistry**, v.168, p.629-639, 1947
- KIM, B.K. Effects of oil milling steps on residual toxin and antigen activities of castor bean. **Food Science and Biotechnology**, v.10, n.3, p.305-310, 2001.
- KODRAS RUDOLPH, C.K., WHITEHAIR, R.M. Studies on the detoxification of castor seed pomace. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v.26, p.641-644, 1949.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução: SIMÕES, A.A.; LODI, W.R.N. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LEVY, M.; BENAGLIA, A.E. The influence of temperature pH upon the rate of denaturation of ricin. **Journal of Biological Chemistry**, v.186, n.2, p.829-847, 1950.

- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.
- MARCONDES, M.I. **Desempenho de bovinos alimentados com individualmente ou em grupos, exigências nutricionais e avaliação protéica de alimentos para ruminantes**. Viçosa, MG: UFV, 2007, 136p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.
- OLIVEIRA, A.S.; CAMPOS, J.M.S.; DETMANN, E. et al. Eficiência de utilização de nutrientes e função hepática de ovinos alimentados com dietas contendo farelo ou torta de mamona tratado com hidróxido de cálcio, no prelo, 2008a.
- OLIVEIRA, A.S.; CAMPOS, J.M.S.; LANA, R.P. et al. Degradação ruminal da ricina e seu efeito sobre o crescimento microbiano, no prelo, 2008b.
- OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v.249, p.627-631, 1974.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. Estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- OWENS, F.N.; ZINN, R. Protein metabolism of nutrition animals. In: **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**, Ed.: Church, D.C. New Jersey-USA: Prentice Hall, 1988, p.227-249.
- PINKERTON, S.D.; ROLFE, R.; AULD, D.L. et al. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, v.39, p.353-357, 1999.
- RETAMAL, C.A.; THIEBAUT, P.; ALVES, E.W. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. **Analytical Biochemistry**, v.268, p.15-20, 1999.

- SEVERINO, L.S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. Embrapa Algodão. Documentos (134), 2005, 31p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.
- VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, P.V.R.; MAGALHÃES, K.A. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos** 2.ed. Viçosa: UFV, DZO, 2006. 329p.
- WANNEMACHER Jr., R.W.; HEWETSON, J.F.; LEMLEY, M.A. et al. Comparison of detection of ricin in castor bean extracts by biosassays, immunoassays, and chemical procedures. **Toxicon**, v.30, n.5-6, p.562, 1992.
- WALLER, G.R.; NEGI, S.S. Isolation of ricin, ricinine, and the allergenic fraction from castor seed pomace from two different sources. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.35, p.409-412, 1958.

Desempenho produtivo e eficiência de utilização de nutrientes em vacas leiteiras alimentadas com farelo de girassol

RESUMO – Avaliou-se o efeito de quatro níveis de inclusão de farelo de girassol (FG) na dieta (0, 7, 14 e 21%, base da MS) de vacas leiteiras com produção de 30 kg/dia sobre o desempenho produtivo e a eficiência de utilização dos nutrientes. Utilizou-se 12 vacas da raça Holandesa distribuídas em três quadrados latinos 4x4. As dietas foram isonitrogenadas (16,2% de PB, base MS) contendo 55% de silagem de milho, na base da MS. O FG substituiu a mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 47,37% de farelo de trigo, na base da MS (FS:FT). Adotou-se o teste de Williams como procedimento de comparações de médias. O FG apresentou maior valor absoluto para degradabilidade ruminal efetiva *in situ* da PB em relação à mistura FS:FT (68,68 vs 62,92%). Os consumos dos nutrientes não foram afetados pelo FG, exceto o de EE que reduziu ($P < 0,05$) a partir de 7% de FG e da FDN que aumentou ($P < 0,05$) a partir de 21% FG. Os coeficientes de digestibilidade da MS, MO e CT, e o teor NDT reduziram ($P < 0,05$) a partir de 21% de FG. Os consumos de MS, EE, CT, CNF digestíveis, bem como o consumo de NDT reduziram ($P < 0,05$) a partir do nível de 7% de FG. A composição do leite não foi afetada pelo FG, mas a produção de leite (PL), produção de lactose e extrato seco total reduziram ($P < 0,05$) a partir de 21% FG. A PL corrigida para 3,5% de gordura, a produção de gordura, proteína e extrato seco desengordurado, e a eficiência de conversão do N dietético em N secretado no leite (EUNleite) reduziram ($P < 0,05$) a partir de 14% de FG. O nível de FG não afetou a síntese de proteína microbiana ruminal (estimada por meio da excreção urinária e secreção no leite de derivados de purinas) e a eficiência de utilização dos substratos energéticos, mas reduziu ($P < 0,05$) a eficiência de utilização do nitrogênio (N) disponível para síntese de nitrogênio microbiano (ECNd) a partir de 21% de FG. Não houve efeito sobre a excreção de N urinário. Em razão das reduções ($P < 0,05$) na ECNd e EUNleite, a partir de 21% de FG elevou-se o valor absoluto de perdas de N na urina e nas fezes. O FG pode ser incluído em até 14% em dietas de vacas leiteiras com produção de 30 kg/dia, sem afetar a produção de leite, a composição do leite e as eficiências de utilização dos componentes nitrogenados e energéticos da dieta.

Palavras-chave: consumo, co-produto, digestibilidade, *Helianthus annuus* L., metabolismo de nitrogênio, produção de leite

Productive performance and nutrients utilization efficiency of dairy cows fed with sunflower meal

ABSTRACT – It was evaluated the effect of four sunflower meal (SFM) levels in the diet (0, 7, 14 and 21%, DM basis) of dairy cows with 30 kg.day⁻¹ production on the productive performance na nutrients utilization efficiency. Twelve Holstein breed cows were distributed in three 4x4 Latin squares. The diets were isoprotein (16.2% CP, DM basis), containing 55% corn silage, DM basis. The SFM substituted the mixture containing 53.57% of soybean meal and 47.37% of wheat meal, DM basis (FS:FT). Williams test was adopted as the average comparison procedure. The SFM presented greater absolute value for CP *in situ* ruminal effective degradability relative to FS:FT mixture (68.68 vs 62.92%). The nutrients intake was not affected by SFM, except that of EE, which reduced (P<0.05) from 7% of SFM, and of NDF, which increased (P<0.05) from 21% of SFM. The DM, OM and TC digestibility coefficients, and the TDN content reduced (P<0.05) from 21% of SFM. The DM, EE, TC, digestible NFC, as well as TDN intake reduced (P<0.05) from 7% of SFM. Milk composition was not affected by SFM, but milk production (PL), lactose and total solids production reduced (P<0.05) from 21% of SFM. The 3.5% fat corrected PL, fat, protein and solids non-fat production, and the conversion efficiency of dietetic N into milk secreted N (EUNmilk) reduced (P<0.05) from 14% of SFM. The level of SFM did not affect rumen microbial protein (estimated by the derivatives in purine urinary excretion and secretion of milk) and energetic substrates utilization efficiency, but reduced (P<0.05) the degradable nitrogen (N) utilization efficiency for microbial N synthesis (NUEd) from 21% of SFM. There was no effect on the N urinary excretion. Because of the ECNd and EUN milk reductions (P<0.05), from 21% of SFM the urine and feces N losses absolute value increased. The SFM can be included in up to 14% in diets of dairy cows with production of 30 kg/day, without affecting the milk production, milk composition and the efficiencies of using nitrogen and energy components of the diet.

Key Words: intake, co-products, digestibility, *Helianthus annuus* L., nitrogen metabolism, milk production

Introdução

A cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.) constitui importante fonte de óleo vegetal com alto valor nutricional para o consumo humano. Estimativas oficiais demonstraram que, após as culturas da palma, soja e canola, o girassol é a principal fonte de óleo vegetal no mundo, respondendo por 7,9% da produção no ano de 2007/2008 (USDA, 2008). No Brasil, o girassol apresenta menor expressão, respondendo por apenas 0,2% da produção de sementes de oleaginosas na safra 2007/2008, inferior à soja, algodão, dendê, amendoim e mamona (CONAB, 2008; MAPA, 2008).

Com a perspectiva de crescimento do uso de óleos vegetais para produção de biodiesel vislumbram-se ampliações na produção de girassol. Em estudos sobre a viabilidade econômica e de logística, avaliando-se diversas oleaginosas com tecnologias de produção conhecidas, indicou-se o girassol como uma das opções para produção integrada de biodiesel no Brasil (Barros et al., 2006; Negrello, 2008).

A semente de girassol contém entre 35 a 45% de extrato etéreo e 25 a 30% de casca (Finn et al., 1985; Economides, 1998; NRC, 2001). Durante o processo de extração de óleo obtém-se farelos protéicos com teor de proteína bruta (PB) entre 28 a 50%, na base da MS (Anderson, 2002), cujo valor nutritivo depende da cultivar, do processo de extração do óleo e do grau de decorticação (Hesley, 1994; Canibe et al., 1999). O processo de extração de óleo por solventes resulta em farelos com menor teor de extrato etéreo e maior teor protéico em relação aos processos mecânicos. A casca da semente de girassol contém baixo teor de PB (5%, base da MS), altos teores de fibra em detergente neutro (73,5%, base da MS) e de lignina (26,5%, base da MS) (Arija et al., 1998). Desta forma, o grau de decorticação apresenta-se como principal fator de variação no valor nutritivo do FG.

Em estudos sobre cinética de degradação ruminal observou-se maior degradação ruminal da PB do FG (entre 29 a 40% de PB, base da MS) em relação ao farelo de soja, farelo de algodão, farelo de amendoim e farelo de canola (Erasmus et al., 1994; Branco et al., 2006; Rodriguez et al., 2008), mas menor degradação da MS em relação ao farelo de soja devido à presença de casca (Rodrigues et al., 2008). Em pesquisas *in vitro* demonstrou-se que a fração protéica não-degradada no rúmen do FG (29% de PB, base da MS) apresenta alta digestibilidade intestinal (Branco et al., 2006). Análises do perfil de aminoácidos essenciais indicaram semelhanças do FG (28% de PB e 40% de FDN, base da MS) ao farelo de soja, exceto para o menor teor de lisina e maior de metionina (NRC, 2001).

