

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**EGON HION IEDA**

**Análise multielementar por ativação neutrônica e microfluorescência de raios X com seus respectivos mapas de distribuição em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão**

**Piracicaba**

**2018**



**EGON HION IEDA**

**Análise multielementar por ativação neutrônica e microfluorescência de raios X com seus respectivos mapas de distribuição em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão**

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini**

**Piracicaba**

**2018**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Ieda, Egon Hion

Análise multielementar por ativação neutrônica e microfluorescência de raios X com seus respectivos mapas de distribuição em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão / Egon Hion Ieda; orientador Helder Louvandini. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

67 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Alimentação animal 2. Análise alimentos para animal 3. Cordeiros 4. Nutrição animal 5. Oligoelementos 6. Ovinos 7. Subprodutos para animais I. Título

CDU (636.087 + 636.3) : 591.16

**Elaborada por:**

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Cida, pelo amor, educação e formação que me proporcionaram, e por estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas, amo vocês!



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde, fé e força para superar as dificuldades e as oportunidades que tem me proporcionado.

Agradeço a meus pais, João José e Cida, aos meus irmãos Iaro, Enzo e Isis, por todo o incentivo, apoio e suporte para a realização deste projeto, isso foi possível por causa de vocês, muito obrigado!

Agradeço a Bianca por ser minha namorada e principalmente amiga. Pelo incentivo, companheirismo e carinho. Por estar comigo durante todos esses anos, você foi uma pessoa muito importante para mim. Te amo muito!

Agradeço aos meus familiares e amigos, que sempre estão torcendo e acompanhando direta ou indiretamente, muito obrigado!

Agradeço ao Professor Helder Louvandini, pela oportunidade que me proporcionou desde o tempo da minha graduação, onde me aceitou como orientado. Pela paciência, confiança, conselhos, aprendizado e pelas oportunidades de crescer como pessoa. Tenho muito orgulho de ter sido seu aluno e ter feito parte de sua equipe. Obrigado por tudo!

Agradeço ao Professor Adibe Luiz Abdalla, por abrir a porta do Laboratório de Nutrição Animal, foi onde eu descobri e aprendi a ciência e pesquisa.

Agradeço aos amigos Carolina Rodriguez Jimenez, Tairon Pannunzio Dias e Silva e Paulo de Mello Tavares Lima pela ajuda na execução do projeto de pesquisa, pela lida diária com os animais e ensinamentos. Muito obrigado!

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Maria Regina Santos Rodeiro Peçanha, Lécio Aparecido Castilho e Karinna Camargo Scotton e todos os alunos, ex-alunos e colegas de trabalho, Adibe Luiz Abdalla Filho, Gabriel Sakita, Emiliana Romagnol, Thiago Bompadre, Wilian Costa, Felipe Ortiz, Juliano Issakowicz, Ana Claudia Koki Sampaio Issakowicz, Linander Campos, Andressa Santanna Natel, Pierre Couzoulon, Samy Emanuelle, Dineshkumar Dhanasekaran, Alessandra de Cássia Romero, Patrícia Pimentel dos Santos Righetto, Bernardo Berenchtein, além de todos os estagiários do LANA.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/CENA) pela a possibilidade de realizar o trabalho de microfluorescência de raios X. Em especial, agradeço ao Professor Hudson W. P. Carvalho, ao doutor Eduardo de Almeida e aos alunos Joyce R. P. Santos e Eduardo S. Rodrigues, por me receber tão bem no Laboratório, pelos ensinamentos e ajuda para realizar as análises. Muito obrigado!

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Radioisótopos (LRi/CENA) pela a possibilidade de realizar o trabalho de ativação neutrônica. Em especial, agradeço a Professora Elisabete A. de Nadai Fernandes, ao técnico de laboratório Marcio Arruda Bacchi e ao doutor Luís Gustavo Cofani dos Santos, por me receber tão bem no Laboratório, pelos ensinamentos e ajuda para realizar as análises. Muito obrigado!

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal (LAFa/ESALQ) pela possibilidade de realizar o trabalho de microscopia de luz. Em especial, agradeço ao professor Raul Machado Neto, por me receber tão bem no laboratório. Aos pós-doutorandos Debora Botéquio Moretti e Wiolene Montanari Nordi, pelos ensinamentos e ajuda para realizar as análises, muito obrigado!

Agradeço a Comissão de Pós-Graduação e seus funcionários, pela oportunidade, apoio, pronto atendimento, dedicação, auxílio e atenção durante todo o mestrado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2016/09660-1) pela bolsa de estudo e suporte financeiro, sem os quais seria impossível a realização deste projeto.

Agradeço ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e a Universidade de São Paulo (USP) pela oportunidade de participar do programa de pós-graduação.

Muito obrigado!

## RESUMO

IEDA, E. H. **Análise multielementar por ativação neutrônica e microfluorescência de raios X com seus respectivos mapas de distribuição em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão.** 2015. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Com este estudo, objetivou-se estudar o efeito da dieta de ovelhas com e sem caroço de algodão (gossipol) no desenvolvimento dos seus cordeiros do nascimento ao desmame por meio das seguintes avaliações: peso corporal dos cordeiros, teores dos hormônios (testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4)) por radioimunoensaio, morfometria histológica dos testículos, concentrações dos elementos químicos por ativação neutrônica e microfluorescência de raios X e o mapa de distribuição multielementar nos testículos. Foram utilizados 18 cordeiros, com peso corporal médio ao nascimento de  $3,94 \pm 0,81$  kg, descendentes de ovelhas Santa Inês, alimentadas com e sem caroço de algodão, durante as fases de acasalamento, gestação e lactação dos cordeiros, formando assim dois tratamentos: grupo controle (CO), sem a inclusão do caroço de algodão e com a inclusão de caroço de algodão (CA). Do nascimento aos 60 dias de idade, em intervalo de 15 dias, os animais foram pesados, realizadas a medição testicular e amostras de sangue foram coletadas para quantificação dos teores dos hormônios. Aos 60 dias de idade, os cordeiros foram sedados e em seguida orquiectomizados para a coleta de seus testículos para análises de histologia, ativação neutrônica e microfluorescência de raios X. No leite, além da matéria seca (MS), os teores de cálcio (Ca) e potássio (K) foram superiores nas ovelhas CO em relação às do CA. Os cordeiros do tratamento CO apresentaram maior peso corporal a partir dos 45 dias em diante em relação aos animais CA ( $P < 0,05$ ), bem como maior ganho em peso diário ( $P < 0,05$ ). Nos teores de testosterona não houve diferenças entre tratamentos ( $P > 0,05$ ), somente aumento destas variáveis ao final do experimento ( $P < 0,05$ ). Nos teores T3 e T4 também não houve diferenças entre os tratamentos, porém ocorreu redução nos teores ao final ( $P < 0,05$ ). Os cordeiros do grupo CO apresentaram características testiculares (peso, volume, comprimento e largura) e histológicas (diâmetros do túbulo e lúmen), superiores aos CA ( $P < 0,05$ ). Para a espessura do epitélio não houve diferenças entre tratamentos ( $P > 0,05$ ). Na análise multielementar por ativação neutrônica os teores de rubídio (Rb), selênio (Se) e céσιο (Cs) foram superiores nos cordeiros CO e o teor de zinco (Zn) foi superior nos cordeiros CA ( $P < 0,05$ ). Na análise multielementar e mapa de distribuição dos elementos por microfluorescência de raios X não houve diferenças entre os dois tratamentos. Por isso, pode-se concluir que a dieta materna controle apresentou impacto positivo no desempenho e no sistema reprodutivo dos cordeiros (descendentes), devido às melhores características nutricionais do leite (MS, Ca e K) destas ovelhas em relação ao grupo com caroço de algodão.

**Palavras-chave:** Gossipol. Reprodução. Elementos químicos. Testículos. Santa Inês.



## ABSTRACT

IEDA, E. H. **Multielement analysis by neutron activation and x-ray microfluorescence and their distribution maps on lambs testicles from ewe fed cottonseed.** 2018. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

The aim of this study was to investigate the effect of sheep diets, with and without cottonseed (gossypol), in the development of their lambs from birth to weaning through evaluation of the: body weight of lambs, levels of hormones (testosterone, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4)) by radioimmunoassay, histological morphology of testicles, concentration of chemical elements by neutron activation and X-ray microfluorescence, and multielementary map distribution in the testicles. Eighteen lambs were used with an average body weight at birth of  $3.94 \pm 0.81$  kg, offspring of Santa Inês sheep, fed with and without cottonseed, during mating, gestation and lactation of lambs, thus forming two treatments: control group (CO), without the inclusion of cottonseed and with the inclusion of cottonseed (CA). From birth to 60 days of age, at 15 days intervals, the animals were weighed, testicular measure were took and blood samples were collected to quantify the levels of hormones. At the age of 60 days, the lambs were sedated and orchietomized to collect their testicles for histological, neutron activation and x-ray microfluorescence analysis. In milk, besides the dry matter (DM), the levels of calcium (Ca) and potassium (K) were higher in sheep fed CO compared to CA. Lambs from CO treatment presente higher body weight from 45 days onwards as well as higher average daily gain when compared to CA treatment ( $P < 0.05$ ). The treatments showed no effect on levels of testosterone ( $P > 0.05$ ) but these variables increased at the end of the experiment ( $P < 0.05$ ). Levels of T3 and T4 were not affect by treatment ( $P > 0.05$ ) but at the end of the experiment a reduction occurred ( $P < 0.05$ ). Lambs from CO treatment presented higher testicular weight, volume, length, width and tubule and lumen diameters compared to lambs from CA treatment ( $P < 0.05$ ). The treatments showed no effects in testicular epithelium thickness ( $P > 0.05$ ). Multielementary neutron activation analysis showed greater levels of rubidium, selenium and caesium in the testicles of lambs from CO when compared to CA treatment, while CA showed higher zinc levels ( $P < 0.05$ ). No differences between treatments were found when analyzing elements levels and distribution using the X-ray microfluorescence analysis ( $P > 0.05$ ). Therefore we conclude that the maternal control diet (CO) positively affected the performance and the reproductive trait of their lambs due to better nutritional characteristics of milk (DM, Ca and K) from these sheep when compared to CA treatment.

**Keywords:** Gossypol. Reproduction. Trace-element. Testis. Santa Inês.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Distribuição do rebanho ovino no Brasil e suas divisões regionais .....	22
<b>Figura 2.2</b> - Estrutura química do gossipol .....	27
<b>Figura 3.1</b> – Corte transversal do testículo acondicionado no porta amostra (cubeta) com filme para raios X de poli-imida do tipo Kapton®.....	39
<b>Figura 3.2</b> – Posicionamento da seção histológica do testículo no equipamento para a análise de microfluorescência de raios X em linha (determinação dos elementos em 16 pontos em cima da linha vermelha) .....	40
<b>Figura 3.3</b> – Distribuição das amostras, materiais de referência certificados, branco analítico e monitores de fluxo de nêutrons nos recipientes de irradiação (“coelho”) no lote a ser irradiado.....	41
<b>Figura 4.1</b> – Peso corporal dos cordeiros cujas mães foram alimentadas com caroço de algodão e controle durante o período experimental.....	44
<b>Figura 4.2</b> – Teores de testosterona no soro de cordeiros nos dias 15, 30 e 60 após o nascimento, oriundo de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle... ..	46
<b>Figura 4.3</b> – Concentrações dos hormônios tiroxina (T4) (a) e triiodotironina (T3) (b) no soro de cordeiros nos dias 15, 30 e 60 oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle. ....	47
<b>Figura 4.4</b> – Espectro médio do mapeamento por análise de microfluorescência de raios X do testículo de cordeiro do CO (1537). ....	48
<b>Figura 4.5</b> – Espectro médio do mapeamento por análise de microfluorescência de raios X do testículo de cordeiro do CA (1501). ....	49
<b>Figura 4.6</b> – Fotos dos testículos dos cordeiros 1537 (controle) e 1501 (caroço de algodão) e mapeamentos bidimensionais das concentrações dos elementos: K, P, S, Fe, Ca e Zn. ....	50



**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 3.1** – Quantidade oferecida e composição bromatológica e teor de gossipol livre dos volumosos e concentrados ..... 36
- Tabela 4.1** – Médias dos elementos químicos (mg/kg) em análise de ativação neutrônica e composição bromatológica do leite de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle ..... 43
- Tabela 4.2** – Médias dos elementos químicos (mg/kg) determinados por ativação neutrônica no concentrado e feno consumidos pelos cordeiros ..... 43
- Tabela 4.3** – Médias da morfometria testicular de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle..... 45
- Tabela 4.4** – Diâmetro do túbulo e lúmen e espessura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ) em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle ..... 46
- Tabela 4.5** – Médias das contagens em segundos (cps) dos elementos químicos detectados por microfluorescência de raios X em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle..... 49
- Tabela 4.6** – Médias dos teores dos elementos químicos (mg/kg) determinados por ativação neutrônica nos testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle..... 52



**LISTA DE ABREVIACOES**

Br	Bromo
CA	Grupo algodão
Ca	Cálcio
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
Cl	Cloro
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO	Grupo controle
Co	Cobalto
CPS	Contagem por segundo
Cs	Césio
Cu	Cobre
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-Acético
EE	Extrato Etéreo
ESALQ	Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
F	Flúor
FDA	Fibra em Detergente cido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
Fe	Ferro
GMD	Ganho de peso médio diário
GMD	Ganho médio diário
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
I	Iodo
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
K	Potássio
LANA	Laboratório de Nutrio Animal
LIG	Lignina
LIN	Laboratório de Instrumentao Nuclear

Lri	Laboratório de Radioisótopos
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MO	Matéria Orgânica
Mo	Molibdênio
MRCs	Materiais de referência certificados
MS	Matéria Seca
P	Fósforo
PB	Proteína Bruta
Rb	Rubídio
S	Enxofre
Se	Selênio
SSD	Detector de Silício
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
USP	Universidade de São Paulo
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1 Objetivos.....	20
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
2.1 Ovinocultura no Brasil e no Mundo .....	22
2.2 Algodão no Brasil.....	25
2.3 Gossipol.....	26
2.4 Efeito Materno Descendente e a Importância dos Minerais.....	29
2.5 Microfluorescência de raios X.....	31
2.6 Ativação Neutrônica.....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 Local.....	35
3.2 Animais e tratamentos experimentais.....	35
3.3 Amostragem da dieta para análises multielementar e bromatológica .....	36
3.4 Avaliação do ganho em peso e hormônio dos cordeiros .....	37
3.5 Amostragem e mensurações dos testículos .....	37
3.6 Morfologia microscópica dos testículos .....	38
3.7 Preparação da amostra para Microfluorescência de raios X.....	38
3.7.1 Análises Microfluorescência de raios X.....	39
3.8 Ativação Neutrônica.....	40
3.9 Análise Estatística .....	42
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>



## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, a produção animal atende parte significativa do abastecimento global de alimentos e a busca por maneiras para diminuir os custos de produção e aumentar sua rentabilidade é de suma importância para os criadores. Há vários fatores que atuam no encarecimento da produção animal e a alimentação animal ocupa posição de destaque na composição dos custos.