Em pesquisas realizadas nos EUA e no Brasil demonstrou-se a viabilidade da inclusão em até 11% de FG (37% de PB e 2% de EE, base MS) ou 15% de torta de girassol (25% de EE, base MS) na dieta, em substituição ao farelo de soja e milho grão, para vacas leiteiras com produção abaixo de 20 kg/dia (Schingoethe et al., 1977; Silva et al., 2005). Todavia, os mesmos estudos foram insuficientes para elaborar recomendações de níveis adequados de FG em dietas para vacas de maior potencial de produção de leite, como também para avaliar efeito de níveis mais elevados de FG sobre o desempenho produtivo e a eficiência de utilização de nutrientes.

Desta forma, propõe-se avaliar o efeito de quatro níveis de FG (0, 7, 14 e 21%, base da MS) na dieta sobre o desempenho produtivo e eficiência de utilização dos nutrientes de vacas leiteiras de alta produção.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), durante o período de agosto a novembro de 2007.

Foram utilizadas 12 vacas da raça Holandesa, puras e mestiças, com produção de leite inicial média de $30,8 \pm 4,0$ kg/dia, distribuídas em três quadrados latinos 4X4, balanceados de acordo com o período de lactação. Os animais do 1º, 2º e 3º quadrado latino iniciaram no experimento, em média, com 95, 118 e 171 dias de lactação, sendo que todas as vacas apresentaram no final do experimento menos de 150 dias de gestação.

O experimento foi constituído por quatro períodos, com duração de 21 dias cada um, sendo os 14 primeiros dias de adaptação às dietas e os demais para coleta de dados. Os animais foram alimentados com quatro dietas experimentais referentes a quatro níveis de inclusão do farelo de girassol (FG) na dieta: 0, 7, 14 e 21%, base da matéria seca (MS), em substituição à mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 47,37% de farelo de trigo, base da MS (FS:FT). As dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas contendo 15,8% de proteína bruta (PB), de forma a atender as exigências nutricionais de uma vaca com 640 kg de peso corporal, produzindo 30 kg/dia de leite com 3,5% de gordura (NRC, 2001). A silagem de milho foi utilizada como fonte exclusiva de volumoso, representando 55% da dieta, base da MS. O FG foi adquirido de agroindústria, obtido após processo de extração de óleo das sementes por solvente orgânico, sendo parcialmente decorticado. Após análise prévia do teor de PB dos alimentos, a proporção dos mesmos nas dietas experimentais foi elaborada conforme descrito na Tabela 1. A mistura de microminerais foi balanceada para atender 100% das exigências nutricionais, segundo o NRC (2001).

Tabela 1 – Proporção de ingredientes das dietas experimentais (base da MS)

Ingredientes	Nível de farelo de girassol na dieta (% da MS) ¹			
	0	7	14	21
Silagem de milho	55,00	55,00	55,00	55,00
Milho grão moído	21,10	21,10	21,10	21,10
Farelo de soja	11,25	7,50	3,75	
Farelo de trigo	9,75	6,50	3,25	
Farelo de girassol		7,00	14,00	21,00
Uréia	1,00	1,00	1,00	1,00
Calcário calcítico	0,97	0,97	0,97	0,97
Fosfato bicálcico	0,30	0,30	0,30	0,30
Cloreto de sódio	0,48	0,48	0,48	0,48
Mistura mineral ²	0,15	0,15	0,15	0,15

¹ Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo.

² 38,3% de Mg; 16,1% de S; 3,02% de Zn; 0,8875% de Mn; 0,7149% de Cu; 0,0338% de I; 0,0202% de Se; 0,0074% de Co.

Os animais foram manejados em baias individuais, tipo “Tie Stall”, onde receberam alimentação fornecida *ad libitum* duas vezes ao dia, às 7:00 e às 16:00 horas. No período de coleta, diariamente, em dois turnos, foram feitas pesagens e amostragens das quantidades de silagem de milho e rações concentradas fornecidos e das sobras de cada tratamento. As amostras foram armazenadas a -15°C para posteriores análises químicas.

As fezes foram coletadas diretamente na ampola retal, uma vez ao dia, às 16:00, 14:00, 12:00, 10:00 e 8:00 horas, do 15º ao 19º dias de cada período experimental. As amostras diárias de fezes de cada animal, em cada período, foram armazenadas a -15°C para posterior secagem e análises químicas.

As amostras de silagens de milho e de fezes foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C por 72 horas) e, juntamente com as dos alimentos, foram processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade de 1mm para análise química e 2mm para incubação ruminal *in situ*. Das amostras diárias de fezes secas ao ar

de cada animal, em cada período, foram feitas amostras compostas para posterior análise química.

As análises dos teores de MS, N total, fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (H_2SO_4 72% p/p) foram feitas, segundo métodos descritos em Silva & Queiroz (2002). Para análise da concentração de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com alfa amilase termo-estáveis sem uso de sulfito de sódio, corrigidas para o resíduo de cinzas (Mertens, 2002) e para o resíduo de compostos nitrogenados (Licitra et al., 1996). As análises de FDN e FDA foram realizadas em sistema Ankon[®], utilizando sacos de TNT (tecido-não-tecido), com dimensões de 5 cmx 5cm, mantendo-se relações média de 14 mg de MS /cm² de tecido e 100 mL de detergente neutro/g de amostra seca ao ar. A determinação de nitrogênio não protéico (NNP) dos alimentos foi realizada segundo Licitra et al. (1996).

Os carboidratos totais (CT) foram calculados com adaptações ao proposto por Sniffen et al. (1992) em que: $\text{CT} = 100 - ((\% \text{PB} - \% \text{PB derivada da uréia} + \% \text{uréia}) + \% \text{ de extrato etéreo (EE)} + \% \text{ de cinzas})$. Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) e carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (CNF_{cp}), foram calculados como proposto por Hall (2000), sendo: $\text{CNF} = 100 - [(\% \text{PB} - \% \text{PB derivada da uréia} + \% \text{uréia}) + \% \text{FDN} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas}]$; $\text{CNF}_{\text{cp}} = 100 - [(\% \text{PB} - \% \text{PB derivada da uréia} + \% \text{uréia}) + \% \text{FDN}_{\text{cp}} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas}]$. Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados com adaptações ao descrito por Weiss (1999), pela seguinte equação: $\text{NDT} (\%) = \text{PBD} + \text{FDN}_{\text{cpD}} + \text{CNF}_{\text{cpD}} + 2,25\text{EED}$, em que: PBD = proteína bruta digestível; FDN_{cpD} = fibra em detergente neutro digestível; CNF_{cpD} = carboidratos não-fibrosos digestíveis; e EED = extrato etéreo digestível. A composição química dos alimentos utilizados está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

Itens ¹	Silagem de milho	Milho grão	Farelo de soja	Farelo de trigo	Farelo de girassol
MS (%)	28,77	88,35	88,55	88,28	90,54
MO ²	95,11	98,54	93,71	95,47	93,82
PB ²	7,04	9,52	51,95	19,68	37,54
NNP ³	58,22	21,64	21,44	49,03	36,17
NIDN ³	23,10	8,36	10,52	21,05	15,89
NIDA ³	15,14	5,16	5,78	3,18	5,05
EE ²	1,94	3,86	1,54	3,29	1,35
CT ²	86,13	85,16	40,22	72,50	54,93
FDN ²	55,32	14,29	16,08	47,18	43,54
FDNcp ²	53,36	13,16	11,69	45,34	40,74
FDA ²	35,79	3,61	8,49	15,00	27,33
Lignina H ₂ SO ₄ ²	3,51	0,56	0,49	1,47	4,96
Lignina/FDNcp (%)	6,58	4,26	4,19	3,24	12,17
FDNi ²	24,83	2,44	1,18	14,99	23,54
FDAi ²	13,97	0,67	0,42	7,55	17,74
CNF ²	30,81	70,87	24,14	25,32	11,39
CNF _{cp} ²	32,77	72,00	28,53	27,16	14,19

¹MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; NNP = nitrogênio não-protéico; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; FDN = fibra em detergente neutro; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína; FDA = fibra em detergente ácido; FDNi = FDN indigestível obtido após incubação ruminal *in situ* por 264 horas; FDAi = FDA indigestível obtido após incubação ruminal *in situ* por 264 horas; CNF = carboidrato não-fibroso; CNFcp = CNF corrigido para cinza e proteína.

²Valores em percentagem da MS; ³Valores em percentagem do nitrogênio total.

A quantidade total de MS fecal excretada foi estimada pela concentração de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), obtida após incubação ruminal dos alimentos, sobras e fezes em sacos poliéster (Ankon®, filter bag 57) por um período de 264 horas, segundo Casali et al. (2008). O consumo de ração concentrada foi estimado utilizando-se dióxido de titânio (TiO₂) como indicador, sendo misturado à ração concentrada para cada vaca, imediatamente antes das refeições, na proporção média de 0,79 g/kg de ração, base da matéria natural. O consumo matéria seca de ração concentrada (CMScon)

foi estimado segundo a equação: $CMS_{con} = (EF * [Ti]_{fecal}) / [Ti]_{concentrado}$, onde: EF = excreção de MS fecal (kg/dia); $[Ti]_{fecal}$ = concentração de titânio nas fezes (g/kg) e $[Ti]_{concentrado}$ = concentração de titânio na ração concentrada (g/kg). As análises de dióxido de titânio foram feitas segundo Myers et al. (2004).

O teor de proteína degradada no rúmen das dietas foi calculado utilizando-se a degradabilidade efetiva determinada para cada um dos ingredientes dietéticos, conforme descrição a seguir: Para o ensaio de degradação, utilizaram-se sacos de náilon medindo 16x8 cm, com porosidade de 50 μ , onde se adicionou 5 g de amostra seca ao ar de silagem de milho, milho grão moído, farelo de soja, farelo de trigo ou farelo de girassol. Os tempos de incubação utilizados para avaliação da cinética de degradação da PB e MS foram de 0, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 horas, sendo incluídos os tempos de 72 e 96 horas para o farelo de girassol, farelo de trigo e silagem de milho (NRC, 2001). Para análise da cinética de degradação ruminal da FDN utilizaram-se os tempos de 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 e 240 horas. Utilizou-se esquema de incubação seqüencial e remoção simultânea. As amostras foram incubadas em duplicata no rúmen de uma vaca leiteira em lactação, com 550 kg de peso corporal e produção de leite próxima de 20 kg/dia, por intermédio da fístula ruminal. Decorrido o tempo de incubação, os sacos foram lavados em água e levados à estufa a 65°C por 72 horas, sendo posteriormente avaliados os teores de MS e PB e FDN dos resíduos da incubação.

Os parâmetros da dinâmica de degradação da MS e PB foram estimados utilizando o modelo de crescimento assintótico de primeira ordem reparametrizado por Ørskov & McDonald (1979) descrito pela função: $Y_t = a + b*(1 - e^{-kd*t})$; em que: Y_t = fração degradada no tempo “t” (%); a = fração solúvel (%); b = fração insolúvel potencialmente degradável (%); kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); e t = variável independente tempo (h). Os parâmetros da dinâmica de degradação da FDN foram

estimados utilizando o modelo apresentado por Mertens & Loften (1980), descrito pela função: $Y_t = b * e^{(-kd.(t-L))} + I$; em que: Y_t = resíduo não degradado no tempo “t” (%); b = fração potencialmente degradável da FDN (%); kd = taxa de degradação de b (h^{-1}); e t = variável independente tempo (h); L = latência discreta (h); I = fração indegradável da FDN (%). A degradação ruminal efetiva (DE) da PB, MS e FDN foram calculadas pelo modelo: $DE = a + b*[kd/(kd+kp)]$; em que: a = fração solúvel, apenas para PB e MS; kp = taxa de passagem do alimento pelo rúmen (h^{-1}).

A taxa de passagem (kp) foi calculada de acordo com o NRC (2001), usando as seguintes equações: kp para silagem de milho = $3,054 + 0,614 * CMS$; kp para os alimentos concentrados = $2,904 + 1,375 * CMS - 0,020 * \% \text{ do concentrado na dieta}$, em que: CMS = consumo de matéria seca expresso em % do peso corporal observado. O consumo de proteína bruta degradada no rúmen foi calculado pelo produto do consumo de MS e o teor de PDR da dieta.

As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia, fazendo-se o registro da produção de leite do 15^o ao 21^o dia de cada período experimental. Através de dispositivo acoplado à ordenhadeira foi coletada amostra de leite, aproximadamente 300 mL, nos 18^o e 19^o dia, na ordenha da manhã e da tarde, fazendo-se amostras compostas de cada dia de acordo com a produção de leite. Foram retiradas de cada amostra composta três alíquotas: a primeira alíquota (50 mL) foi acondicionada em frascos plásticos com conservante (Bronopol®), mantidos entre 2 e 6^oC, e encaminhados para o Laboratório de Análises de Qualidade de Leite da Embrapa Gado de Leite, para determinação dos teores de lactose, gordura, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, segundo a metodologia descrita pelo International Dairy Federation (1996); a segunda alíquota foi imediatamente analisada quanto ao teor de proteína bruta (N total x 6,38) (Silva & Queiroz, 2002); a terceira alíquota foi

desproteïnizada com ácido tricloroacético (10 mL de leite misturados com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%), filtrado em papel-filtro, determinando-se no filtrado o teor de nitrogênio total (Silva & Queiroz, 2002) e o restante armazenado a -15°C , para posterior análise de alantoína e uréia. A produção de leite (PL) corrigida para 3,5 % de gordura (PLC) foi calculada segundo Sklan et al. (1992).

No sétimo dia de adaptação e no final de cada período experimental foram feitas pesagens individuais dos animais para avaliar a variação de peso. Os pesos dos animais corresponderam às médias de duas pesagens, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas.

Amostras de sangue foram coletadas no 19^o dia, utilizando tubos de ensaio com anticoagulante (EDTA), centrifugadas a 2.300 xg por 15 minutos, sendo então retiradas amostras de plasma para posterior análise de uréia.

Amostras *spot* de urina foram obtidas de todas as vacas no 17^o dia de cada período experimental, durante micção estimulada por massagem na vulva em três horários: zero, quatro e oito horas após a alimentação matinal. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL de cada horário foram retiradas e diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,072 N, para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e a precipitação do ácido úrico, e armazenadas a -15°C para posteriores análises de nitrogênio total, uréia, alantoína (AL), ácido úrico (AU) e creatinina. Imediatamente antes das análises as amostras de cada horário foram descongeladas, centrifugadas a 2.000 xg por 15 minutos, sendo então formadas amostras compostas (10 mL para cada tempo) por vaca em cada período.

As análises de alantoína na urina (ALU) e no leite (ALL) foram feitas pelo método colorimétrico, segundo Fujihara et al. (1987), descrito por Chen & Gomes (1992). As análises de uréia foram realizadas por meio de sistema enzimático-

colorimétrico pelo método urease, utilizando-se *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.). As análises de ácido úrico na urina foram realizadas por meio do método enzimático-Trinder, utilizando-se *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.) As análises de creatinina na urina foram realizadas por meio do método de ponto final com picrato e acidificante, utilizando-se *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.).

O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina, segundo Valadares Filho & Valadares (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/kg de peso vivo (PV) de creatinina (Chizzotti, 2004).

A excreção total de derivados de purina (PT) foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia. As purinas absorvidas (PA, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de PT (PT, mmol/dia), por meio da equação $PT = 0,85*PA + 0,512*PV^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas (Verbic et al., 1980) e $0,512*PV^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas obtidos para vacas leiteiras (Gonzalez-Ronquillo et al., 2003).

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Nmic, g/dia) foi calculada em função das PA (mmol/dia), por meio da equação $Nmic = (70*PA) / (0,83*0,116*1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116, a relação N-purina:N total nas bactérias (Chen & Gomes, 1992).

Como indicadores de eficiência de utilização de compostos nitrogenados (N) foram utilizados: a eficiência de conversão do N ingerido em N microbiano ruminal (ECNi) = síntese de N microbiano ruminal, em g/dia / consumo de N total, em g/dia; a

eficiência de conversão do N dietético degradado no rúmen em N microbiano ruminal (ECNd) = síntese de N microbiano ruminal, em g/dia / consumo de N degradado no rúmen, em g/dia; o índice de nitrogênio purínico (INP) = excreção urinária de N dos derivados de purina, em g/dia / excreção urinária de N-total na urina, em g/dia (Chen et al., 1999); e a eficiência de conversão do N dietético em nitrogênio secretado no leite (EUNleite) = nitrogênio total secretado no leite, em g/dia / consumo de N total, em g/dia.

O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N_{ing}) e o total de nitrogênio excretado nas fezes (N-fezes), na urina (N-urina) e no leite (N-leite). A determinação do nitrogênio total nas fezes e na urina foi feita segundo técnica descrita em Silva & Queiroz (2002).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1989), e teste de Williams (Williams, 1971), utilizando nível de 5% de probabilidade para o erro tipo I.

As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + (P/Q)_{ik} + (V/Q)_{il} + Q \times T_{ij} + e_{ijkl}$, sendo:

Y_{ijkl} = observação na vaca 1, no período k, submetida ao tratamento j, no quadrado latino i;

μ = constante geral;

Q_i = efeito do quadrado latino i, sendo i = 1, 2, 3;

T_j = efeito do tratamento j, sendo j = 1, 2, 3, 4;

$(P/Q)_{ik}$ = efeito do período k, dentro do quadrado latino i, sendo k = 1, 2, 3, 4;

$(V/Q)_{il}$ = efeito da vaca 1, dentro do quadrado latino i, sendo l = 1, 2, 3, 4;

$Q \times T_{ij}$ = efeito de interação entre o quadrado latino i e o tratamento j; e

e_{ijkl} = erro aleatório, associado a cada observação, pressuposto NID (0; σ^2).

Resultados e Discussão

A composição química das dietas experimentais é apresentada na Tabela 3. Observou-se variação na composição dos compostos nitrogenados, com aumentos de 8% da fração não-protéica (8%) e de 10,4% da fração insolúvel em detergente neutro (NIDN) com a elevação do farelo de girassol (FG) na dieta de 0% para 21%, base da MS. Porém, a participação da fração insolúvel em detergente ácido não se alterou.

Tabela 3 – Composição química das dietas experimentais

Itens ¹	Nível de farelo de girassol na dieta (% da MS) ⁴			
	0	7	14	21
MS (%)	41,37	41,40	41,44	41,47
MO ²	95,93	96,03	96,12	96,21
PB ²	16,16	16,20	16,25	16,29
NNP ³	45,77	47,01	48,25	49,47
NIDN ³	12,89	13,34	13,79	14,23
NIDA ³	6,58	6,57	6,55	6,53
EE ²	2,38	2,31	2,24	2,16
CT ²	78,90	79,03	79,15	79,27
FDN ²	39,89	40,80	41,72	42,63
FDN _{cp} ²	37,86	38,80	39,74	40,68
FDA ²	22,86	23,97	25,08	26,19
Lignina H ₂ SO ₄ ²	2,25	2,53	2,81	3,09
Lignina/FDN _{cp} (%)	5,94	6,52	7,07	7,60
FDNi ²	15,77	16,89	18,00	19,11
FDAi ²	8,61	9,59	10,57	11,55
CNF ²	39,01	38,22	37,43	36,65
CNF _{cp} ²	41,04	40,23	39,41	38,59

¹ MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; NNP = nitrogênio não-protéico; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; FDN = fibra em detergente neutro; FDN_{cp} = fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína; FDA = fibra em detergente ácido; FDNi = FDN indigestível obtido após incubação ruminal *in situ* por 264 horas; FDAi = FDA indigestível obtido após incubação ruminal *in situ* por 264 horas; CNF = carboidrato não-fibroso; CNF_{cp} = CNF corrigido para cinza e proteína.

² Valores em percentagem da MS; ³ Valores em percentagem do nitrogênio total.

⁴ Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo.

A principal modificação química observada com a inclusão de FG ocorreu sobre a composição dos carboidratos totais (CT) da dieta, com aumento da proporção da fração insolúvel em detergente neutro (FDN/CT), bem como aumento da participação da lignina na FDN (lignina/FDN). A alta relação lignina/FDN do farelo de girassol (Tabela 2) indica presença de cascas, componente da semente com alta lignificação, o que juntamente com o teor de proteína bruta caracteriza o farelo de girassol utilizado neste trabalho como semi-decorticado (Hesley, 1994; Canibe et al., 1999).