A produção de ovinos no Brasil tem rebanho efetivo de mais de 18 milhões de cabeças distribuídas em todo território nacional (IBGE, 2017), e dentro do sistema de produção eles incorporam em suas dietas, concentrado proteico, considerados concorrentes com a alimentação humana. Neste cenário, a utilização de coprodutos da agroindústria é uma saída para diminuir o custo e maximizar a produção, contribuindo para a sustentabilidade e viabilidade econômica da ovinocultura (LOUVANDINI et al., 2007). No Brasil, o setor da agroindústria gera uma grande variedade de resíduos, por meio do seu processamento. Produtos provenientes da semente de algodão, através de seu alto valor proteico, estão sendo cada vez mais utilizados na alimentação de animais ruminantes em substituição ao farelo de soja (ABDALLA et al., 2008).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de algodão do mundo (CONAB, 2017), conseqüentemente torna simples e barato o uso desses coprodutos oriundos da produção de algodão para a nutrição de ruminantes, especialmente o caroço de algodão. No entanto, o caroço apresenta substância antinutricional denominada gossipol, altamente reativa, ligando-se rapidamente a diferentes substâncias, incluindo os minerais, principalmente o Fe, dando origem ao complexo gossipol-ferro. Além disso, pode causar sérios problemas como: perda de apetite, hipertrofia do fígado, necrose no músculo do coração, problemas reprodutivos, morte súbita, edema pulmonar, anemia e problemas respiratórios (BULLOCK et al., 2010). Sua ação como agente de infertilidade no macho é amplamente conhecida por afetar a espermatogênese de embriões, assim, tem sido avaliado como anticoncepcional masculino (COUTINHO, 2002; PAIM et al., 2016), mas pouco se tem na literatura sobre o efeito da alimentação materna com caroço de algodão interferindo na saúde de sua prole (efeito materno-descendente).

Além disto, tendo em vista que o gossipol livre é uma substância reativa e se complexa com minerais, surge o questionamento se pode haver comprometimento da absorção destes nutrientes pelo sistema digestivo, levando deficiência ao ruminante. O perfil de minerais nos tecidos dos animais pode ser utilizado como parâmetro para avaliar sua higidez. Tendo em vista a variedade de minerais e a quantidade traço de alguns deles presente nas células, há a necessidade de se buscar técnicas precisas e sensíveis, que possam corretamente realizar tal avaliação. Neste sentido tem-se a análise por ativação neutrônica, que é um método de determinação qualitativa e quantitativa com alta sensibilidade (IAEA, 1990).

Outra técnica também multielementar e com alta sensibilidade é a microfluorescência de raios X, com a vantagem de se poder mapear a distribuição dos minerais no tecido e verificando sua homogeneidade (WILL et al., 2010). A gama de diferentes aplicações de microfluorescência de raios X vem crescendo durante os últimos 15 anos, e é considerada uma ferramenta muito importante na análise elementar ao nível de micrometros (HASCHKE, 2014).

Em ruminantes, trabalhos que avaliem o efeito materno sobre seus descendentes ainda são incipientes. A nutrição da mãe durante o período gestacional e aleitamento é determinante para o desenvolvimento do cordeiro e se na dieta materna existe ingrediente que possua ação antinutricional, como no caso do caroço de algodão (gossipol), tal situação deve ser melhor avaliada. Os efeitos nocivos do gossipol nos parâmetros reprodutivos de ovinos machos já são bem conhecidos. No entanto o teor na dieta para a ocorrência destes efeitos ainda é controverso e não se tem notícia sobre a influência do teor desta substância na dieta da mãe sobre seus descendentes. Neste sentido a busca por técnicas nucleares, como por exemplo, a ativação neutrônica e microfluorescência de raios X, pode auxiliar na compreensão dos processos que estão envolvidos, a fim de garantir de maneira confiável a utilização do caroço de algodão na dieta dos ruminantes, objetivando a diminuição dos custos de produção sem afetar diretamente a reprodução das matrizes e de seus descendentes.

## **1.1 Objetivos**

Este trabalho foi realizado objetivando-se avaliar o efeito do consumo do caroço de algodão (gossipol) em ovelhas da raça Santa Inês sobre o desenvolvimento testicular de seus descendentes do nascimento até o desmame aos 60 dias, por meio das seguintes avaliações:

Período de aleitamento:

- Macroscopicamente avaliar a morfometria dos testículos e peso dos cordeiros;
- Avaliar o teor dos hormônios: testosterona, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) no soro sanguíneo dos cordeiros por radioimunoensaio.

Desmama (castração):

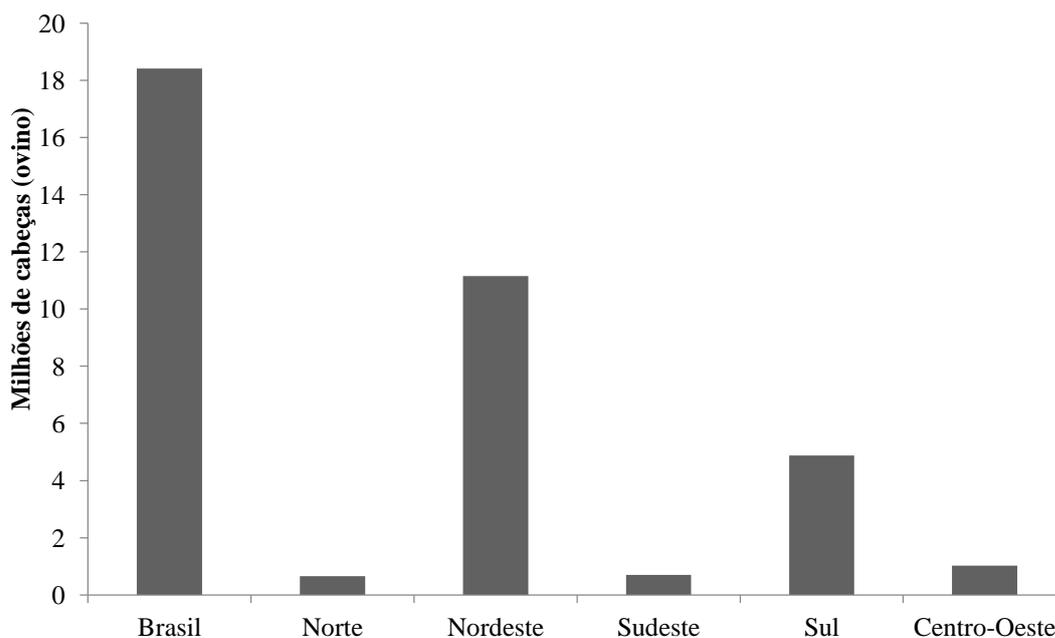
- Morfologia histológica dos testículos;
- Avaliar o perfil e concentração dos elementos químicos por ativação neutrônica e microfluorescência de raios X e o mapa de distribuição elementar nos testículos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ovinocultura no Brasil e no Mundo

A ovinocultura no Brasil é formada por rebanho de, aproximadamente, 18,5 milhões de cabeças, com as regiões Sul e Nordeste (Figura 2.1) responsáveis por mais de 80 % do rebanho nacional (IBGE, 2017). Os principais estados produtores de ovinos são o Rio Grande de Sul, Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí com aproximadamente 4, 3, 2, 2 e 1 milhões, respectivamente (IBGE, 2015).

**Figura 2.1** - Distribuição do rebanho ovino no Brasil e suas divisões regionais. Fonte: Adaptado, IBGE 2015



De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2017b), existem mais de um bilhão de ovinos em todo o mundo, produzindo, aproximadamente, 13 milhões de toneladas de carne e a produção vem aumentando em alguns países. Enquanto a China possui o maior rebanho ovino, a Austrália e a Nova Zelândia dominam o mercado de exportação mundial de cordeiro de corte e produção de lã, por apresentarem sistemas de produção de alta produtividade e tecnologia de ponta (VIANA, 2008).

O consumo de carne ovina no Brasil é em média de 0,62 kg/habitante/ano considerado muito inferior comparado ao consumo de carne bovina (39 kg/habitante/ano), suína (13 kg/habitante/ano) e aves (45 kg/habitante/ano) (FAO, 2017a). Esse baixo consumo pode estar relacionado, principalmente, à qualidade do produto colocado à venda no mercado brasileiro normalmente, com carcaças de baixa qualidade, originárias de animais velhos, influenciando negativamente o consumo e hábito alimentares entre a população (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2004). Aumentar a produtividade, reprodução e a eficiência do sistema de produção de carne de cordeiro são fatores chaves para aumentar a competitividade da indústria ovina de carne no Brasil (MONTOSI et al., 2013). A taxa de reprodução, o crescimento do cordeiro, e a qualidade da carcaça têm grande influência sobre o retorno financeiro aos produtores.

No Brasil, a produção de ovinos era voltada principalmente para comércio e produção de lã, no entanto, com o avanço da quantidade, qualidade e tecnologia à baixo custo do setor da produção de fibras sintéticas, trouxe ao mercado da lã dificuldade de disputar a concorrência, havendo crise mundial no mercado (ÁVILA et al., 2013). De modo a minimizar os prejuízos da ovinocultura aos produtores no país, houve a necessidade de se buscar novos padrões de animais especializados, principalmente, na produção de carne (ÁVILA et al., 2013; MARTINS; GARAGORRY; FILHO, 2006) com ovinos deslanados. Neste sentido as raças Santa Inês, Morada Nova e Rabo Largo (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014) são consideradas animais rústicos, capazes de adaptar em ambientes de altas temperaturas e baixa umidade, por apresentarem mecanismos anatômicos e fisiológicos de extrema eficiência (MCMANUS et al., 2010). O Brasil é considerado país de grande extensão territorial, com diferentes tipos de clima; dessa forma, a criação de ovinos deslanados são considerados favoráveis, de acordo com a genética desses animais e as condições climáticas e ambientais.

Destacando entre as raças, a Santa Inês despontou como excelente alternativa para os criadores brasileiros, que buscavam animais de grande porte, produtivos e perfeitamente adaptados às condições de Brasil (CUNHA et al., 2003). No Brasil, os primeiros ovinos foram trazidos pelos colonizadores, nos anos de 1550 (MALHEIROS; HÖFLER; PATIAS, 2017), e hoje em dia a raça Santa Inês e tem sido considerada uma alternativa propícia para o cruzamento e produção de cordeiros (MADRUGA et al., 2006).

É considerada uma raça de médio porte, a ovelha adulta pesa em torno de 60 kg podendo alcançar até 70 kg, os carneiros machos tem um peso médio de 90 kg, podendo alcançar 120 kg (COSTA, 2003). Pode-se identificar uma ovelha Santa Inês observando

apenas algumas características fenotípicas, tais como: pernas compridas, corpo grande, peito largo, cabeça média, orelhas pendulares e longas, ausência de chifres e apêndices na garganta nos machos (RAMOS et al., 2007). Quanto sua pelagem pode ser branco, malhado, vermelho e preto (COSTA, 2003).

No Brasil, a produção de animais (bovinos, suínos e aves) em geral, já é considerada uma atividade solidificada, em que a oferta excede a demanda, isso se dá ao potencial do mercado e principalmente, ao ambiente, com condições climáticas e ambientais favoráveis as criações (MCMANUS et al., 2012). No entanto, ovinocultura no Brasil contribui com menos de 1,0 % da produção mundial de carne ovina, não conseguindo atender a demanda interna, importando carne ovina de países como Argentina, Uruguai e Austrália (VIANA; MORAES; DORNELES, 2015).

Neste cenário para o crescimento da ovinocultura é necessário que haja investimento neste setor. Além disso, a produção de ovinos é considerada uma boa opção para os pequenos e médios produtores, que integram a agricultura familiar e pode ser uma opção para diversificar a fonte de renda nestas propriedades. Assim é de extrema urgência, encontrar medidas que melhore o sistema produtivo, a fim de reverter a situação de oferta e demanda para garantir a produção autossustentável até mesmo produzir excedente para exportação de carne de origem ovina (MONTOSI et al., 2013).

O principal objetivo da produção animal é produzir alimento para a população mundial em quantidade, qualidade e ao menor custo possível. Mas a alimentação no setor de produção de ruminantes no Brasil é considerada responsável por uma grande parcela do custo total de produção, com isso a procura por alimentos mais eficientes e econômicos à serem utilizados na alimentação animal é constante, e dentre os alimentos para animais de produção, os proteicos são os de custo mais elevados, sendo considerados concorrentes com a alimentação humana como, por exemplo o milho e a soja (PAIM et al., 2010)

Com isso a utilização de produtos oriundos da agroindústria têm sido excelente alternativa de alimentação, buscando a redução de custo (LOUVANDINI et al., 2007). Produtos originados da semente de algodão, devido o seu alto teor de gordura e proteína, estão sendo cada vez mais utilizados na alimentação de ruminantes em substituição ao farelo de soja (ABDALLA et al., 2008; VIANA et al., 2015).

## 2.2 Algodão no Brasil

O setor agrícola no Brasil, nos últimos anos, vem comprovando seu potencial crescimento e dá claros sinais de que tal avanço está relacionado com o investimento em tecnologia e biotecnologia, e ao longo do tempo, a produção vem crescendo em proporções superiores ao aumento da área, ou seja, o incremento da produção no setor agrícola foi de 25,6 %, contra aumento de apenas, 3,7 % de área (CONAB, 2014). Hoje em dia, uns dos produtos considerados de extrema importância do setor agrícola do Brasil é o algodão, por sua contribuição socioeconômica, garantindo o país estar em um lugar privilegiado no cenário internacional (CONAB, 2017).

No Brasil o algodão já era conhecido antes dos portugueses, ou seja, eram os moradores locais, os índios que usavam e dominavam a produção, sendo capazes de colher e processar suas fibras, utilizando-as para confecção de redes e cobertores e também empregando suas folhas na cura de feridas e doenças (COSTA; BUENO, 2004; ABRAPA, 2015).

Sua produção comercial teve início nos estados da Região Nordeste do Brasil e o estado considerado o primeiro grande produtor foi o Maranhão que, nos anos 60, exportou para a Europa suas primeiras safras. Com o preço das terras e a afluência de outras culturas, como a soja, cana de açúcar, café e a laranja, obrigou a cultura de algodão buscar novas áreas de produção, como o Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul (AMPA, 2012).

A cotonicultura foi umas das primeiras atividades agrícolas desenvolvidas no Brasil e a produção brasileira de algodão foi de 3.462.647 e 3.831.774 de toneladas em 2015/2016 e 2016/2017, respectivamente, ocupando uma área de 938,8 mil hectares e produtividade média de 1.585 kg/ha (CONAB, 2017; IBGE, 2017). Hoje em dia os principais estados produtores são o Mato Grosso com 2.578.596 toneladas, Bahia com 833.490 toneladas e Mato Grosso do Sul com 127.433 toneladas (ABRAPA, 2015; IBGE, 2017) e sua produção visa, principalmente, para extração da fibra, utilizada na indústria têxtil (GADELHA et al., 2014), vestindo grande parte de população mundial e, no futuro, deverá ser bem mais expressivo, pois com a conscientização da necessidade de preservação do meio ambiente, falta de fontes não renováveis (petróleos) como no caso de fibras sintéticas e a crescente procura por produtos naturais.

O Algodão pertence à família Malvaceae e dentre as espécies de algodão, a mais plantada é a *Gossypium hirsutum*, considerada responsável por 90 % do algodão cultivado no mundo todo, e que produz sementes com línter, porém o gênero *Gossypium* ssp. abrange muitas espécies distribuídas, dentre elas, apenas quatro são responsáveis pelo cultivo para obtenção de fibra de algodão: *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium arboreum* L., *Gossypium barbadense* L. e *Gossypium hirsutum* L. (ALEXANDER et al., 2009).

A produção de algodão gera uma série de coprodutos da agroindústria, como o caroço, farelo e a torta. Inicialmente a semente (caroço) sofre a separação da fibra longa, através de máquinas dotadas de rolos ou serras, processo denominado descaroçamento (ALMEIDA et al., 2011; JERÔNIMO et al., 2014); após esse processo, a semente é considerada um resíduo do seu processamento na indústria têxtil. Como coproduto, o caroço pode ser destinado à moagem, para extração do óleo para consumo humano em dois diferentes processos. Para a produção do farelo de algodão, o processo requer solventes químicos e físicos (prensagem). Já para a produção da torta de algodão, utiliza-se apenas a prensagem (PAIM et al., 2010; PAIANO et al., 2014; VIANA et al., 2015).

Seus coprodutos são considerados ingredientes utilizados na alimentação animal, principalmente de ruminantes, ocasionando a crescente atenção de pesquisadores, pois seu alto teor de lipídeos favorece elevar a densidade energética da dieta sem atenuar os teores de fibra e proteína da dieta (GADELHA et al., 2014).

O caroço de algodão, por ser importante fonte de energia e proteína, pode complementar as forragens na alimentação de ruminantes (ABDALLA et al., 2008; PAIM et al., 2010; LIMA et al., 2014; VIANA et al., 2015; JÚNIOR et al., 2016), representando reflexos positivos na produtividade de rebanhos (GOMES et al., 2014), devido ao teor de óleo nas sementes.

Apesar das prerrogativas observadas na utilização de coprodutos originados da cultura do algodão, existem limitações para o uso do caroço de algodão na alimentação de animais, o gossipol considerado fator antinutricional.

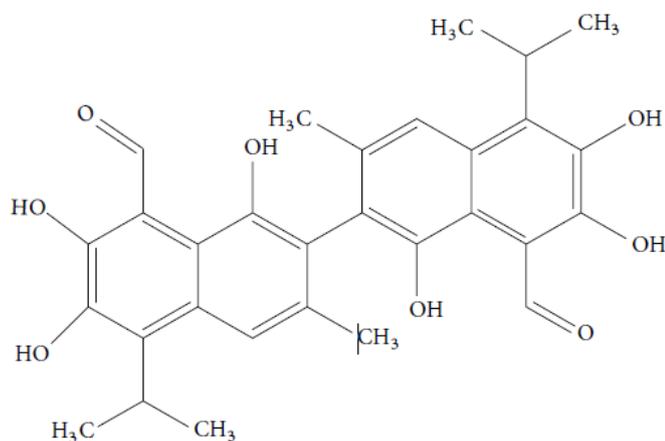
### 2.3 Gossipol

O gossipol (fórmula química:  $C_{30}H_{30}O_8$ ) foi sintetizado pela primeira vez por EDWARDS (1958). É uma substância tóxica presente no caroço do algodão, considerado um

pigmento polifenólico amarelo, produzido por glândulas encontradas nas raízes, caule, hastes e sementes da planta de algodão, e seu principal objetivo é proteger a planta contra pragas e insetos (GADELHA et al., 2014; PAIM et al., 2010).

O gossipol (Figura 2.2) é dividido em duas formas: livre e conjugado. No caroço de algodão a forma livre é a mais predominante e apresenta importância toxicológica. O gossipol conjugado não tem importância toxicológica, sendo considerado fisiologicamente inativo (GADELHA et al., 2011).

**Figura 2.2** - Estrutura química do gossipol (GADELHA et al., 2014)



Há diferenças nos teores de gossipol, em relação ao caroço de algodão e no farelo de algodão. No caroço, o gossipol livre é de, aproximadamente, 13,2 mg/g, enquanto o gossipol conjugado varia entre 7 a 8 mg/g. Já no farelo de algodão, o livre é de, aproximadamente, 10,6 mg/g e o conjugado entre 3 a 5 mg/g (RANDEL; CHASE; WYSE, 1992). Também, o tempo de armazenamento do algodão pode diminuir o teor de gossipol presente no caroço de algodão (GADELHA et al., 2014).

Nas sementes do algodão o gossipol aparece como grânulos pigmentares apresentando como minúsculas partículas pretas quando a semente é partida ao meio (CUNHA et al., 2008). A concentração de gossipol no algodão está sujeito à espécie, temperatura e índice pluviométrico durante o crescimento da planta, apresentando correlação negativa com a temperatura ambiente e positiva com o índice pluviométrico, ou seja, quanto maior o índice

de chuva na região, maior o teor de gossipol no caroço, e quanto maior a temperatura do ambiente, menor o teor de gossipol (SANTOS et al., 2002; WILLARD et al., 1995).

Dentre as espécies e variedades da planta algodão, a quantidade de gossipol pode variar, com teores entre 0,6 % e 2 % (BENBOUZA et al., 2002) e essa substância é considerada uma barreira na utilização do coproduto do algodão na alimentação animal, já em ruminantes é ponderada e aceita em níveis na alimentação, pois todos os seres vivos, incluindo os humanos, são sensíveis ao gossipol.

Normalmente os efeitos tóxicos só aparecem depois da exposição a longo tempo ou em grande quantidade do gossipol na dieta, muitas vezes depois de 20 a 30 dias, mas o efeito tóxico pode variar em função teor consumo, idade do animal, período de consumo e condições de vida desse animal (GAMBOA et al., 2001).

O gossipol tem efeitos na reprodução, afetando a gametogênese masculina e feminina, promovendo degeneração embrionária (GADELHA et al., 2011; 2014; PAIM et al., 2016). O efeito na reprodução masculina é dose e tempo dependente, no entanto, tal sintoma pode ser reversível quando a ingestão do alimento contendo gossipol é interrompida (HASSAN et al., 2004).

Na década de 1950, a população de baixa renda da china, localizada em zonas rurais se alimentava basicamente de óleo extraído do algodão, onde continha gossipol. Houve grande redução na taxa de natalidade humana nessas regiões e esta observação foi associada à infertilidade masculina causada pelo gossipol ao consumir o óleo da semente de algodão (QIAN; WANG, 1984). E conseqüentemente, esta substância foi estudada para utilização como contraceptivo masculino em múltiplos estudos experimentais (QIAN; WANG, 1984; YU; CHAN, 1998; COUTINHO, 2002; DODOU, 2005).

O gossipol é considerado uma molécula altamente reativa, podendo se ligar a minerais e aminoácidos, com o mineral Fe, por exemplo, o gossipol pode se complexar tornando uma ligação ferro-gossipol (GADELHA et al., 2014), inibindo a absorção desse metal, com isso há deficiência de Fe, prejudicando com o processo da eritropoiese (LINDSEY; HAWKINS; GUTHRIE, 1980; RANDEL et al., 1996; MENA et al., 2004; ZHANG et al., 2007) e colaborando com a anemia (ZBIDAH et al., 2012).

## 2.4 Efeito Materno Descendente e a Importância dos Minerais

Antigamente, acreditava-se que a produção de carne de qualidade se restringia principalmente nos últimos meses de vida do animal, em que os animais recebiam alimento proteico em confinamento para posteriormente a terminação. Hoje em dia, sabe-se que a produção de carne com qualidade e até quantidade, inicia-se desde a fase inicial de vida do animal, no útero da mãe. Quando a alimentação materna é o ponto chave, e vem sendo abordada como estratégia para se obter excelente resultado no abate de seus descendentes e produzir carne com maior qualidade (DUARTE et al., 2013).

Nas primeiras horas de vida do cordeiro, o peso ao nascer, o ato de amamentar e o vínculo (afeto) entre a mãe e o filho são as maiores influências sobre a sobrevivência dos filhotes. E eles estão interligados entre o ambiente e os genótipos e nutrição materna (OLDHAM et al., 2011). Em mamíferos, existem diferentes tipos de placenta e particularmente nos ruminantes (sindesmocorial), ela protege o feto contra possíveis infecções bacterianas ou virais, mas impede, por sua vez, a passagem de proteínas da circulação materna para o feto. O recém-nascido ruminante é carente de anticorpos e por isso, sensível a infecções, sendo após a ingestão do colostro nas primeiras horas de vida, sua principal proteção imunológica (FEITOSA, 1999).

Principalmente em mamíferos, a nutrição materna durante a gestação e lactação tem grande importância no desenvolvimento do seu descendente, tanto na fase fetal e inicial de vida (amamentação), mas pouca informação na literatura sobre o impacto da nutrição materna na saúde e produtividade de seus descendentes ao longo da vida (CAMPOS; PALANCH, 2017).

A alimentação e reprodução são consideradas de grande importância no parâmetro da produção animal e um dos principais problemas da produtividade deve-se ao consumo inadequado de energia e proteína. E conseqüentemente as exigências de minerais na alimentação animal, variam de acordo com o nível de produção, idade do animal, raça e ambiente. Todos os seres vivos precisam de minerais para o perfeito funcionamento dos processos metabólicos e a falta ou excesso na alimentação de ruminantes contribuem para baixa produtividade do rebanho, causando perdas econômicas (MCDOWELL, 1996).

Os minerais podem ser classificados em macrominerais e microminerais e os dois correspondem, aproximadamente a, 3,5% do peso vivo do animal. Ao longo do corpo, sua distribuição não é considerada uniforme, pois cada tecido precisa de concentração distinta de elementos específicos para perfeito funcionamento. Os microelementos estão representados por, aproximadamente, 0,3% do peso vivo do animal (COZZOLINO, 2007).

Quando são exigidos em quantidade da ordem de g/dia pelo organismo são chamados de macrominerais, englobando os elementos: potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), cloro (Cl); Quando são exigidos em quantidades de mg/dia são classificados em microminerais: zinco (Zn), ferro (Fe), selênio (Se), molibdênio (Mo), manganês (Mn), cobalto (Co), cobre (Cu), iodo (I), flúor (F) (MCDOWELL, 1996).

Os minerais não podem ser sintetizados pelo *ver vivo*, sendo através da alimentação o principal método para obtenção. Os animais possuem a capacidade de acumular reservas de minerais e utilizá-las em épocas de restrição. Quando se tem deficiência de mineral na dieta, o animal consegue permanecer em bom estado por alguns dias, mas depende do grau de deficiência, suas reservas e o ambiente (WILL et al., 2010).

A inadequada passagem de minerais essenciais da mãe para o filho pode resultar na deficiência desses nutrientes para o filhote, causando danos no seu crescimento, anormalidades no metabolismo, sistema nervoso central e nos ossos. No terço final da gestação e aleitamento, os requisitos de nutrientes são aumentados pelas crias devido ao crescimento e proliferação celular, aumentando também as exigências nutricionais da mãe (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008).

O perfil de minerais nos tecidos dos animais pode ser utilizado como parâmetro para verificar o estado de sua saúde. A nutrição materna é o ponto chave neste quesito, principalmente quando na sua dieta exista uma molécula considerada antinutricional como no caso do caroço de algodão (gossipol). Como os sinais clínicos são muitos tardios, sobre o processo deletério que está ocorrendo nas células em virtude do gossipol, torna-se necessário buscar ferramentas sensíveis, que possam elucidar precocemente a ocorrência de tais efeitos. Neste sentido a busca por técnicas nucleares, como por exemplo, microfluorescência de raios X e ativação neutrônica.

## 2.5 Microfluorescência de raios X

A descoberta dos raios X e a origem da análise da fluorescência de raios X foram iniciadas pelo desenvolvimento da teoria moderna da estrutura atômica em 1895 (SIEGEL, 1981) pelo físico Wilhelm Conrad Rontgen no laboratório de física, no Instituto de Julius-Maximilians, na Universidade de Wuzburg na Bavaria, Alemanha. Desde então o ponto comum entre todos os tipos de equipamentos para análise de fluorescência de raios X é que nos últimos 100 anos a técnica é absolutamente a mesma (BERTIN, 1975).