Embora não tenha sido avaliada a composição dos carboidratos não-fibrosos (CNF), reconhecidamente o farelo de trigo (FT) contém maior fração amilácea e menor fração fibrosa solúvel em detergente neutro (substâncias pécticas e *B*-glucanos e frutanos de cadeia longa) que o FG não decorticado ou semi-decorticado (Sniffen et al.; 1992; Hall, 2000; Valadares Filho et al., 2006). Desta forma, além da redução da fração CNF na dieta, possíveis mudanças em sua composição com aumento da fração fibrosa solúvel em detergente neutro em detrimento da fração amilácea pode ter ocorrido com aumento do nível de FG na dieta.

Na Tabela 4 encontram-se as estimativas dos parâmetros de degradação ruminal *in situ* da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos usados nas dietas experimentais. A fração efetivamente degradada no rúmen (DE) da MS do FG foi menor em relação ao farelo de soja (FS) e ao FT. A DE da PB estimada para o FG foi maior que o FS, mas inferior ao FT, comportamento semelhante aos descritos por Branco et al. (2006) e pelo NRC (2001). Desta forma, ao se comparar o FG com a mistura contendo 53,57% de FS e 46,43% de FT (FS:FT), base da MS, verifica-se maior valor absoluto de DE (68,68 vs 62,92).

Tabela 4 - Parâmetros de degradação ruminal estimados para matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos utilizados, obtidos por meio de incubação *in situ*

Itens ¹	Silagem de milho	Milho grão moído	Farelo de soja	Farelo de trigo	Farelo de girassol
MS					
Fração a, %	27,19	11,64	29,39	29,24	21,74
Fração b, %	52,83	98,00	80,16	48,08	52,17
kd, % h ⁻¹	0,0292	0,0246	0,0466	0,1182	0,0899
DE ¹ , %	50,40	38,10	62,45	60,03	51,74
PB					
Fração a, %	49,69	18,98	14,68	27,85	22,80
Fração b, %	28,32	98,00	93,77	65,48	71,28
kd, % h ⁻¹	0,04409	0,0133	0,0542	0,2979	0,1198
DE ¹ , %	65,05	35,34	56,85	81,40	68,67
FDN					
Fração b, %	73,21	88,65	97,75	67,29	45,23
Fração I, %	26,79	11,35	2,25	32,71	54,77
kd, % h ⁻¹	0,0212	0,0241	0,0517	0,0418	0,0500
Latência, h	1,76	2,29	0,01	0,10	0,02
DE, %	26,54	34,85	56,84	35,59	25,94

¹Fração a = fração solúvel; fração b = fração insolúvel potencialmente degradável; kd = taxa de degradação da fração b; DE = fração efetivamente degradada, adotando-se valor de taxa de passagem (kp) de 0,03720 para silagem de milho e 0,06638/h para os alimentos concentrados, segundo equações preditivas descritas no NRC (2001); fração I = fração indegradável.

A partir dos valores da fração efetivamente degradada no rúmen da PB de cada alimento e considerando o nitrogênio oriundo da mistura uréia/sulfato de amônio da dieta totalmente degradado no rúmen, os teores de proteína degradável no rúmen (PDR) foram estimados em 10,6; 10,8; 11,0 e 11,2%, base da MS, para as dietas com 0; 7; 14 e 21% de inclusão de FG. De acordo com as exigências estimadas segundo o NRC (2001) para vacas leiteiras com 640 kg de peso corporal, 170 dias de lactação e produção de 30 kg/dia de leite com 3,5% de gordura e 3,2% proteína bruta, estes valores supriram a demanda de compostos nitrogenados para o crescimento da microbiota ruminal com

excedentes de 1,2 a 1,8 unidades percentuais em relação às exigências nutricionais de 9,4% para PDR (base da MS).

O FG apresentou menor fração potencialmente degradada no rúmen da FDN (FDNpd) em relação aos demais alimentos, devido à maior participação da lignina, conforme apresentado anteriormente (Tabela 3). Este comportamento refletiu em menor estimativa de fração efetivamente degradada no rúmen da FDN, apesar da maior taxa de degradação ruminal da fração FDNpd (kd) em relação ao FT, milho e silagem de milho.

O consumo de constituintes em função do nível de FG na dieta está apresentado na Tabela 5. Apesar dos aumentos ($P < 0,05$) nos consumos de FDN (kg/dia e % do peso corporal) e de FDNcp (kg/dia) a partir do nível de 21% de FG e do aumento da fração de FDN indigestível (FDNi) na dieta (Tabela 3), não houve efeito sobre os consumos de MS (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB) e de carboidratos totais (CCT). Ausência de efeito sobre o consumo de MS tem sido observado em estudos sobre vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo até 11,3% de FG semi-decorticado (37% de PB e 21,2% de FDA), em substituição ao FS e milho grão (Schingoethe et al., 1977). O comportamento observado indica baixo efeito de repleção ruminal do FG sobre o consumo, devido à maior taxa de degradação ruminal da fração FDNpd (Tabela 4), bem como às características físicas da FDNi, como pequeno tamanho e alta densidade de partícula, que reduz sua retenção seletiva no rúmen.

Modelos originais de desaparecimento ruminal da fibra propuseram que o desaparecimento da fração FDNpd é influenciada pela digestão e passagem, enquanto que a fração FDNi apenas pela passagem (Waldo et al., 1972). Todavia, como o processo de digestão e passagem é dinâmico e interativo, aumentos na Kd implicam em menor acúmulo de gases associados às partículas de FDNpd e FDNi da digesta, reduzindo o efeito de flutuação e aumentando taxa de passagem de ambas as frações

(Allen, 1996). Além disso, a FDNi apresenta menor retenção seletiva ruminal que a FDNpd, devido ao menor tamanho, maior densidade e, portanto, sob menor efeito de retenção pelos gases no saco dorsal do rúmen (Lund et al., 2007).

Tabela 5 - Consumos diários de constituintes em função do nível de farelo de girassol na dieta e coeficiente de variação (CV)

Item ¹	Farelo de girassol (% MS da dieta) ²				CV (%)
	0	7	14	21	
	(kg)				
CMS	21,95	21,35	21,21	21,93	4,19
CMSconc ²	10,40	10,62	10,81	11,02	17,11
CMO	20,27	19,87	19,99	20,45	4,15
CEE	0,54	0,51*	0,50	0,50	4,58
CPB	3,78	3,71	3,70	3,80	3,88
CCT	16,15	15,67	15,53	16,10	4,41
CFDN	8,29	8,27	8,40	8,95*	4,63
CFDNcp	7,87	7,87	8,02	8,57*	4,61
CCNF	7,87	7,39	7,12*	7,15	4,47
CCNFcp	8,28	7,80	7,51*	7,54	4,48
	(% do peso corporal)				
CMS	3,42	3,33	3,34	3,41	4,37
CFDN	1,29	1,29	1,33	1,39*	4,83
CFDNcp	1,13	1,14	1,18*	1,25	4,98
	(g/kg ^{0,75})				
MS	172,02	167,31	167,58	170,50	4,29

Médias seguidas por (*) indicam o nível de inclusão a partir do qual se observa diferença em relação ao tratamento controle (nível zero) pelo teste de Williams (P<0,05).

¹CMS = consumo de matéria seca; CMSconc = consumo de matéria seca de concentrado; CMO = consumo de matéria orgânica; CEE = consumo de extrato etéreo; CPB = consumo de proteína bruta; CCT = consumo de carboidratos totais; CFDN = consumo de fibra em detergente neutro; CFDNcp = consumo de FDN corrigido para cinzas e proteína; CCNF = consumo de carboidratos não-fibrosos (CCNF); CCNFcp = consumo de CNF corrigidos para cinzas e proteína.

²Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo, base da MS.

O consumo estimado das rações concentradas, bem como a proporção em relação ao consumo total de matéria seca, também não foram afetados pelo nível de FG

na dieta. Para os níveis de 0; 7; 14 e 21% de FG, o consumo de ração concentrada representou 47,38; 49,74; 50,97 e 50,25% do consumo total de matéria seca da dieta. Verifica-se ainda que a proporção média de ração concentrada fornecida nas dietas (45%, Tabela 1) não se encontra dentro do intervalo de confiança (IC) obtido de $IC(\mu)_{95\%} = 49,67\% \pm 1,84$. Desta forma, diferenças ($P < 0,05$) são observadas entre a proporção de ração concentrada fornecida na dieta e aquela efetivamente consumida pelo animal, utilizando-se TiO_2 como indicador.

As reduções ($P < 0,05$) nos consumos de carboidratos não-fibrosos (CNF) e CNF corrigidos para cinzas e proteína (CNFcp) a partir de 14% de FG, bem como a redução no consumo de EE a partir de 7% de FG, ocorreram devido às reduções na composição destes constituintes nas dietas (Tabela 3), pois o consumo de MS não foi afetado pelo nível de FG.

Na Tabela 6 são apresentados os coeficientes de digestibilidade total (CD) e o teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas em função do nível de FG. Os valores de CD da MS (CDMS), matéria orgânica (CDMO) e NDT refletem o comportamento das frações de nutrientes que os compõem. Desta forma, reduções ($P < 0,05$) no CD dos carboidratos totais (CDCT) explicam as reduções ($P < 0,05$) no CDMS e NDT, a partir de 21% de FG. A redução ($P < 0,05$) no CDCT pode ser atribuída à mudança na composição dos CT dieta, com aumento da proporção da fração insolúvel em detergente neutro (FDN/CT), bem como aumento da participação da lignina na FDN (lignina/FDN) com a inclusão de FG (Tabela 3). Sob condições adequadas de suprimento de nutrientes essenciais e de pH, os carboidratos insolúveis em detergente neutro apresentam taxas de degradação ruminais mais lentas que os solúveis (Russell et al., 1992). Sendo assim, suportam menor crescimento microbiano ruminal, menor produção e menor participação de ácidos graxos voláteis gliconeogênicos (Firkins et al.,

2006). A lignina, embora quimicamente não seja classificada como carboidrato, por ser indigestível e agir na redução da FDN potencialmente digestível, é reconhecida, como principal fator intrínseco do alimento responsável pela limitação da digestão dos nutrientes insolúveis em meio neutro (Jung & Allen, 1995).

Tabela 6 – Coeficientes de digestibilidade total e teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) em função do nível de farelo de girassol na dieta e coeficiente de variação (CV)

Item	Farelo de girassol (% MS da dieta) ¹				CV (%)
	0	7	14	21	
	(%)				
CDMS	65,17	64,07	64,25	62,08*	5,30
CDMO	62,56	61,80	62,50	59,66	5,74
CDEE	86,20	86,96	86,50	84,76	4,00
CDPB	69,22	69,59	70,32	67,37	4,22
CDCT	60,90	59,22	59,24	57,18*	6,70
CDFDN	45,01	44,38	44,67	42,52	18,25
CDFDNcp	48,84	48,09	48,32	46,47	10,52
CDCNF	77,49	75,78	76,39	75,40	4,72
CDCNFcp	72,13	70,33	70,80	69,14	5,59
NDT	63,83	62,65	62,75	60,48*	5,64

Médias seguidas por (*) indicam o nível de inclusão a partir do qual se observa diferença em relação ao tratamento controle (nível zero) pelo teste de Williams ($P < 0,05$).¹ Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo, base da MS.

Embora sem haver diferenças significativas para os CDFDN e CDFDNcp, em termos absolutos, observam-se reduções de 2,49 e 2,37 unidades percentuais no nível de 21% de FG em relação ao nível zero, devido à maior participação da lignina na fração FDN do FG em relação à mistura FS:FT.

Da mesma forma, apesar da ausência de diferenças significativas para os CD dos CNF (CDCNF) e CNFcp (CDCNFcp), em termos absolutos, observam-se reduções de 2,09 e 2,99 unidades percentuais no nível de 21% de FG em relação ao nível zero.

Apesar das frações que compõem os CNF sejam consideradas de alta digestibilidade ruminal (Lanzas et al., 2007), possivelmente o aumento da fração de fibra solúvel em detergente neutro com inclusão de FG em detrimento da fração amido de alta digestibilidade ruminal do FT (Hall, 2000; NRC, 2001; Valadares Filho et al., 2006), explique o menor valor absoluto para os CDCNF e CDCNFcp no tratamento com 21% de FG.

Embora as estimativas dos parâmetros de degradação ruminal da PB dos alimentos obtidas pelo ensaio *in situ* indicaram maiores valores para degradação efetiva da PB do FG em relação à mistura FS:FT (Tabela 4), o CDPB reduziu no nível de 21% de FG 1,85 unidades percentuais em relação ao nível zero. Baseando-se em estudos *in vitro*, o coeficiente de digestibilidade intestinal verdadeira da proteína não-degradada no rúmen (DIV-PNDR) do FG não decorticado (86,1%) apresentou-se, em valor absoluto, superior ao estimado para a mistura FS:FT (78,5%) (Branco et al., 2006). Desta forma, diferenças na DIV-PNDR possivelmente não explicam a redução no valor absoluto para o CDPB a partir de 21% de FG.

A conversão da proteína degradável no rúmen em proteína microbiana depende, entre outros fatores, da disponibilidade de energia e de esqueletos de carbono (Bach et al., 2005). Assim, é provável que a menor disponibilidade de carboidratos prontamente degradáveis no rúmen (CDCNF e CDCNFcp) reduziu a disponibilidade de energia e esqueletos de carbono para síntese de proteína microbiana, reduzindo a conversão de nitrogênio disponível em nitrogênio microbiano, aumentando-se as perdas fecais de nitrogênio não-microbiano e, conseqüentemente, reduzindo o CDPB a partir de 21% de FG na dieta.

Verifica-se que o valor médio de NDT das dietas predito segundo o NRC (2001) (62,37%) encontra-se dentro ($P < 0,05$) do intervalo de confiança (IC) obtido a partir dos

valores observados de NDT das dietas, $IC(\mu)_{95\%} = 62,43\% \pm 1,42$. Desta forma, o valor médio de NDT observado das dietas (62,43%) foi similar ($P > 0,05$) ao valor predito segundo as equações sugeridas pelo NRC (2001).

Na Tabela 7 é apresentado o consumo de componentes digeridos em função do nível de farelo de girassol na dieta. Os consumos de MSD, EED, CTD, CNFD, CNFcpD e NDT reduziram ($P < 0,05$) a partir do nível de 7% de farelo de girassol na dieta. No entanto, os CMOD, CPBD, CFDND e CFDNcpD não foram afetados pelo nível de farelo de girassol da dieta.

Tabela 7 – Consumo de componentes digeridos em função do nível de farelo de girassol na dieta e coeficiente de variação (CV)

Item	Farelo de girassol (% MS da dieta) ¹				CV (%)
	0	7	14	21	
	(Kg/dia)				
CMSD	14,30	13,68*	13,63	13,61	6,10
CMOD	12,68	12,28	12,49	12,20	6,27
CEED	0,47	0,44*	0,43	0,42	6,94
CPBD	2,61	2,58	2,60	2,56	5,48
CCTD	9,84	9,28*	9,20	9,21	7,44
CFDND	3,73	3,67	3,75	3,81	12,81
CFDNcpD	3,84	3,78	3,88	3,98	11,15
CCNFD	6,10	5,60*	5,44	5,39	5,42
CCNFcpD	5,97	5,49*	5,32	5,21	6,22
CNDT	13,48	12,85*	12,76	12,70	6,55

Médias seguidas por (*) indicam o nível de inclusão a partir do qual se observa diferença em relação ao tratamento controle (nível zero) pelo teste de Williams ($P < 0,05$).

¹ Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo, base da MS.

O consumo de componentes digeridos da dieta é o produto do consumo e o coeficiente de digestibilidade total do componente. Neste sentido, reduções ($P < 0,05$) nos consumos de EED, CNFD e CNFcpD devem-se aos menores consumos (Tabela 5), enquanto as reduções ($P < 0,05$) nos consumos de MSD, CTD e NDT às reduções nos

coeficientes de digestibilidade (Tabela 6). Os aumentos ($P < 0,05$) nos consumos de FDN e FDNcp, a partir da inclusão de 21% de FG, não foram suficientes para afetar os consumos de FDND e FDNcpD.

Na Tabela 8 encontram-se os valores estimados de exigências em proteína e energia para vacas lactantes com peso corporal médio de 640 kg, produção média diária de 30kg/dia, com 3,5% de gordura e com 24 semanas de lactação, segundo o NRC (2001).

Tabela 8 - Valores observados e exigências de proteína bruta (PB), proteína degradável no rúmen (PDR), proteína não degradável no rúmen e de nutrientes digestíveis totais (NDT) segundo o NRC (2001), de vacas lactantes com 640 kg de peso corporal, com 24 semanas de lactação, produzindo 30 kg/dia com 3,5% de gordura

Itens	Exigências	Farelo de girassol (% MS da dieta) ¹			
		0	7	14	21
PB (Kg/dia)	3,35	3,78	3,71	3,70	3,80
Diferença		+0,43	+0,36	+0,35	+0,45
PDR (Kg/dia)	2,03	2,33	2,31	2,33	2,46
Diferença		+0,30	+0,28	+0,30	+0,43
PNDR (Kg/dia)	1,32	1,45	1,40	1,37	1,34
Diferença		+0,13	+0,08	+0,05	+0,02
NDT (Kg/dia)	13,26	13,48	12,85	12,76	12,70
Diferença		+0,22	-0,41	-0,50	-0,56

Os consumos de PB, PB degradada no rúmen (PDR) e PB não-degradada no rúmen (PNDR) foram suficientes para atender as exigências em todos os tratamentos, com superávits para os níveis 0; 7; 14 e 21% de farelo girassol correspondentes a: 12,8; 10,8; 10,5 e 13,4% da exigência PB; 14,8; 13,8; 14,8 e 21,2% da exigência de PDR; e 9,8; 6,1; 3,8 e 1,5% da exigência de PNDR. Os consumos de NDT foram suficientes para atender as exigências apenas no tratamento com 0% de farelo de girassol. Nos

níveis 7; 14 e 21% de farelo de girassol, por sua vez, houve deficiências de 3,1; 3,8 e 4,2% da exigência de NDT. Considerando a exigência de 300 gramas de NDT/kg de leite produzido com 3,5% de gordura (NRC, 2001), a diferença no consumo de NDT entre o nível zero e 21% de FG é suficiente para reduzir a produção de leite em 2,6 kg/dia.

Na Tabela 9 constam as médias para a produção de leite, composição do leite e eficiência na produção em função do nível de farelo de girassol na dieta. Não houve efeito do nível de FG sobre a composição de todos os componentes do leite, eficiência na utilização da energia digestível da dieta e variação de peso corporal. Porém, o FG afetou ($P<0,05$) a PL e PLC, a produção de todos os componentes do leite e a eficiência de utilização do nitrogênio dietético.

A PL não foi afetada até o nível de 14% de FG, mas reduziu ($P<0,05$) a partir de 21% de FG devido à redução ($P<0,05$) da produção de lactose, principal componente osmótico do leite. A síntese de lactose é influenciada principalmente pelo fluxo de entrada de glicose na glândula mamária, pois representa o principal substrato para a síntese de galactose (Kronfeld, 1982; Fonseca, 1995). Neste sentido, reduções ($P<0,05$) observadas nos consumos de CTD e CNFD com inclusão de FG, associado ao maior conteúdo de pectina em detrimento ao amido (Leiva et al., 2000; Valadares Filho et al., 2006), apresentam-se como fatores responsáveis pela redução do fluxo de glicose para a glândula mamária, possivelmente decorrente da redução da produção ruminal de propionato, bem como do fluxo de amido absorvido no intestino delgado (Leiva et al., 2000; Reynolds, 2006).