No dia a dia, os raios X são amplamente usados e auxiliam médicos e dentistas em diagnóstico de doenças e tratamento dentário, fraturas ósseas, finalidade terapêutica e esterilização de material para fins médicos. Na indústria, eles também são empregados para visualizar rachaduras e defeitos não visíveis em materiais de interesse, em teste de qualidade de produtos em série, e seguranças em aeroportos do mundo todo, e etc.

A análise por fluorescência de raios X pode ser dividida em dois tipos de análises: os portáteis e fixos, que utilizam tubos de raios X, como fonte de excitação e capilares ópticos como condensadores do feixe incidente; e a análise que se utiliza uma fonte de Luz Síncroton para exercer a excitação, considerado com altas energias (INJUK; VAN GRIEKEN, 2003; KANNGIESSE, 2003).

A fluorescência de raios X é uma técnica, onde sua metodologia está baseada na produção e detecção de raios X característicos emitidos pelos elementos da amostra. A microfluorescência de raios X é considerada uma variante da fluorescência de raios X, que é utilizada como método analítico para determinação da composição de elementos químicos do material a ser analisado em muitos laboratórios no mundo há muito tempo (BECKHOFF et al., 2006). Entre as duas análises, a diferença básica está na geometria e dimensões dos feixes. É considerada uma técnica não destrutiva, utilizada para análise quantitativa e qualitativa de vários números de elementos químicos (HASCHKE, 2014).

Seu princípio de funcionamento é a excitação da amostra, quando um átomo em seu estado normal fica sob a ação de uma fonte externa de radiação (raios X), ele absorve energia, liberando elétrons de suas camadas a níveis mais energéticos. Na transição de um estado menos energético para o mais energético, o elétron irá liberar seu excesso de energia através da radiação eletromagnética específica, ou seja, o átomo estará numa condição instável ou excitado (BECKHOFF et al., 2006), que quando detectada pode caracterizar o elemento químico que a emitiu.

Na natureza, a tendência é de se buscar a condição de equilíbrio para tudo, assim o átomo excitado, tende a retornar ao seu estado normal, naturalmente. Ocorrendo assim uma emissão de energia e todos os elementos emitem picos de raios X característicos, permitindo sua identificação e posteriormente a quantificação (BECKHOFF et al., 2006).

Durante os últimos anos, a análise por microfluorescência de raios X tem aumentado e descrita por muitos autores, pois é uma técnica bem estabelecida para se determinar as concentrações de elementos químicos em tecido biológico. A microfluorescência de raios X é comprovadamente análise promissora para a aquisição de imagens de elementos químicos a nível celular. Além disto, a utilização dessa análise abre várias frentes para a determinação e/ou mapeamento elementar em amostras com diferentes características físicas (LEITÃO et al., 2015a).

Como a perda óssea é um dos possíveis efeitos colaterais da quimioterapia, Pickler et al. (2015) utilizaram a técnica de microfluorescência de raios X no fêmur de ratas tratadas com diferentes fármacos, submetidas a dois regimes de quimioterapia utilizados para o tratamento de câncer de mama, avaliando as concentrações de Ca, Fe e Zn para investigar possíveis alterações elementares no osso causado pela quimioterapia. Os resultados mostraram que houve diminuição significativa especialmente nas concentrações de Ca ao comparar o grupo tratado com o controle.

Will et al. (2010) utilizaram o método de microfluorescência de raios X para caracterizar a placenta bovina, sendo considerada importante tecido que conecta a mãe e o filho e através da alimentação inadequada pode alterar as condições do tecido e sua função. Eles utilizaram a técnica para mapear a placenta e determinar a concentração de elementos químicos em diferentes fases da gravidez permitindo contribuir para um melhor entendimento sobre a nutrição, reprodução e qualidade de vida de seus descendentes. Os resultados mostraram que elementos como Fe, Cu e Zn não estavam uniformemente distribuídos na placenta e que a maior concentração foi observada na região de interface materno-fetal.

Serpa et al. (2008) utilizaram a técnica de mapeamento multielementar a partir da microfluorescência de raios X para mapear o Fe, Zn e Cu em secções de cérebro de ratos Wistar fêmeas de diferentes idades. Ela observou que a distribuição de Fe e Zn foi mais

notável na área cortical e hipocampo, respectivamente. E que os níveis dos elementos aumentavam conforme o avanço da idade desses animais, reforçando que esses elementos estão envolvidos nos mecanismos do cérebro induzindo doenças neurológicas.

Leitão et al. (2015b) investigaram a distribuição de Zn nos esferoides celulares na hiperplasia benigna da próstata (HBP) e câncer de próstata (PCa) e analisaram diferenças na resposta com o tratamento com Zn usando o mapeamento elementar a partir da microfluorescência de raios X. Os resultados mostraram distribuição uniforme de Zn em todos os esferoides analisados com resposta diferente de Zn nas duas células, concluindo que o Zn pode ter um papel importante na célula PCa.

## **2.6 Ativação Neutrônica**

Historicamente, a análise por ativação neutrônica (NAA) teve sua primeira aplicação em 1936 e com o passar dos anos essa técnica vem crescendo nas determinações a nível elementar. Dois grandes momentos marcaram a história, onde em 1950 e 1960, surge e dissemina pelo mundo toda a tecnologia de reatores nucleares; e em 1970 passa a existir detectores de germânio, mais sensíveis que os utilizados anteriormente, tornando definitivamente a técnica de ativação neutrônica, conhecida atualmente como multielementar (SANTOS, 2004).

A análise por ativação neutrônica é uma técnica para se determinar quantidades de elementos químicos de uma amostra, e se baseia na produção e posterior identificação de radionuclídeos artificiais a partir de elementos químicos que estão estáveis naturalmente. O princípio do método se baseia na exposição da amostra a fluxo de nêutrons (bombardeamento), cujos elementos químicos ficam instáveis emitindo radiações ionizantes características, que possibilitam a sua identificação e quantificação (HAMIDATOU et al., 2013).

A análise instrumental por ativação neutrônica (INAA) é quando a amostra não sofre tratamento químico, conhecido por sua alta precisão, sensibilidade, livre de contaminação cruzada e preparação mínima da amostra e tem sido amplamente aplicada na pesquisa de caracterização de material biológico presente em tecidos e a processos patológicos (WASIM; ARIF; IQBAL, 2014). Em uma única análise, o método permite a determinação simultânea de diversos elementos químicos com elevada precisão (BACCHI; FERNANDES;

DE OLIVEIRA, 2000), mas a número de elementos que se determina na análise, depende da matriz da amostra, qualidade do preparo, irradiação e detecção (IAEA, 1990).

No método por ativação neutrônica, trabalhos que avaliem tecido animal ainda são incipientes. No entanto existem pesquisas que tem avaliado amostras biológicas, como por exemplo, o leite. Santos et al. (2012) avaliaram a qualidade do leite de uma das principais regiões leiteiras do Brasil, localizadas no Rio Grande do Sul e Minas Gerais, pela determinação de elementos químicos a partir da ativação neutrônica.

Gil et al. (2004) analisaram através da ativação neutrônica os níveis de Se no solo, forragem e plasma dos animais de uma determinada fazenda de cria de gado de corte. Os animais analisados apresentaram níveis de Se abaixo do normal, em decorrência a concentração de Se da forragem consumida e feno de palha de trigo, utilizados como suplemento. Confirmando-se que a deficiência de Se nos animais é atribuída por uma determinação direta do mineral; os resultados indicam que pode existir relação entre a baixa concentração de Se na forragem e no suplemento e sua deficiência nos animais.

Elias et al. (2015) avaliaram por meio a quantificação dos elementos químicos com função nutricional e com potencial tóxico presentes nas rações para cães adultos e filhotes, os elementos químicos Al, As, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, I, K, La, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Se, Ti, U e Zn foram determinados pela análise por ativação neutrônica instrumental (INAA). E a homogeneidade de distribuição dos elementos químicos nas rações foi avaliada pela análise de amostras grande (LS-NAA). E para o controle da qualidade do procedimento analítico, foi incluído material de referência certificados de fígado bovino (SEM 1577c).

Wasim, Arif e Iqbal (2014) utilizaram o método de ativação neutrônica instrumental para verificar a distribuição de microelementos em sete regiões diferentes em cérebro de cabra. Um total de 14 elementos foi analisado em todas as partes: Br, Co, Eu, Fe, Hg, K, Na, Rb, Sb, Sc, Se, Tb e Zn. E ao comparar os resultados analíticos com os dados saudáveis de cérebro humano, mostrou que oito elementos (Eu, K, Na, Rb, Sb, Sc, Se, Tb) foram encontrados com concentrações elementares relativamente maiores no cérebro humano.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

O experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Nutrição Animal (LANA), Instrumentação Nuclear (LIN) e Radioisótopos (LRi) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no campus Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), situado na cidade de Piracicaba, São Paulo, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais para Experimentação (CEUA-CENA/USP) com Protocolo n° 008/2015.

#### 3.2 Animais e tratamentos experimentais

Foram utilizados 18 cordeiros machos com peso corporal ao nascer de  $3,94 \pm 0,81$  kg, descendentes de ovelhas da raça Santa Inês, mantidas em piquetes com gramíneas de *Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana e *Brachiaria debumbens* cv. Basilisk, a partir das 8:30 horas. Diariamente, as 16:00 horas as ovelhas eram recolhidas para o pernoite em baia coletiva. Neste momento, em cochos individuais e prezas por canzil, elas recebiam suplementação com dois tipos de concentrados diferentes (Tabela 3.1), um contendo soja em grão, sendo o grupo controle (CO) e outro com caroço de algodão (CA). Além disso, havia acesso livre ao feno de Tifton (*Cynodon* ssp.), água e sal mineral. A suplementação iniciou-se durante a fase de adaptação (15 dias), acasalamento (3 meses), gestação (5 meses) e lactação/desmame (2 meses) dos cordeiros.

Do nascimento ao desmame, os cordeiros foram mantidos em baias coletivas com acesso *ad libitum* a água, feno Tifton (*Cynodon* ssp.), sal mineral, e concentrado (70 % milho e 30 % farelo de soja) fornecido em *creep feeding* (Tabela 3.1).

Diariamente, após o fornecimento da suplementação dos concentrados, as sobras foram coletadas e pesadas, a fim de aferir o consumo destes por parte das ovelhas. Durante as fases do experimento (adaptação, acasalamento, gestação e lactação/desmame) houve ajustes na dieta a fim de proporcionar as exigências nutricionais das ovelhas em proteína e energia metabolizável para ganho médio diário animal (GMD) de 150 g, de acordo com o Nacional Research Council (2007) e limite máximo 7 % de extrato etéreo (EE) permitido na dieta de ruminantes.

As amostras dos concentrados e das gramíneas (Tabela 3.1) foram submetidas às análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM), segundo recomendações da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2010). Para determinar o teor de gossipol no caroço de algodão foram realizadas análises segundo metodologia adaptada de Botsoglou (1991).

**Tabela 3.1.** Quantidade oferecida e composição bromatológica e teor de gossipol livre dos volumosos e concentrados

Parâmetros	Volumoso		Concentrado		
	Pasto	Feno	CO	CA	Cordeiro
Oferecido (g)	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	500-600	500-600	<i>Ad libitum</i>
Matéria Seca (g/kg)	924,80	899,78	932,40	939,87	876,95
Matéria orgânica (g/kg)	899,01	940,55	961,33	964,10	965,62
Proteína bruta (g/kg)	169,63	65,31	249,64	199,51	218,19
Fibra em detergente neutro (g/kg)	671,13	808,63	476,72	586,26	402,01
Fibra em detergente ácido (g/kg)	379,61	449,02	128,81	425,64	67,30
Extrato etéreo (g/kg)	16,55	19,77	193,20	209,70	-
Matéria mineral (g/kg)	100,99	59,45	38,68	35,90	34,38
Lignina (g/kg)	68,42	90,07	93,86	157,98	67,30
Gossipol Livre (mg/kg)	-	-	-	600,00	-

### 3.3 Amostragem da dieta dos cordeiros para análises multielementar e bromatológica

As amostras do concentrado, feno e leite consumido pelos cordeiros foram submetidas a análises multielementar por ativação neutrônica e bromatológica, realizada na Clínica do Leite, da ESALQ/USP. Para a coleta do leite, do nascimento ao desmame, em intervalos de 15 dias, as ovelhas foram ordenhadas manualmente, e posteriormente realizadas um pool individual dos intervalos. As amostras foram submetidas a análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE). Para análise de ativação neutrônica as amostras foram armazenadas em temperatura de -20 °C, liofilizadas e moídas com pistilo, para posterior análise multielementar.

### **3.4 Avaliação do ganho em peso e hormônio dos cordeiros**

Do nascimento ao desmame com intervalos de 15 dias os cordeiros foram pesados para determinar o ganho em peso. Amostras do sangue foram colhidas por meio de punção da veia jugular, utilizando-se tubos com vácuo, sem anticoagulante nos dias 15, 30, 45 e 60 após o nascimento dos animais. Imediatamente após as colheitas, as amostras de sangue foram centrifugadas (durante 10 min, a 1310 g e 4 °C) para separação do soro sanguíneo, que foram armazenadas em temperatura de -20 °C para posterior análise. A quantificação dos teores de testosterona, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) no soro sanguíneo dos cordeiros foram realizadas por radioimunoensaio (RIA), em duplicata por amostra, utilizando-se o contador automático Gama (Wizard 2; Perking Elmer, Downs Grove, IL. USA), com kits comerciais específicos, segundo as instruções do fabricante.

### **3.5 Amostragem e mensurações dos testículos**

Aos 60 dias de idade os cordeiros foram sedados com aplicação de cloridrato de xilazina na dose de 0,1 mg/kg por via intramuscular (Rompum Bayer Saúde Animal, Leverkusen – Alemanha) em seguida foi realizada a aplicação de anestesia local infiltrativa com 2 mL de cloridrato de lidocaína 2 % com epinefrina (Anestésico L, Pearson Saúde Animal - Brasil) distribuídos na região do cordão espermático e porção ventral do escroto. Posteriormente foi feita incisão no escroto e sutura do cordão espermático (fio de nylon) para retirada dos dois testículos. Na sequência os testículos foram pesados, medidos o volume com auxílio de proveta, o comprimento e largura, com paquímetro. Logo após a realização das medidas o testículo direito foi dividido ao meio por corte transversal na região mediana do órgão, sendo que a metade inferior foi reservada para histologia e a superior para ativação neutrônica. O testículo esquerdo inteiro foi destinado para microfluorescência de raios X.

### **3.6 Morfologia microscópica dos testículos**

A secção inferior do testículo esquerdo foi fixada em formol 10 % tamponado durante 24 horas e, posteriormente, armazenado em etanol 70 %. O tecido foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 95%, uma vez por trinta minutos e finalmente 100%, duas vezes por 30 minutos).

Na etapa seguinte, o testículo foi pré-infiltrado por quatro horas numa solução de resina diluída em etanol 100% na proporção 1:1, por 4 horas. Após pré-infiltração, o tecido foi submergido em resina pura durante a noite. Em seguida, foi embebido em resina plástica, refrigerado em geladeira. Os blocos foram seccionados por navalha de aço em micrótomo Leica RM 2125RT (Leica Microsystems), obtendo-se corte de 3  $\mu\text{m}$  de espessura. Foram obtidos 8 cortes por animal. Os cortes foram então estirados na água e colocados em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina. A captura de imagem digital foi realizada com aumento de lente de 40x no microscópio AxioSkop (Zeiss), juntamente com câmera CCD digital colorida (Sony, modelo I DXC-107<sup>a</sup>). Um total de cinco imagens foi obtido por animal e em cada imagem foram analisados cinco túbulos seminíferos escolhidos aleatoriamente, totalizando 25 túbulos por animal. O diâmetro do túbulo e lúmen foram medidos em dois pontos de cada túbulo seminífero, utilizando o software BELmicro®. A espessura do epitélio seminífero foi calculada pela diferença entre o diâmetro do lúmen e do túbulo, segundo Paim (2012).

### **3.7 Preparação da amostra para Microfluorescência de raios X**

Para a realização das análises de microfluorescência de Raios X, a fim de preservar a integridade do tecido biológico, o testículo esquerdo foi fixado por criofixação (imerso em isopentano e em seguida congelado em nitrogênio líquido), com o objetivo de evitar a formação de cristais de gelo e mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da secção dos cortes. Foram selecionados cortes histológicos de, aproximadamente, 5 mm de espessura, na região de maior diâmetro do órgão, com secção manual com auxílio de lâmina de bisturi. Em seguida os cortes foram transferidos para porta amostra (cubeta) montada com filme para raios X de poli-imida do tipo Kapton®, e levados para liofilização (Figura 3.1).

**Figura 3.1** – Corte transversal do testículo acondicionado no porta amostra (cubeta) com filme para raios X de poli-imida do tipo Kapton®

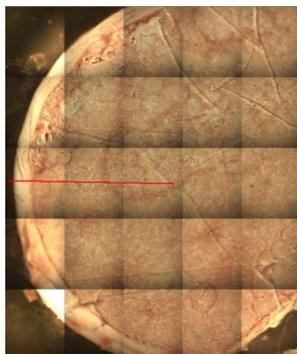


### 3.7.1 Análises Microfluorescência de raios X

As medidas de microfluorescência de raios X foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) no CENA/USP, no equipamento Orbis PC, com tubo de Ródio. Para a aquisição dos espectros, utilizou-se um feixe de radiação com faixa de energia de 30 kW de tensão, 400  $\mu$ A de corrente e dimensão de feixe de 30  $\mu$ m para excitar as amostras. Para a detecção dos raios X fluorescentes emitidos pelas amostras, utilizou-se um detector de Silício (SDD). Todas as medidas foram feitas à vácuo, sobre condições normais de temperatura e com geometria de excitação padrão.

Nas secções dos testículos, foram realizadas análises de microfluorescência de raios X em linha começando da extremidade externa até o interior do tecido (Figura 3.2), a fim de verificar sua homogeneidade. A determinação quantitativa dos elementos efetivou-se por meio de espectros em 16 pontos em cima da linha.

**Figura 3.2** – Posicionamento da secção histológica do testículo no equipamento para a análise de microfluorescência de raios X em linha (determinação dos elementos em 16 pontos em cima da linha vermelha)



Para a realização dos mapas de distribuição elementar, foi utilizado um feixe de radiação, na horizontal para que as amostras sejam mapeadas, com faixa de energia de 30 kW de tensão, 800  $\mu$ A de corrente e dimensão de feixe de 1 mm para excitar as amostras. Para a detecção dos raios X fluorescentes emitidos pelas amostras, utilizou-se um detector de Silício (SDD). Todas as medidas foram feitas a vácuo, sobre condições normais de temperatura e com geometria de excitação padrão.

### 3.8 Ativação Neutrônica

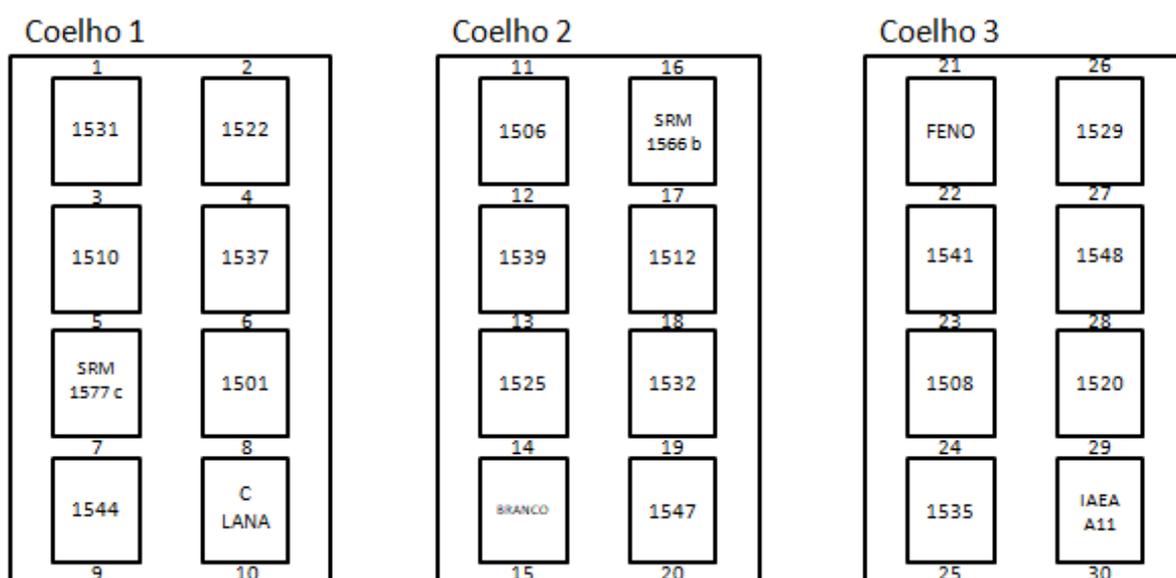
As análises de Ativação Neutrônica foram realizadas no Laboratório de Radioisótopos no CENA/USP. Os testículos foram congelados em nitrogênio líquido e refrigerados em temperatura de -80 °C. Posteriormente, as amostras dos testículos e leite foram liofilizadas, moídas manualmente em pistilo, acondicionadas (aproximadamente 150 mg) em cápsulas de polietileno do tipo T com 9 mm de altura, de alta pureza fabricadas pela Vrije Universiteit, Amsterdã, Holanda, especialmente fabricadas para irradiação com nêutrons e lacradas com bastão de quartzo sob aquecimento.

Fragmentos de, aproximadamente, 9 mg de fio de liga Ni-Cr, foram preparadas e colocados na parte inferior e superior de cada capsula, no coelho, para monitorar o fluxo de nêutrons. Além dos monitores de fluxo, foram colocadas em cada lote, 3 materiais de referências certificados (MRCs) para o controle da qualidade do procedimento analítico,

e um branco analítico (cápsula vazia) para detectar elementos químicos interferentes presentes na sua composição, ou seja, sendo necessária a correção dos seus valores nas amostras (ELIAS, 2008; SANTOS, 2009).

O “coelho” contendo as amostras, materiais de referência certificados, branco analítico e monitores de fluxo de nêutrons, está ilustrado na Figura (3.3).

**Figura 3.3** - Distribuição das amostras, materiais de referência certificados, branco analítico e monitores de fluxo de nêutrons nos recipientes de irradiação ("coelho") no lote a ser irradiado



Para determinação de elementos que geram radionuclídeos de meias-vidas longas (maior que 12 h) os testículos foram transportados para o instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN) irradiados com fluxo de nêutrons térmicos, por período de 4 h no reator nuclear de pesquisa IEA-R1.

Para a detecção, no laboratório de Radioisótopos (LRi) CENA/USP, a fim de minimizar a exposição do usuário às radiações emitidas pelo material radioativo, todas as amostras foram desembaladas e preparadas para a detecção da radioatividade induzida dentro da *Glove Box*.

A medição da atividade induzida por espectrometria gama de alta resolução foi realizada por meio de detectores de germânio hiperpuro do tipo coaxial. A detecção da radioatividade das amostras e materiais de referência sucedeu em quatro dias distintos: 4, 7, 15 e 30 dias de decaimento, com tempo de contagem de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. Os monitores de fluxo foram mensurados em dois dias, aproximadamente, 60 e 62 dias após as irradiações.

Foram calculadas as concentrações dos elementos pelo método de padronização  $k_0$  (BACCHI; FERNANDES; DE OLIVEIRA, 2000) através do pacote computacional Quantu (BACCHI; FERNANDES, 2003). Esse método utiliza apenas um elemento químico como comparador. Com esse procedimento, foram determinados os elementos: Br, Ca, Cs, Co, Fe, K, Rb, Na e Zn para o testículo; e os elementos: Br, Cs, Co, Fe, K, Rb, Na, e Zn para o leite.

### **3.9 Análise Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com dois tratamentos (com e sem caroço de algodão) e 9 repetições (cordeiros) por tratamento. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada por meio do programa SAS<sup>®</sup>9.2. (SAS Institute Inc., Cary NC, EUA). Sendo que para as variáveis (peso corporal, testosterona, T3 e T4), que foram avaliadas por várias vezes no tempo foi utilizado o procedimento de medidas repetidas no tempo por meio do proc mixed. Para avaliar os elementos químicos obtidos por meio da metodologia da ativação neutrônica e as médias dos resultados da microfluorescência de raios X foi utilizado a procedimento proc anova. Em todos os procedimentos adotou-se o nível de significância de 5 %.

## 4 RESULTADOS

Os teores dos elementos químicos (Br, Ca, Cs, Co, Fe, K, Rb, Na e Zn) determinados por ativação neutrônica encontrados no leite, concentrado e feno disponíveis para os cordeiros estão apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente. Os teores de Ca e K foram superiores no leite das ovelhas CO em relação ao CA ( $P < 0,05$ ), para os demais elementos químicos não foram observadas diferenças entre tratamentos ( $P > 0,05$ ). Na composição bromatológica (Tabela 4.1) o teor de MS foi superior no leite das ovelhas CO ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.1** – Médias dos elementos químicos (mg/kg de matéria seca) em análise de ativação neutrônica e composição bromatológica do leite de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle

Leite	Tratamentos		Valor de P
	Controle	Algodão	
Bromo	14,60	13,38	0,6301
Cálcio	11213,80 <sup>a</sup>	9748,90 <sup>b</sup>	0,0110
Césio	0,12	0,12	0,7800
Cobalto	0,04	0,04	0,4960
Ferro	4,15	4,29	0,7564
Potássio	9132,20 <sup>a</sup>	7892,50 <sup>b</sup>	0,0440
Rubídio	39,42	38,92	0,9152
Sódio	2233,00	2121,50	0,7581
Zinco	35,20	36,69	0,4912
Matéria seca (g/kg)	155,32 <sup>a</sup>	143,91 <sup>b</sup>	0,0398
Proteína bruta (g/100 mL)	4,50	4,21	0,7468
Extrato etéreo (g/100 mL)	5,75	5,30	0,0600
Matéria mineral (g/kg)	56,24	56,25	0,9960

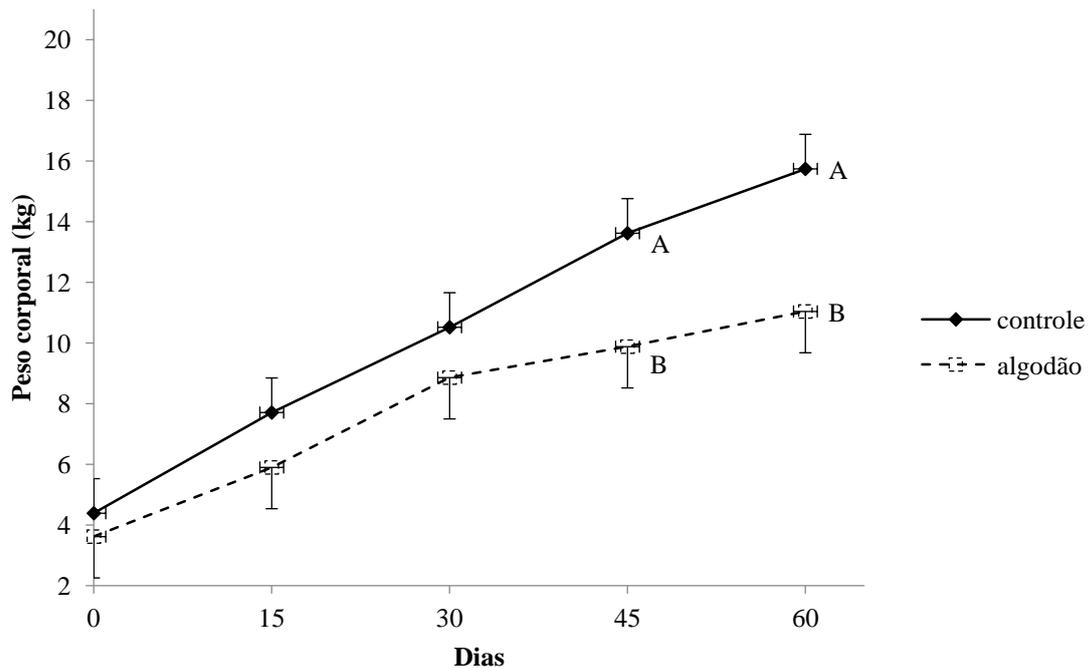
<sup>a,b</sup> - Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.2** – Médias dos elementos químicos (mg/kg) determinados por ativação neutrônica no concentrado e feno consumidos pelos cordeiros

Elementos	Alimento	
	Concentrado	Feno
Bromo	1,28	15,14
Césio	0,06	0,10
Cobalto	0,06	0,20
Ferro	65,7	124
Potássio	9680	12700
Rubídio	10,5	28
Sódio	2,8	50,96
Zinco	28,58	31,14

A evolução dos pesos dos cordeiros durante o nascimento até o desmame, aos 60 dias, está representada na Figura 4.1. Os cordeiros CO demonstraram peso superior a partir dos 45 dias até o final do experimento em comparação com os CA ( $P < 0,05$ ).