Tabela 9 – Produção de leite, composição do leite e eficiência na produção em função do nível de farelo de girassol na dieta e coeficiente de variação (CV)

Item	Farelo de girassol (% MS da dieta) ¹				CV (%)
	0	7	14	21	
Leite (kg/d)	29,79	28,84	28,69	27,42*	5,94
Leite com 3,5% gordura (kg/d)	30,71	28,97*	29,14	27,69	6,18
Lactose (%)	4,44	4,45	4,52	4,48	2,67
Proteína (%) ²	3,22	3,18	3,09	3,11	4,84
Nitrogênio-não protéico (%)	0,2763	0,2809	0,2808	0,2799	12,57
Nitrogênio-não protéico (%NT)	8,58	8,83	9,09	9,00	15,17
Gordura (%)	3,70	3,55	3,60	3,57	7,22
Proteína:gordura	0,87	0,90	0,86	0,87	6,46
Estrato seco total (%)	12,43	12,18	12,28	12,2	3,06
Estrato seco desengordurado (%)	8,72	8,63	8,69	8,63	2,66
Lactose (kg/d)	1,32	1,28	1,30	1,23*	6,28
Proteína (kg/d)	0,96	0,92	0,89*	0,85	7,05
Gordura (kg/d)	1,10	1,02*	1,03	0,98	8,13
Extrato seco total (kg/d)	3,70	3,51*	3,52	3,35	5,80
Extrato seco desengordurado (kg/d)	2,60	2,49	2,49	2,37*	6,09
PLC/CNDT ³	2,28	2,26	2,28	2,18	6,61
EUNleite (N leite/Ning) ⁴	0,249	0,242	0,235*	0,220	6,50

Médias seguidas por (*) indicam o nível de inclusão a partir do qual se observa diferença em relação ao tratamento controle (nível zero) pelo teste de Williams ($P < 0,05$).¹ Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo.² (N x 6,38); ³ Produção diária de leite com 3,5% de gordura/consumo diário de NDT; ⁴kg de N produzido no leite: kg de N ingerido.

Reduções na síntese de N microbiano ruminal também pode ter contribuído para redução da produção de lactose, por reduções no fluxo de aminoácidos na glândula mamária. A proteína α -lactoalbumina, sintetizada na glândula mamária a partir de aminoácidos livres absorvidos na circulação sanguínea, apresenta papel essencial na atuação catalítica do complexo enzimático lactose sintase (Fonseca, 1995). Neste sentido, reduções no fluxo de aminoácidos de origem microbiana possivelmente

reduziram a síntese α -lactoalbumina na glândula mamária, comprometendo a síntese de lactose (Gennadij et al., 2000).

A redução ($P < 0,05$) da produção de proteínas do leite a partir no nível de 14% de FG na dieta pode estar relacionada com reduções no suprimento de aminoácidos de origem microbiana ruminal na glândula mamária, bem como de glicose, por reduções ($P < 0,05$) nos consumos de CTD, CNFD e CNFcpD. As células secretoras da glândula mamária utilizam principalmente o catabolismo da glicose para provimento de energia necessária para os processos de captura de aminoácidos, síntese e transporte de proteínas lácteas (Fonseca, 1995; Mackle et al., 2000).

A redução da produção de gordura do leite a partir do nível de 7% de FG dieta possivelmente ocorreu em razão da redução do fluxo de glicose para a glândula mamária. A síntese de triglicerídeos na glândula mamária depende do suprimento sanguíneo de ácidos graxos de cadeia longa, da síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia curta e média (AGCM), da concentração de co-fatores redutores (NADPH_2) necessários ao fornecimento de elétrons ao complexo enzimático encarregado da síntese de AGCM, e de glicerol. O acetato e B-OH-Butirato originários da degradação ruminal de carboidratos, notadamente os de parede celular, são as principais fontes de carbono para síntese *de novo* de AGCM na glândula mamária em animais ruminantes (Grummer, 1991). Como o nível de farelo de girassol não afetou o consumo de carboidratos fibrosos digestíveis (Tabela 7), provavelmente não houve efeito sobre a síntese ruminal de acetato e B-OH-butirato.

Em estudos *in vitro*, utilizando-se tecido adiposo de bovinos e ovinos em diferentes idades e estágios fisiológicos, demonstrou-se que a adição de glicose ao acetato marcado com carbono C^{14} mais que quadruplicou a síntese de ácidos graxos em relação ao tratamento sem glicose (Ingles et al., 1972). Embora a glicose apresente

mínima contribuição ao suprimento de carbono para síntese *de novo* de AGCM na glândula mamária em ruminantes, assume papel fundamental no suprimento de co-fatores redutores e de glicerol (Ingle et al., 1972; Van Soest, 1994; Grummer, 2001). Desta forma, reduções da síntese de gordura do leite a partir de 7% de FG na dieta possivelmente não ocorreram por reduções no suprimento de ácidos graxos voláteis lipogênicos, mas por reduções na síntese de co-fatores reduzidos e de glicerol oriundos do metabolismo da glicose na glândula mamária.

Embora a produção dos constituintes do leite seja afetada ($P<0,05$) pelos níveis de FG na dieta, a composição dos mesmos não se altera. As reduções nos valores absolutos de PL com aumento do FG na dieta compensaram a queda na produção dos constituintes mantendo-se, portanto, a composição.

Observa-se que a eficiência de conversão do nitrogênio dietético em nitrogênio secretado no leite (EUNleite) reduz ($P<0,05$) a partir de 14% de FG na dieta. A EUNleite é afetada, entre outros fatores pela ECNi, eficiência de captura do nitrogênio circulante pela glândula mamária e eficiência de utilização do nitrogênio capturado em nitrogênio secretado no leite. Conforme discutido anteriormente, a ECNi reduz ($P<0,05$) somente a partir de 21% de FG na dieta e, portanto, apresenta-se como um dos fatores responsáveis pela menor EUNleite à partir deste nível. Porém, não explica a redução ($P<0,05$) na EUNleite com 14% de FG. Neste sentido, reduções da eficiência de captura do nitrogênio circulante pela glândula mamária e/ou da eficiência de utilização do nitrogênio capturado em nitrogênio secretado no leite, por reduções no suprimento de substratos energéticos, podem justificar as reduções ($P<0,05$) da ENUleite no tratamento com 14% de FG na dieta.

Não houve efeito sobre a variação de peso corporal, com médias de 0,93; 0,62; 0,65 e 0,61 kg/dia para os níveis de 0; 7; 14 e 21% de FG na dieta, respectivamente.

Na Tabela 10 são apresentadas as excreções diárias de derivados de purina, síntese e eficiência de síntese de nitrogênio microbiano ruminal em função do nível de FG. Apesar da ausência de diferenças significativas ($P>0,05$) para a síntese de proteína microbiana ruminal (PBmic), observam-se reduções absolutas de 330,26 g/d no tratamento com 21% de FG em relação ao nível zero. Este comportamento possivelmente contribuiu para as reduções ($P<0,05$) na síntese de proteína e de lactose no leite, pois a PBmic representa 50 a 80% dos aminoácidos absorvidos no intestino delgado em ruminantes (Storm & Ørskov, 1983).

Tabela 10 - Excreções diárias de derivados de purina, síntese e eficiência de síntese de nitrogênio microbiano ruminal (Nmic) em função do nível de farelo de girassol na dieta e coeficiente de variação (CV)

Item ¹	Farelo de girassol (% MS da dieta) ²				CV (%)
	0	7	14	21	
ALU (mmol)	411,79	391,94	401,73	348,90	16,68
AUU (mmol)	42,96	47,26	40,48	44,39	19,05
ALL (mmol)	2,92	2,81	2,79	2,71	24,95
PT (mmol)	457,67	442,00	445,00	396,00	14,98
PA (mmol)	461,37	443,05	447,40	338,70	17,64
Nmic (g)	335,44	322,12	325,20	282,60	17,64
PBmic (g)	2096,50	2013,26	2032,50	1766,25	17,64
gPBmic/kgNDT	155,53	156,67	159,29	139,07	19,76
ECNi (Nmic/Ning)	0,56	0,54	0,55	0,46*	17,67
NDRing (g)	372,26	368,93	273,30	392,99*	4,23
ECNd (Nmic/NDRing)	0,90	0,87	0,87	0,72*	17,85
NDP (g)	21,77	20,72	21,25	18,45	16,68
NU (g)	233,31	236,31	236,70	253,77	13,97
INP (NDP/NU)	0,093	0,088	0,090	0,073*	22,35

Médias seguidas por (*) indicam o nível de inclusão a partir do qual se observa diferença em relação ao tratamento controle (nível zero) pelo teste de Williams ($P<0,05$).

¹ALU = alantoína na urina; AUU = ácido úrico na urina; ALL = alantoína no leite; PT = purinas totais excretadas na urina; PA = purinas absorvidas no intestino delgado; PBmic = síntese de proteína bruta microbiana ruminal; ECNi = eficiência de conversão do N ingerido em N microbiano; NDRing = consumo de N (g/d) x PDR (% PB) da dieta obtido a partir da incubação ruminal *in situ* dos alimentos; ECNd = eficiência de conversão do N ingerido degradado no rúmen em N microbiano; NDP = N excretado na urina em derivados de purinas; NU = excreção de total de N na urina; INP = índice de nitrogênio purínico (Chen et al., 1999). ² Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo, base da MS.

A quantidade total de proteína microbiana no intestino delgado depende da disponibilidade de nutrientes e da eficiência de uso desses nutrientes pelas bactérias ruminais. Apesar da disponibilidade ruminal de proteína bruta não ser afetada pelo nível de FG (Tabela 4), o menor ($P < 0,05$) consumo de carboidratos digestíveis, notadamente a fração solúvel em detergente neutro (CNF), reduziu a disponibilidade de energia e de esqueleto de carbonos para a síntese de Pmic. Além disso, possíveis modificações da composição de CNF, com aumento da fibra solúvel em detergente neutro em detrimento ao amido, também contribuiu para redução do valor absoluto da síntese de Nmic com a inclusão de 21% de FG (Hall, 2004).

Embora a fibra solúvel em detergente neutro e o amido apresentem alta digestibilidade ruminal (Lanzas et al., 2007), estes não suportam o mesmo crescimento microbiano e diferem quanto ao perfil dos produtos da fermentação. Reconhecidamente o rendimento energético microbiano da pectina é menor do que o amido, além de produzir maior proporção de ácidos graxos voláteis lipogênicos em detrimento aos gliconeogênicos (Strobel & Russell, 1986; Hall & Herejk, 2001). Os mecanismos pelos quais a pectina suporta menor crescimento microbiano em relação ao amido não estão totalmente esclarecidos (Lanzas et al., 2007), mas talvez relacionam-se com a presença de pentoses, as quais são catabolizadas em 25% pelas bactérias ruminais pela via fosfo-kelotase, de menor rendimento energético que a via Embden-Meyerhof-Parnas, majoritária das hexoses (Russell, 2002).