**Figura 4.1** – Peso corporal dos cordeiros cujas mães foram alimentadas com caroço de algodão e controle durante o período experimental



As médias do ganho em peso diário (GMD) foram de 189 e 123 g/animal/dia para o CO e CA, respectivamente. Verificou-se que o GMD foi superior nos cordeiros do CO em relação aos CA ( $P < 0,05$ ).

As médias das avaliações realizadas nos testículos, após castração, estão descritas na Tabela 4.3. Verificou-se que o peso, volume, comprimento e largura foram maiores nos cordeiros CO em relação aos CA ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.3** – Médias da morfometria testicular de cordeiro oriundo de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle

Medições (direito e esquerdo)	Tratamentos		EPM	Valor de P
	Controle	Algodão		
Peso (g)	7,57 <sup>a</sup>	3,54 <sup>b</sup>	1,93	0,0002
Volume (mL)	4,50 <sup>a</sup>	2,83 <sup>b</sup>	1,36	0,0186
Comprimento (mm)	26,77 <sup>a</sup>	20,86 <sup>b</sup>	3,29	0,0009
Largura (mm)	18,66 <sup>a</sup>	14,36 <sup>b</sup>	2,48	0,0012

<sup>a,b</sup> - Médias. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

EPM – Erro padrão da média

As médias das medidas histológicas dos diâmetros do túbulo e lúmen, e espessura do epitélio estão representadas na Tabela 4.4. Verificou-se que os diâmetros do túbulo e lúmen foram maiores nos cordeiros CO em relação aos CA ( $P < 0,05$ ), não havendo diferença para a espessura do epitélio entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

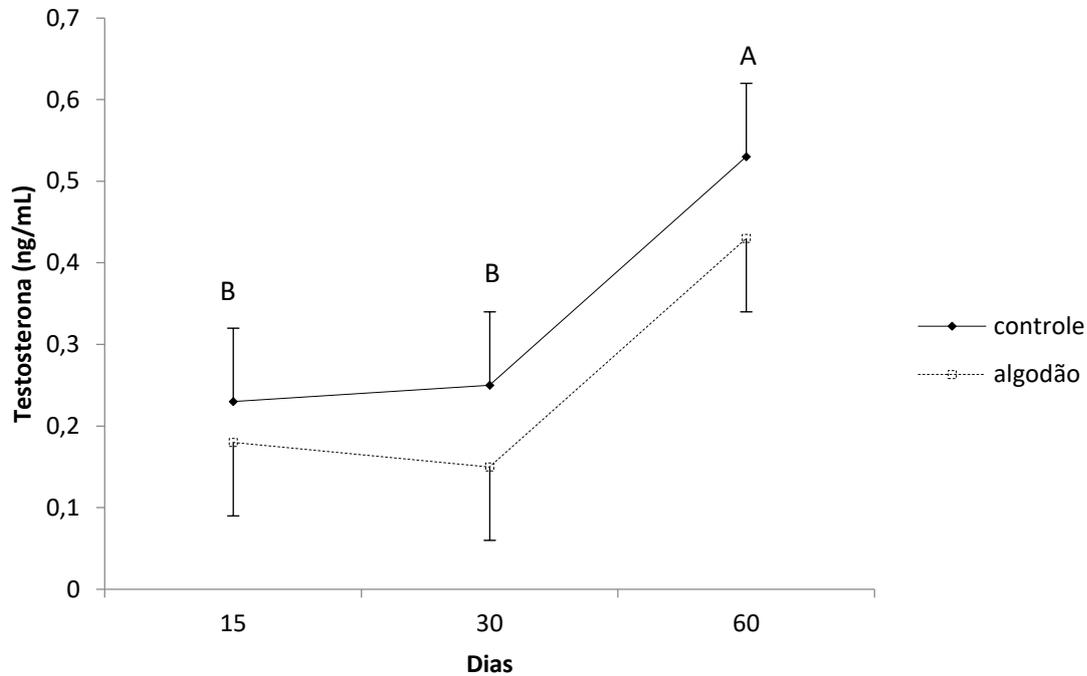
**Tabela 4.4** – Diâmetro do túbulo e lúmen e espessura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ) em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle

Variáveis	Tratamentos		Valor de P
	Controle	Algodão	
Túbulo	39,18 <sup>a</sup> $\pm$ 11,57	34,05 <sup>b</sup> $\pm$ 14,23	0,0001
Lúmen	25,87 <sup>a</sup> $\pm$ 8,24	20,76 <sup>b</sup> $\pm$ 9,79	0,0001
Epitélio	13,3 $\pm$ 4,85	13,28 $\pm$ 4,90	0,9479

<sup>a,b</sup> - Médias  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

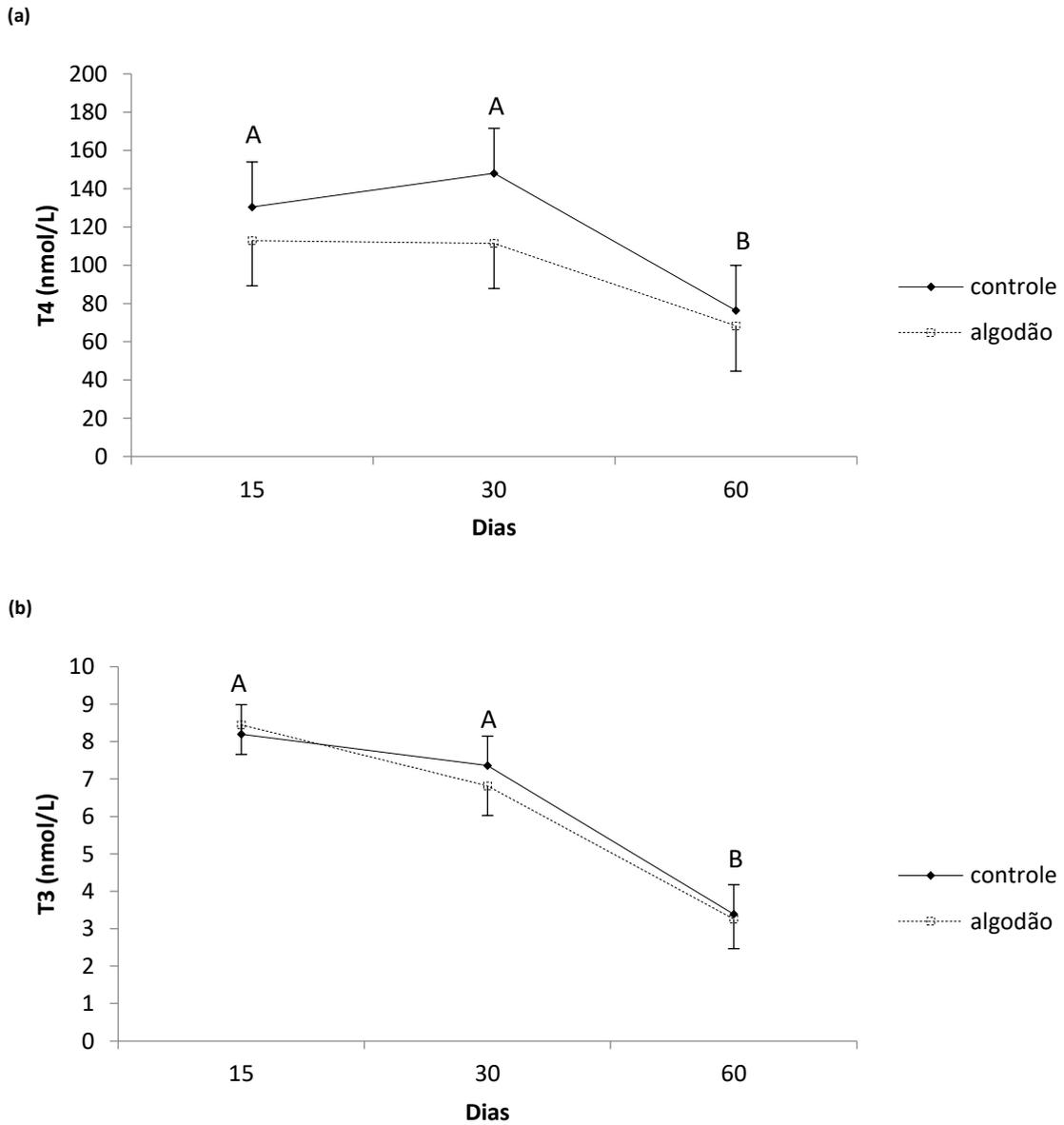
Os teores de testosterona no soro dos cordeiros estão apresentados na Figura 4.3. Não houve diferença entre tratamentos ( $P > 0,05$ ), durante o período experimental, mas houve aumento da testosterona aos 60 dias, em todos os cordeiros em relação aos dias 15 e 30 ( $P < 0,05$ ).

**Figura 4.2** – Teores de testosterona no soro de cordeiros nos dias 15, 30 e 60, após o nascimento, oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle.  
<sup>A,B</sup> – Letras diferentes representam diferenças no tempo para os dois tratamentos



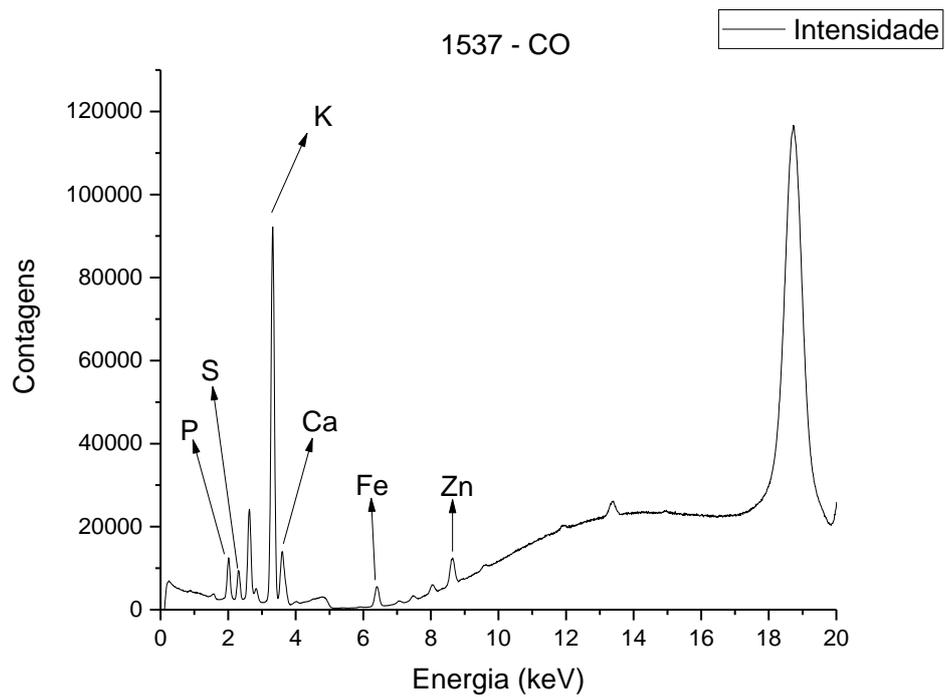
Os teores dos hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) no soro de cordeiros dos tratamentos controle e algodão estão apresentados na Figura 4.4. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) apenas no tempo, com diminuição dos teores aos 60 dias em relação aos 15 e 30 dias.

**Figura 4.3** – Concentrações dos hormônios tiroxina (T4) (a) e triiodotironina (T3) (b) no soro de cordeiros nos dias 15, 30 e 60 oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle. <sup>A,B</sup> – Letras diferentes representam diferenças no tempo para os dois tratamentos

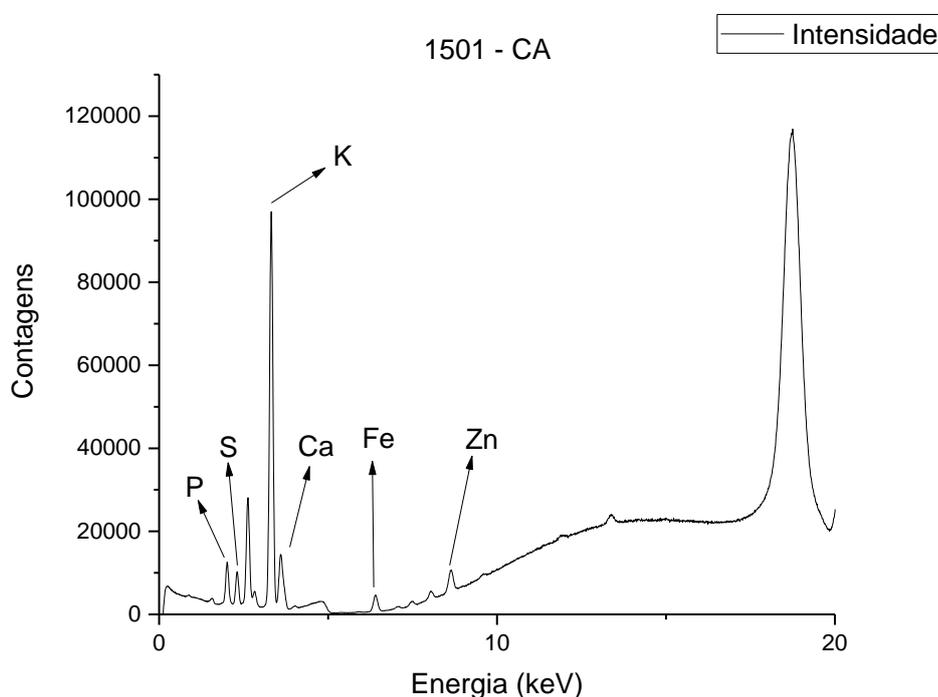


As Figuras 4.5 e 4.6 ilustram os espectros médios dos mapeamentos em análise de microfluorescência de raios X de duas amostras de testículos; a primeira do cordeiro CO (animal 1537) e a segunda do cordeiro CA (animal 1501). Foi possível detectar segundo as condições experimentais, os elementos: K, P, S, Fe, Ca e Zn.

**Figura 4.4** – Espectro médio do mapeamento por análise de microfluorescência de raios X do testículo de cordeiro do CO (1537)



**Figura 4.5** – Espectro médio do mapeamento por análise de microfluorescência de raios X do testículo de cordeiro do CA (1501)



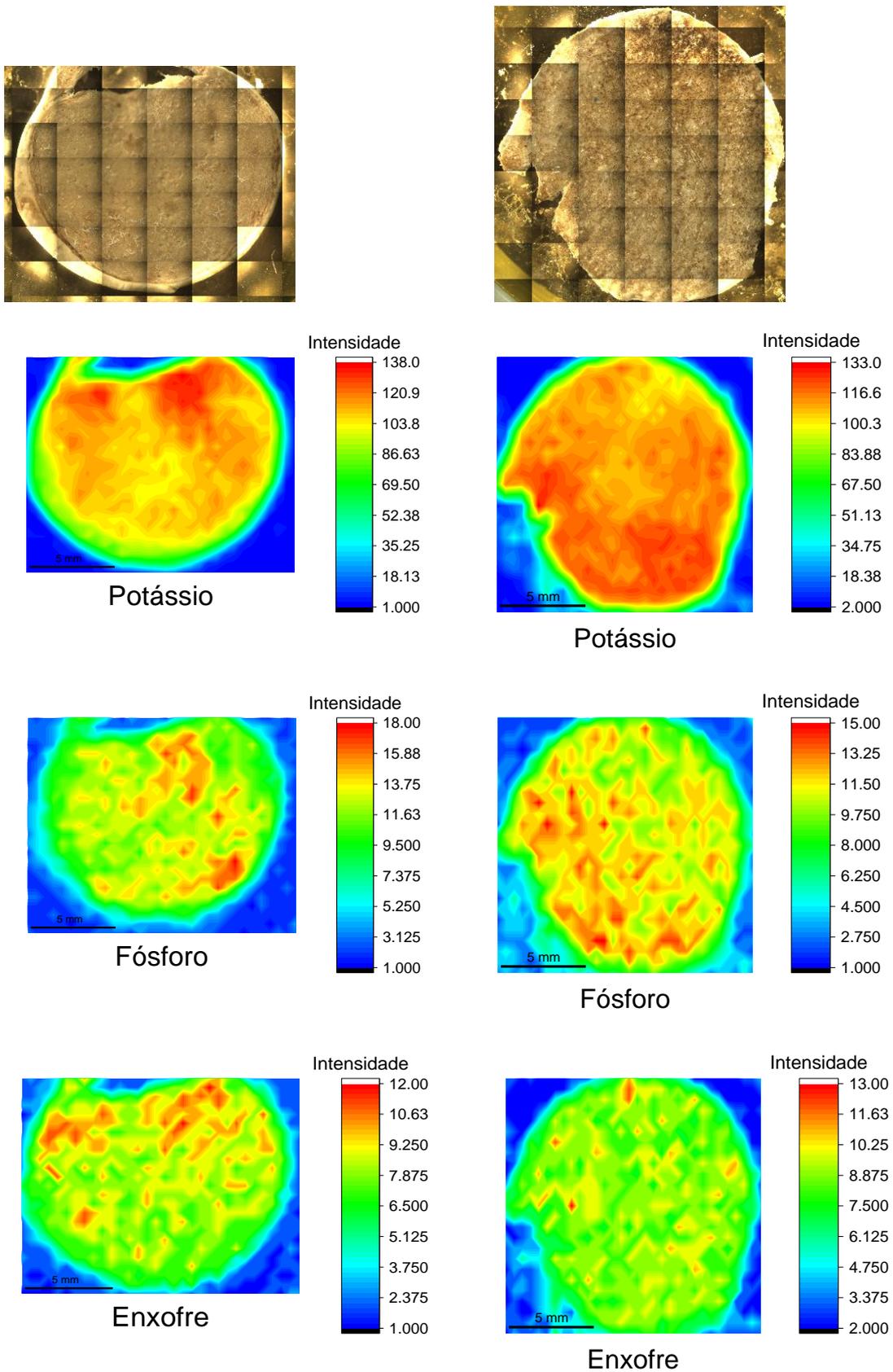
As médias das contagens dos elementos químicos (P, S, K, Ca, Fe e Zn) analisados por microfluorescência de raios X nos testículos estão apresentadas na Tabela 4.5, sendo que não houve diferenças entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

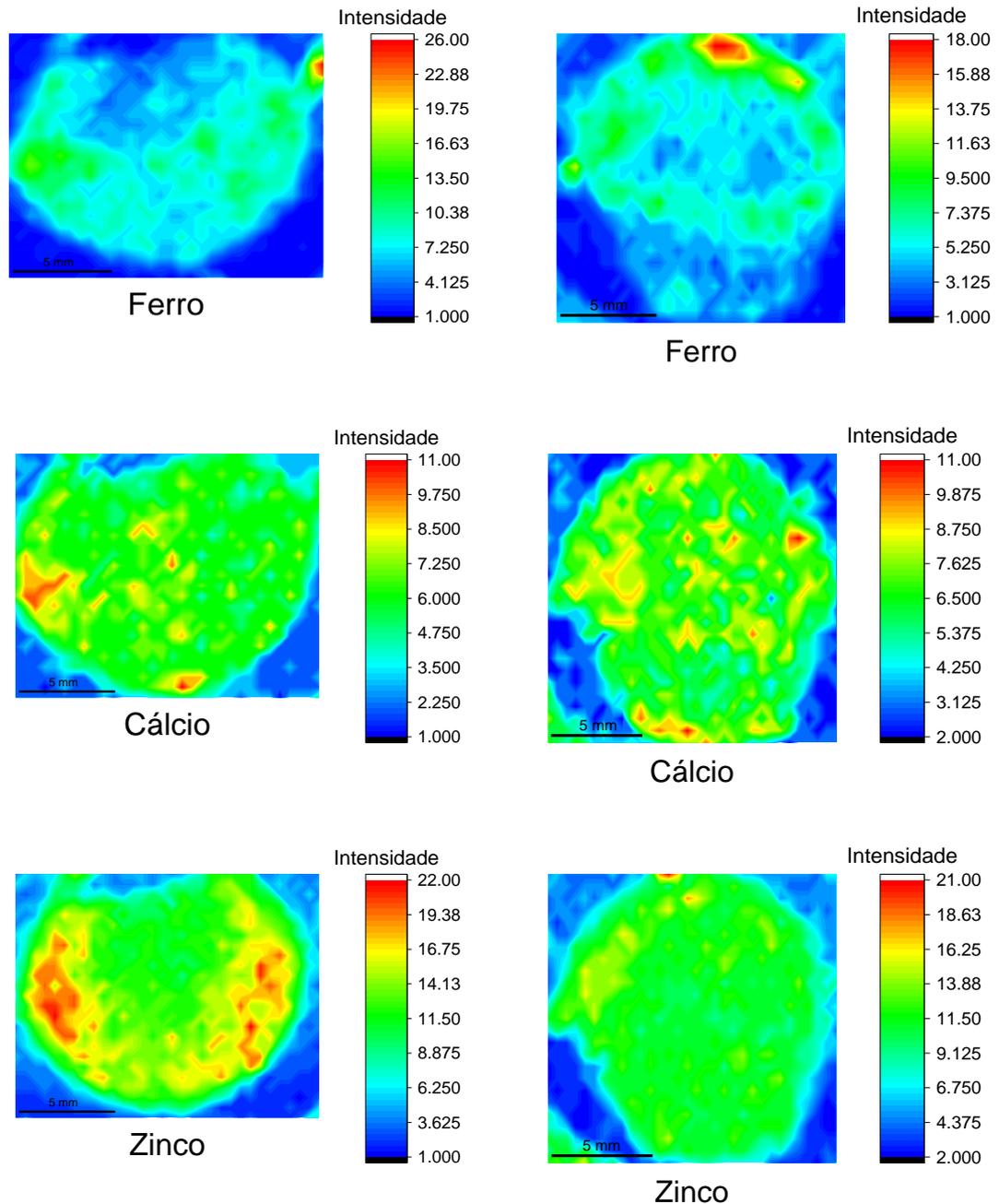
**Tabela 4.5** – Médias das contagens em segundos (cps) dos elementos químicos detectados por microfluorescência de raios X em testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle

Elementos	Tratamentos		Valor de P
	Controle	Algodão	
Potássio	655,25	603,65	0,2319
Fósforo	64,36	65,33	0,8622
Enxofre	55,83	51,61	0,1852
Ferro	25,18	26,56	0,9062
Cálcio	15,09	13,91	0,4318
Zinco	14,00	11,64	0,3018

A Figura 4.7 apresenta os testículos selecionados para o mapeamento e os mapas bidimensionais da concentração elementar dos elementos K, P, S, Fe, Ca e Zn em testículo do cordeiro CO (1537) e CA (1501), esquerda e direita, respectivamente.

**Figura 4.6** – Fotos dos testículos dos cordeiros 1537 (controle) e 1501 (caroço de algodão) com mapeamentos bidimensionais das concentrações dos elementos: K, P, S, Fe, Ca e Zn





As médias das concentrações de Br, Cs, Co, Fe, K, Rb, Se, Na e Zn em mg/kg nos testículos de cordeiros, analisados por ativação neutrônica estão apresentados na Tabela 4.6. O teor de Zn foi superior nos cordeiros CA em relação aos CO ( $P < 0,05$ ) e os teores de Rb, Se e Cs, ao contrario foram maiores nos cordeiros CO ( $P < 0,05$ ). Para os demais elementos químicos (K, Na, Fe Br e Fe) não houve diferença entre tratamentos ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 4.6** – Médias dos teores dos elementos químicos (mg/kg) determinados por ativação neutrônica nos testículos de cordeiros oriundos de ovelhas alimentadas com caroço de algodão (gossipol) e controle

Elementos	Tratamentos		REF	Valor de P
	Controle	Algodão		
Bromo	19,60	21,17	-	0,3388
Césio	0,17 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,10	0,0164
Cobalto	0,11	0,13	0,08	0,3152
Ferro	166,00	205,11	200,00	0,4228
Potássio	18144,40	16744,40	-	0,1487
Rubídio	79,22 <sup>a</sup>	56,71 <sup>b</sup>	53,00	0,0059
Selênio	1,85 <sup>a</sup>	1,65 <sup>b</sup>	6,80	0,0222
Sódio	9776,80	10173,40	-	0,4301
Zinco	83,75 <sup>b</sup>	89,72 <sup>a</sup>	180,00	0,0183

<sup>a,b</sup> - Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

REF. = Valores de referência em testículo de ratos em análise por INAA segundo Mazière et al. (1977)

## 5 DISCUSSÃO

Poucas informações estão disponíveis na literatura da utilização de algodão na nutrição materna de ruminantes, podendo interferir na saúde da sua prole. O teor de gossipol consumido diariamente pelas ovelhas foi de 300 a 360 ppm/animal/dia (Tabela 3.1), ou seja, dentro do valor recomendado na literatura de 900 ppm/animal/dia para ruminantes (ROGERS; POORE; PASCHAL, 2002). Além disso, não houve comprometimento da saúde das ovelhas do presente experimento, conforme resultados apresentados por Jimenez et al. (2017) confirmando que não houve efeito tóxico do teor de gossipol presente na dieta, o que pode ser extrapolado para os cordeiros, pois a única fonte possível de gossipol na dieta dos cordeiros seria através do leite materno. No entanto, cabe ressaltar que ruminantes jovens devido ausência do rúmen desenvolvido e funcional, com a presença de micro-organismos que podem inativar o gossipol, são mais sensíveis ao teor de gossipol na dieta (GOMES et al., 2014). As principais manifestações clínicas da intoxicação por gossipol observados em ruminantes são: diminuição do consumo de alimento, redução do ganho em peso, respiração ofegante, aumento da taxa de batimentos cardíacos, falhas na concepção, e alguns casos mais extremo, morte súbita (ROGERS; POORE; PASCHAL, 2002). As mães, e os cordeiros do nascimento até o desmame, foram acompanhados diariamente e não foram observadas alterações clínicas que demonstrassem patologia associada a quadro de intoxicação.

Observou-se variação na qualidade do leite (Tabela 4.1) das ovelhas CO com maior teor de MS, Ca e K em relação ao leite das ovelhas CA, o que pode ter contribuído pelo maior ganho em peso dos cordeiros CO, a partir de 45 dias (Figura 4.1), quando comparado com os CA. Estas alterações no leite sugerem estar associada a qualidade nutricional intrínseca dos dois grãos utilizados. O de soja com menores teores de FDN e FDA, indicam melhor degradabilidade ruminal da fração fibrosa levando a produção láctea de melhor qualidade. Por outro lado, a redução da MS, Ca e K no leite das ovelhas CA, pode estar associada ao fato do gossipol ter alta afinidade com minerais, tornando estes minerais menos disponíveis, reduzindo sua presença no leite, ação indireta do gossipol. A formação do complexo gossipol-ferro é bem conhecida, tanto que uma das maneiras de neutralizar o gossipol livre no caroço de algodão é a utilização do Fe (GADELHA et al., 2011; GOMES et al., 2014), mas os teores deste mineral no leite das ovelhas em ambos os tratamentos foram semelhantes ( $P > 0,05$ ), sugerindo que o gossipol presente na dieta não interferiu na disponibilidade de Fe para síntese láctea.