A eficiência microbiana é comumente medida pela eficiência de uso dos substratos energéticos e nitrogenados, os quais constituem em indicadores complementares (Bach et al., 2005). Observa-se que a inclusão de FG não afeta a eficiência de utilização dos substratos energéticos pela microbiota ruminal (gPBmic/kg de NDT), mas reduz ($P < 0,05$) a eficiência de utilização dos substratos nitrogenados

dietéticos ingeridos (ECNi) e degradados no rúmen (ECNd), a partir de 21% de FG na dieta. A eficiência energética é afetada pela quantidade de carboidratos degradados no rúmen, tipos de carboidratos, pH, taxa de passagem e disponibilidade sincronizada de substratos essenciais (N, AGVCR, S, P, ect). Embora possam ocorrer reduções na EFNDT em razão do aumento de proporção pectina em detrimento ao amido, com aumento do FG (Strobel & Russell, 1986; Hall & Herejk, 2001), os menores ($P < 0,05$) consumos de CTD e CNFD provavelmente compensaram positivamente, que por mecanismos de saturação enzimática de Michaelis-Menten aumentam a eficiência de utilização de substratos energéticos pela microbiota ruminal (Bach et al., 2005; Lana et al., 2007).

O processo de conversão do nitrogênio (N) dietético ingerido em N microbiano ruminal (ECNi) pode ser dividido em dois eventos: conversão do N dietético ingerido em N disponível para a microbiota ruminal, medida pelo teor de PDR; conversão do N disponível (degradável) em N microbiano (ECNd). O primeiro evento é afetado principalmente por fatores intrínsecos da fonte protéica, tais como: concentração proporcional de proteína verdadeira; solubilidade; estrutura terciária e quaternária; presença de barreiras inertes como a parede celular; presença de ligações peptídicas mais resistentes à degradação e fatores antinutricionais (NRC, 2001; Bach et al., 2005). O segundo evento, por sua vez, depende do tipo de composto nitrogenado disponível, da disponibilidade de outros nutrientes essenciais (carboidratos, enxofre, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada), da taxa de passagem e pH ruminal (Nocek & Russell, 1988; NRC, 2001; Bach et al., 2005).

O ensaio de degradação *in situ* dos alimentos indicou que a conversão de N dietético ingerido em N disponível (teor de PDR na dieta) aumentou em valores absolutos com o aumento do farelo de girassol (Tabela 4) e, portanto, não explica a

redução ($P < 0,05$) da ECNi. Assim, a redução ($P < 0,05$) da ECNd a partir de 21% de FG apresenta-se como principal evento responsável pela redução da ECNi. O menor ($P < 0,05$) CCTD e CCNFD reduziram a disponibilidade de esqueleto de carbonos e de energia, com implicações sobre a eficiência de síntese de compostos nitrogenados no leite bem como sobre as perdas de N nas fezes e na urina. Adicionalmente, possíveis mudanças na composição dos CNF com inclusão de FG também podem ter contribuído para redução na disponibilidade de esqueleto de C e de energia.

Salienta-se que o valor médio de ECNd (0,84) dos tratamentos com 0, 7 e 14% de FG, aproxima-se ao valor de 0,85 sugeridos pelo NRC (2001) e por Bach et al. (2005) como fator de fixação da PDR em PBmic, desconsiderando a fração de N endógena.

O INP apresentou o mesmo comportamento verificado para ECNd, com redução ($P < 0,05$) a partir de 21% de FG na dieta. Conforme se observa na Figura 1, o INP apresenta relação linear ($P < 0,05$) com ECNd. O INP representa a proporção de N total da urina que está presente como purínico sendo, portanto, um indicador de eficiência de conversão da PDR em PB microbiana (Chen et al., 1999). Como pode ser determinado utilizando-se amostras spot de urina, apresenta-se como ferramenta eficaz e com potencial de adoção no monitoramento da eficiência do nitrogênio em ruminantes (Chen et al., 1999).

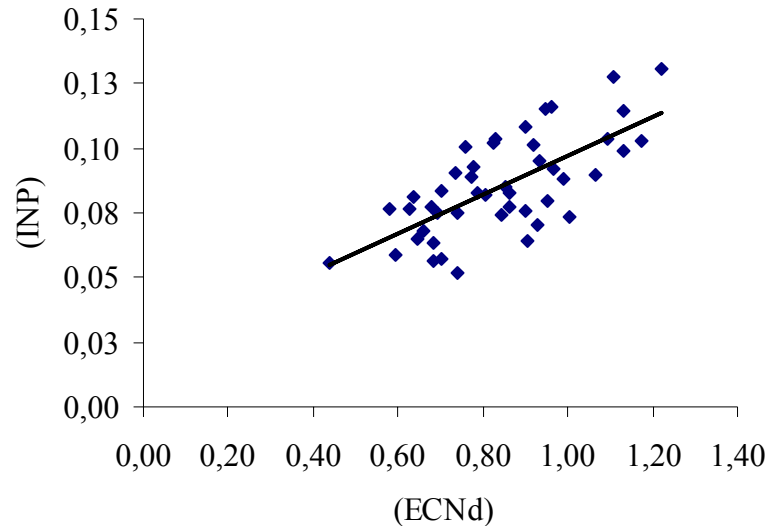


Figura 1 – Relação entre índice de nitrogênio purínico (INP) e eficiência de conversão do nitrogênio dietético disponível no rúmen em nitrogênio microbiano (ECNd). $INP = 0,02166 (P < 0,0373) + 0,07569 (P < 0,0001) * ECNd$ (n = 46, $R^2 = 0,4864$).

Na Tabela 11 são apresentadas as médias de concentração de nitrogênio-uréico no leite (NUL) e no plasma (NUP), excreção urinária de nitrogênio-uréico (ENU), nitrogênio total ingerido (Ning), nitrogênio total secretado no leite (Nleite), nitrogênio total excretado nas fezes (Nfezes), nitrogênio total excretado na urina (Nurina), balanço de nitrogênio (BN) e Nleite, Nfezes, Nurina e BN em relação ao Nleite, em função do nível de farelo de girassol na dieta. Verifica-se que o nível de FG na dieta não afeta NUL, NUP, ENU, ENU/Nurina, Nurina e a participação do NUurina no BN. Os indicadores NUL, NUP e EU refletem o pool de nitrogênio uréico circulante, bem como a perda na urina (Broderick & Clayton 1997). O valor médio observado para NUL (17,60 mg/dL) apresenta-se no limite superior da faixa considerada adequada de balanceamento de energia e proteína, de 10 a 17 mg/dL (Broderick, 1995; Moore & Varga, 1996; Jonker et al., 1998; Ferguson, 2001). Todavia, os mesmos não refletem a totalidade

da eficiência de utilização de N, pois as perdas de N fecal e a eficiência de captura de aminoácidos pela glândula mamária não são considerados.

Tabela 11 – Indicadores de metabolismo de nitrogênio em função do nível de farelo de girassol na dieta e coeficiente de variação (CV)

Item ¹	Farelo de girassol (% MS da dieta) ²				CV (%)
	0	7	14	21	
NUL (mg/dL)	17,90	17,68	16,88	17,93	9,90
NUP (mg/dL)	18,85	17,58	16,17	16,90	13,25
ENU (g/d)	199,30	196,75	190,45	196,37	16,55
ENU (mg/PV/d)	313,80	306,76	294,49	304,78	16,99
ENU/NU (%)	85,42	83,26	80,46	77,38	13,53
Ning (g/d)	604,27	593,07	591,86	608,66	3,88
Nleite (g/d)	150,35	143,75	138,95*	133,66	7,05
Nfezes (g/d)	185,99	180,35	175,66	198,61	10,92
Nurina (g/d)	233,31	236,31	236,70	253,77	13,97
BN (g/d)	34,62	32,66	40,55	22,62	134,12
Nleite/Ning (%)	24,88	24,24	23,48*	21,96	6,50
Nfezes/Ning (%)	30,78	30,41	29,68	32,63	8,94
Nurina/Ning (%)	38,61	39,85	39,99	41,69	13,79
BN/Ning (%)	5,73	5,51	6,85	3,72	136,67

Médias seguidas por (*) indicam o nível de inclusão a partir do qual se observa diferença em relação ao tratamento controle (nível zero) pelo teste de Williams ($P < 0,05$).

¹NUL = concentração de nitrogênio-uréico no leite; NUP = concentração de nitrogênio-uréico no plasma, ENU = excreção urinária de nitrogênio-uréico; Ning = nitrogênio total ingerido; Nleite = nitrogênio total secretado no leite; Nfezes = nitrogênio total excretado nas fezes; Nurina = nitrogênio total excretado na urina; BN = balanço de nitrogênio.

²Farelo de girassol substituiu mistura contendo 53,57% de farelo de soja e 46,43% de farelo de trigo.

Apesar de não terem sido detectados efeitos significativos ($P > 0,05$) para excreções de N na urina e nas fezes em relação ao N ingerido e ao balanço de N, em termos absolutos, verificam-se maiores excreções de N na urina e fezes, bem como menor retenção de N (BN) no tratamento com 21% de FG. Os aumentos nas perdas fecais e urinárias de N foram provocados pelo aumento ($P < 0,05$) no consumo de N degradado no rúmen associado com a menor disponibilidade de energia e esqueletos de

carbono no rúmen, reduzindo a ECNi e ECNd, conforme discussão anterior. Salienta-se que não ocorreu valor negativo para o BN em todos os tratamentos, indicando que o consumo de nitrogênio atendeu as exigências de compostos nitrogenados das vacas.

Conclusões

O farelo de girassol pode ser incluído em até 14%, na base da matéria seca, em dietas de vacas leiteiras com produção de 30 kg/dia, sem afetar a produção de leite, a composição do leite e as eficiências de utilização dos componentes nitrogenados e energéticos da dieta. Desta forma, seu uso até este nível depende da disponibilidade e conveniência econômica.

Literatura Citada

- ANDERSON, V. **Sunflower meal in beef cattle diets**. Acessado em 11-07-2008. disponível: www.ag.ndsu.nodak.edu/carringt/livestock/Beef%20Report%2002/sunflower%20meal.htm.
- ALLEN, M.S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, p.3063-3075, 1996.
- ARIJA, I.; BRENES, A.; VIVEROS, A. et al. Effects of inclusion of full-fat sunflower kernels and hulls in diets for growing broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.70, p.137-149, 1998.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, Suppl. E., p.9-21, 2005.
- BARROS, G.S.C.; SILVA, A.P.; PONCHIO, L.A. et al. Custos de produção de biodiesel no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Ano 15, n.3, p.36-50, 2006
- BRANCO, A.F.; CONEGLIAN, S.M.; MAIA, F.S. et al. Digestibilidade intestinal verdadeira da proteína de alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1788-1795, 2006 (supl.)
- BRODERICK, G.A. Use of milk urea as an indicator of nitrogen utilization in lactating dairy cows. USDA. Agriculture Research Service. US Dairy Forage Research Center, 1995. **Research Summaries**, 122p.

- BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.11, p.2964-2971, 1997.
- CANIBE, N.; Pedrosa, M.M.; Robredo, L.M. et al. Chemical composition, digestibility and protein quality of 12 sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1775-1782, 1999.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (occasional publication). 1992. 21p.
- CHEN, X.B.; SUBBA, D.B.; ORSKOV, E.R. et al. Purine nitrogen index, potentially a new parameter for rapid feed evaluation in ruminants. Nuclear based technologies for estimating microbial protein supply in ruminant livestock. Proceedings of the second Research Co-ordination Meeting of a Co-ordinated Research Project (Phase 1). Organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 24-28, August 1999, 121p.
- CHIZZOTTI, M.L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 132p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acessado em 10-07-2008. Disponível em www.conab.gov.br.
- ECONOMIDES, S. The nutritive value of sunflower meal and its effect on replacement cereal straw in the diets of lactating ewes and goats. **Livestock Production Science**, v.55, p.89-97, 1998
- ERASMUS, L.J.; BOTHA, P. M.; CRUYWAGEN, C. W. et al. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.541-551, 1994.
- FERGUSON, J.D. Milk urea nitrogen. Center for Animal Health and Productivity, 2001, http://cahpwww.vet.upenn.edu/mun/mun_info.html (10-01-2005).

- FINN, A. M. ; CLARK, A. K. ; DRACKLEY, J. K. et al. Whole rolled sunflower seeds with or without additional limestone in lactating dairy cattle rations. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.903-913, 1985.
- FIRKINS, J.L.; HRISTOV, A.N.; HALL, M.B. et al. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89 (E. Suppl), p.E31-E51, 2006.
- FONSECA, F.A. **Fisiologia da Lactação**. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Viçosa-MG: UFV. 1995. 137p.
- GENNADIJ, C.C.; DANFAER, A.,; CANT, J.P. Simulation analysis of substrate utilization in the mammary gland of lactating cows. **Journal of Dairy Research**, n.67, p.171-188, 2000.
- GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; et al. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p.1282-1291, 2003.
- GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3244-3257, 1991.
- HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. University of Florida, 2000. P.A-25 (Bulletin 339, April-2000).
- HALL, M.B. Recent advances in non-carbohydrates for the nutrition of lactating cows. In: II SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO. Lavras. **Anais...**, 2001, p.139-159.
- HALL, M.B. Terra incognita: updates on feeding nonfiber carbohydrates to dairy cows (yes, it does matter). In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM. In: **Proceedings**: University of Florida, Gainesville. 2004.
- HALL, M.B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p.2486–2493, 2001.
- HARRIS Jr., B. Using milk urea nitrogen and blood urea values as management tools. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. **Biotechnology in the feed industry**. Nottingham: Nottingham University Press, 1996. p.75-81.
- HESLEY, J. Sunflower meal use in livestock rations. National Sunflower Association, Bismarck, ND, 1984.

- IDF – INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content Guide for the operation of mid-infra-red instruments.** Bruxelas: 1996. 12p. (IDF Standard 141 B).
- INGLE, D. L.; BAUMAN, D.E.; GARRIGUS, U.S. Lipogenesis in the ruminant: in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation for fatty acid synthesis. **Journal of Nutrition**, n.102, p.609-616, 1972.
- JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2681-2692, 1998.
- JUNG, H.G.; ALLEN, S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2774-2790, 1995.
- KRONFELD, D.S. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.2204-2212, 1982.
- LANA, R.P.; FALEIRO NETO, J.A.; PAIVA, V.C.R. Crescimento de bactérias ruminais em função da concentração de substratos energéticos e nitrogenado no meio de cultura. In: LANA, R.P. (Ed.) **Respostas Biológicas aos Nutrientes.** Viçosa-MG, 2007, p.87-102.
- LANZAS C.; SNIFFEN, C.J.; SEO, S. et al. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.136, n-3-4, p.167-190, 2007.
- LEIVA, E; HALL, M.B.; VAN HORN, H.H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.541-551, 2000.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.
- LUND, P.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T. Digestible NDF is selectively retained in the rumen of dairy compared to indigestible NDF. **Animal Feed Science and Technology**, v.134, p.1-17, 2007.
- MACKLE, T.R.; DWYER, D.A.; INGVARTSEN, K.L. Effects of insulin and post-ruminal supply of protein on use of amino acids by the mammary gland for milk protein synthesis. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.93-105, 2000.

- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Acessado em 10-07-2008. Disponível em www.agricultura.gov.br
- MOORE, D.A.; VARGA, G. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. **Compendium Continuing Education Veterinary**, v.18, n.6, p.712-721, 1996.
- MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYGIHUGU, V. et al. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.179-183, 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.
- NEGRELLO, L. Fatos e Mitos. **BiodieselBR**, Ano 1, n.3, p.8-11, 2008.
- NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2070-2107, 1988.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. Estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- REYNOLDS, C.K. Production and metabolic effects of site of starch digestion in dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.130, p.78-94, 2006.
- RODRÍGUEZ, C.A.; GONZÁLEZ, J.; ALVIR, M.R. Effects of feed intake on in situ rumen microbial contamination and degradation of feeds. **Livestock Science**, v.116, p.108-117, 2008.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3551-3561, 1992.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY. 2002. 119p.
- SCHINGOETHE, D.J.; ROOK, J.A.; LUDENS, F. Evaluation of sunflower meal as a protein supplement for lactating cow. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.591, 1977.

- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- SILVA, Z.F.; OLIVEIRA, M.D.S.; BARBOSA, J.C. Substituição parcial do farelo de soja e do milho por teores crescentes de torta de girassol em concentrados isoprotéicos para vacas em lactação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, Goiânia, 2005 **Anais...** SBZ. 2005. (CD-ROM)
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2463-2472, 1992.
- STATISTICAL ANALISYS SYSTEM - SAS. **SAS/STAT user's guide**. v.2, 4.ed. Cary: 1989. 846p.
- STORM, E.; ØRSKOV, E. R. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. **British Journal of Nutrition**, v.50, p.463– 470, 1983.
- STROBEL, H.J.; RUSSELL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.2941–2947, 1986.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Acessado em 16-05-2008. Disponível em http://www.fas.usda.gov/oilseeds_arc.asp.
- VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, P.V.R.; MAGALHÃES, K.A et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos** 2.ed. Viçosa: UFV, DZO, 2006. 329p.
- VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.D.F. Recentes avanços em proteína na nutrição de vacas leiteiras. In: II SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL: NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO. Lavras. **Anais...** p.229-247, 2001.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal Agriculture Science**, v.114, n.3, p.243-248, 1990.

- WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, E.L. Model of cellulose disappearance from the rumen **Journal of Dairy Science**, v.55, n.1, p.125-129, 1972.
- WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999. **Proceeding...** Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.
- WILLIAMS, D.A. A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v.27, p.103-117, 1971.

CONCLUSÃO GERAL

O tratamento com hidróxido de cálcio do farelo ou torta de mamona, na dose de 40g/kg, na base da matéria natural, apesar de não desnaturar completamente a ricina, amplia a eficiência de utilização dos componentes energéticos e nitrogenados em dietas para ovinos.

A microbiota ruminal é capaz de degradar a ricina a taxas variáveis, *in vitro*, dependendo da concentração inicial de ricina. Todavia, a desnaturação da toxina com tratamento alcalino aumenta a taxa de crescimento microbiano ruminal *in vitro*, indicando efeitos inibitórios sobre a microbiota ruminal. Neste sentido, recomenda-se a completa destoxificação da ricina no farelo de mamona para seu uso na alimentação de ruminantes. São necessários estudos sobre mecanismos de ação da ricina na diversa população microbiana ruminal.

O tratamento térmico com autoclave a 1,23 kg/cm² (15 psi) durante 90 minutos, ou o tratamento alcalino com hidróxido de cálcio ou óxido de cálcio, diluídos em água (1:10), na dose de 60 g/kg de farelo, mostram-se eficazes em desnaturar a ricina. Desta forma, constituem procedimentos que poderão permitir a utilização do farelo de mamona na alimentação animal, sendo seu uso em escala industrial dependente de estudos sobre viabilidade operacional e econômica.

O tratamento térmico ou alcalino do farelo de mamona reduz a degradabilidade ruminal *in situ* da proteína bruta e da matéria seca, mas não afeta a digestibilidade intestinal da proteína não-degradável no rúmen e a degradabilidade ruminal *in situ* da FDN. Todavia, o tratamento alcalino reduz o efeito de repleção ruminal da FDN potencialmente degradável e, portanto, apresenta maior potencial de melhoria no valor nutritivo do farelo de mamona em relação ao tratamento térmico.

O farelo de girassol pode ser incluído em até 14%, na base da matéria seca, em dietas de vacas leiteiras com produção de 30 kg/dia, sem afetar a produção de leite, a composição do leite e as eficiências de utilização dos componentes nitrogenados e energéticos da dieta. Desta forma, seu uso até este nível depende da disponibilidade e conveniência econômica.