Desta maneira os teores superiores de MS, Ca e K no leite das ovelhas CO pode ter sido determinante para melhor desenvolvimento dos seus cordeiros em detrimento dos cordeiros CA, conforme observado na Figura 4.1, sinalizando que maiores estudos devem ser realizados a fim de melhor avaliar o efeito do gossipol sobre os elementos Ca e K. O Ca além de participar da formação e constituição do tecido ósseo, promove a coagulação sanguínea, ativando a proteína fibrina, e juntamente com o K atuam como constituintes dos líquidos corporais como eletrólitos (líquido que irriga o coração) (TIZIOTO et al., 2014; WILL et al., 2010) auxiliando na regulação do batimento cardíaco, contração muscular e condução do impulso elétrico na célula nervosa (KOOHMARAIE, 1996). O K é considerado um cátion intracelular, desempenhando importantes funções na geração de membranas celulares, osmolaridade intracelular e síntese de proteína (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999).

Houve diferença nas avaliações dos testículos realizadas após a castração, sendo que os cordeiros CO apresentaram, tanto nas avaliações macroscópicas, como peso, volume, comprimento e largura dos testículos (Tabela 4.3); quanto na histologia nos diâmetros do túbulo e lúmen (Tabela 4.4) valores superiores aos cordeiros do CA. Verifica-se assim que os teores superiores de MS, Ca e K no leite das ovelhas CO pode ter sido determinante para melhor desenvolvimento dos testículos dos cordeiros CO em relação aos cordeiros CA conforme observado na Tabela 4.1.

Os teores de testosterona dos animais não foram afetados pela dieta materna ( $P > 0,05$ ). No entanto, numericamente os cordeiros do CO apresentaram valores maiores durante todo o período experimental, o que pode estar relacionado com as medidas superiores do testículo e peso corporal (Figura 4.3). Esta situação deve estar vinculada a qualidade superior de MS, Ca e K do leite de suas mães e a que tudo indica não ação direta de toxicidade do gossipol, mas sim sua afinidade de se ligar a outros nutrientes. Além disso, destaca-se que o tecido funcional avaliado pela espessura do epitélio do túbulo seminífero não foi influenciado pelos tratamentos, indicando sua higidez, nas duas situações e que a produção maior de testosterona pode estar associada ao diâmetro do túbulo superior nos cordeiros CO, com maior quantidade de tecido funcional.

Avaliando a ação direta do gossipol no desenvolvimento da puberdade em ovinos Santa Inês, recentemente, Paim et al. (2016) estudaram o caroço, a torta e o farelo de algodão na dieta destes animais e observaram que, cordeiros alimentados com coprodutos da indústria de algodão, especialmente a torta, apresentaram menores teores de testosterona em relação ao

grupo controle e, conseqüentemente no final do experimento, maiores defeitos totais dos espermatozoides, menor turbilhão e menores medidas do epitélio seminífero em comparação aos animais controle. Vários estudos mostraram que o gossipol reduziu a fertilidade sem alterar o teor de testosterona, tornando o efeito do gossipol no sistema endócrino controverso (SHANDILYA et al., 1982; SOUFIR et al., 1989; WANG et al., 1984). Segundo Gizejewski et al. (2008) o gossipol pode ter efeito inibitório sobre a produção de testosterona pela célula de Leydig, através de má formação celular. As células de Leydig são células secretoras de hormônios (testosterona, androstediona e dehidroepiandrosterona), localizadas entre os túbulos seminíferos, formam-se durante a gestação, mas ficam inativadas até a puberdade e sua função é excretar hormônios andrógenos (HAFEZ; HAFEZ, 2016).

No presente experimento, não foi verificado que a dieta materna com gossipol interferiu nos teores de T3 e T4 dos cordeiros (Figura 4.4), como foi evidenciado em estudo utilizando a alimentação direta de gossipol em ratos (TANG; WONG, 1984). O gossipol na alimentação é considerado composto que pode afetar a tireoide, pois em ratos houve redução nos teores sanguíneos séricos de T4 e T3, tanto em machos (RIKIHISA; LIN, 1989) como em fêmeas (LIN; CHITCHAROENTHUM; RIKIHISA, 1990). Em coelhos, foi observado diminuição dos níveis sanguíneos de T4 e T3, mas essa redução foi revertida quando foi suprimido o gossipol da dieta (TAHA et al., 2006). Por outro lado, em estudo utilizando cordeiros machos de 1,5 a 2 anos, observou-se que o gossipol na dieta resultou em aumento do teor sérico de T3 e diminuição do teor de testosterona (EL-MOKADEM et al., 2012).

As concentrações superiores de T3 e T4 aos 15 dias observadas no presente estudo estão relacionadas com o nascimento, que é considerado momento crítico em que os animais estão sujeitos as alterações de temperatura, necessitando utilizar a termogênese para evitar a hipotermia progressiva e mortalidade, bem como garantir o crescimento. Com o passar do tempo os teores de T3 e T4, caem após o desafio inicial do parto (WU et al., 1991).

Além disso, no colostro e no leite da ovelha nos primeiros dias de lactação há elevada concentração de T3 e principalmente de T4, pois no colostro ocorre grande quantidade de globulinas transportadoras dos hormônios tireoidianos, que diminuem com a secreção láctea, pela desiodação de T3 e T4 na glândula mamaria, até produtos inativos (AKASHA; ANDERSON, 1984). Em estudo realizado por Wells, Hallford e Hernandez (2003) utilizando cordeiros com aproximadamente 180 dias, para examinar o efeito da tireoide antes, durante e após a puberdade, inicialmente foram, observaram valores de T3 de 4,93 nmol/L e T4 de 79,80 nmol/L, estando próximos aos valores aqui encontrados (Figura 4.4).

Na análise de microfluorescência de raios X, foi possível determinar K, P, S, Fe, Ca e Zn nos testículos (Tabela 4.5) e não houve diferenças nestes elementos químicos entre os tratamentos. Pela ativação neutrônica foram avaliados K, Na, Fe, Zn, Rb, Br, Se Cs e Co (Tabela 4.6), sendo que os teores de Rb, Se e Cs foram superiores nos cordeiros CO e Zn nos cordeiros CA ( $P < 0,05$ ). Os teores maiores de Ca e K no leite das ovelhas dos cordeiros CO não interferiram na incorporação destes minerais em seus testículos. Para os demais elementos químicos avaliados não houve diferenças entre o leite das ovelhas CO e CA ( $P > 0,05$ ), indicando que os valores superiores de Rb e Cs nos CO, podem ter origem no concentrado e feno consumido, com bioacumulação acentuada para o Rb e menos para o Cs, pois nos alimentos o teor de Rb variou de 10,5 a 39,4 mg/kg e nos testículos foram de 79,2 (CO) e 56,7 (CA) mg/kg ( $P < 0,05$ ). Os teores de Cs nos alimentos foram de 0,06 a 0,12 mg/kg e nos testículos 0,17 e 0,11 mg/kg para os CO e CA respectivamente. O Rb e Cs são considerados elementos sem função biológica (MAZIÈRE et al., 1977), mas pelo experimento evidenciou-se que, principalmente, para o Rb, houve deposição deste mineral no tecido testicular que merece ser melhor avaliada em trabalhos futuros.

O Zn é um elemento necessário para o crescimento e essencial para a vida de qualquer ser-vivo. Nos tecidos dos animais, especial em ruminantes, o Zn é o microelemento mais abundante e por isso participa em todas as fases do ciclo celular, mantém a estrutura de proteínas, regula a expressão gênica e é o componente essencial de, aproximadamente, 300 enzimas que participam em diversas vias metabólicas (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Houve também concentração de Zn nos testículos, os teores nos alimentos foram de 28,5 a 36,7 mg/kg e nos testículos dos cordeiros CO 83,7 mg/kg e nos CA 89,7 mg/kg ( $P < 0,05$ ). Embora não tenha havido diferença no teor de Zn entre o leite das ovelhas dos

tratamentos ( $P > 0,05$ ), a diferença a mais de 1,49 mg/kg no leite das ovelhas CA pode ter contribuído para maior concentração de Zn no testículo do CA (Tabela 4.6). Tal situação chama atenção, pois o Zn é essencial para o desenvolvimento dos testículos e sistema reprodutivo dos machos, que está vinculado particularmente a secreção de testosterona. Na deficiência deste mineral pode haver comprometimento dos mecanismos das células de Leydig, que controla o armazenamento e a liberação de testosterona. Então a deficiência de Zn está diretamente correlacionada a redução na secreção de testosterona apresentando testículos menores com menos concentração de testosterona (BÉCHET, 1986). No entanto, no tratamento CA no qual poderia haver comprometimento reprodutivo o teor de Zn foi superior.

O Se é um elemento traço essencial para muitos processos fisiológicos, especialmente para as funções dos sistemas reprodutivo, imunológico e metabolismo dos hormônios tireoidianos (T3 e T4) (IRVINE, 1996). O teor deste mineral nos alimentos fornecidos para os cordeiros ficou abaixo do limite de detecção, mas houve sua concentração nos testículos enfatizando sua atividade biológica neste tecido. Como nos alimentos seu teor não foi detectado fica difícil compreender, o que pode ter ocorrido para maior concentração no CO. No entanto, se sabe que as células testiculares, principalmente após a maturação sexual com atividade intensa na produção dos espermatozoides são bastante sensíveis ao processo de oxidação, que ocasiona degeneração causada por espécies reativas de oxigênio (ROS), que interferem na atividade biológica dos lipídeos e das proteínas essenciais para o metabolismo celular. O Se age em conjunto com a vitamina E, que atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular e o Se compõe a enzima glutathione peroxidase que neutraliza os ROS (XAVIER et al., 2008). O aumento da formação do ROS pode diminuir a fertilidade, já que os ROS reagem com as membranas dos espermatozoides e assim diminuem sua motilidade (IRVINE, 1996).

## 6 CONCLUSÃO

Houve efeito materno-descendentes superior das ovelhas controle em relação às do caroço de algodão em decorrência das características nutricionais qualitativas superiores de MS, Ca e K do seu leite, que foram determinantes para melhor desenvolvimento corporal e dos testículos dos seus cordeiros em comparação aos do caroço de algodão. Tais efeitos podem estar associados à característica do gossipol em formar complexos com minerais na dieta de suas mães. Houve maior bioacumulação de Se, Rb e Cs nos testículos dos cordeiros controles e maior de Zn nos cordeiros caroço de algodão na análise de ativação neutrônica. Pela microfluorescência de raios X não foram verificadas diferenças nas concentrações de K, P, S, Fe, Ca e Zn e no mapeamento destes elementos, bem como alterações nos metabolismos da tireoide e testosterona dos cordeiros em ambos os tratamentos.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. spe, p. 260–268, 2008.
- AKASHA, M.; ANDERSON, R. R. Thyroxine and triiodothyronine in milk of cows, goats, sheep, and guinea pigs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 177, n. 2, p. 360–371, 1984.
- ALEXANDER, J. et al. Gossypol as undesirable substance in animal feed - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **EFSA Journal**, Parma, v. 7, n. 1, p. 908, 2009.
- ALFASSI, Z. B. Chemical analysis by nuclear methods: Introduction. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006. v. 72, p. A73.
- ALMEIDA JÚNIOR, G. A. de et al. Desempenho, características de carcaça e resultado econômico de cordeiros criados em creep feeding com silagem de grãos úmidos de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 1048–1059, 2004.
- ALMEIDA, F. A. C. et al. Development and evaluation of coring machine for processing cotton seeds. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 83, p. 607–614, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE ALGODÃO - ABRAPA. **Algodão no Brasil e no mundo**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br>>. Acesso em: 4 abr. 2017.
- ASSOCIAÇÃO MATO-GROSSENSE DOS PRODUTORES DE ALGODÃO - AMPA. **História do algodão**. Cuiabá, 2012. Disponível em: <[http://www.sincti.com/clientes/ampa/site/qs\\_historia.php](http://www.sincti.com/clientes/ampa/site/qs_historia.php)>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2010.
- ÁVILA, V. S. de et al. O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maris, v. 11, n. 11, p. 2419–2426, 2013.
- BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N. Quantu-design and development of a software package dedicated to k0-standardized NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 257, n. 3, p. 577–582, set. 2003.
- BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; de OLIVEIRA, H. Brazilian experience on k0 standardized neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 217–222, 2000.
- BÉCHET, D. Control of gene expression by steroid hormones. **Reproduction, Nutrition, Développement**, Paris, v. 26, n. 5A, p. 1025–1055, 1986.

BECKHOFF, B. et al. (Ed.). **Handbook of practical x-ray fluorescence analysis**. Berlin: Springer, 2006.

BENBOUZA, H. et al. Development of a visual method to quantify the gossypol content in cotton seeds. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1937–1942, 2002.

BERTIN, E. P. **Principles and practice of x-ray spectrometric analysis**. Boston, MA: Springer US, 1975.

BOTSOGLU, N. A. Determination of “free” gossypol in cottonseed and cottonseed meals by second-derivative ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 39, n. 3, p. 478–482, 1991.

BULLOCK, S. L. et al. Plasma gossypol dynamics in white-tailed deer: Implications for whole cottonseed as a supplemental feed. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 93, n. 2–3, p. 165–170, 2010.

CAMPOS, C.; PALANCH, A. Nutrição materna e programação fetal: o papel dos hábitos alimentares no desenvolvimento embrionário e pós-natal. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 17, n. 45, p. 49–59, 2017.

CHASE, C. C. et al. Growth and reproductive development in Brahman bulls fed diets containing gossypol. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 445–52, fev. 1994.

CHENOWETH, P. J. et al. Effects of dietary gossypol on aspects of semen quality, sperm morphology and sperm production in young Brahman bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 42, n. 1, p. 1–13, 1994.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Indicadores da Agropecuária. Observatório Agrícola**, Brasília, DF, v. 26, n. 6, p. 01-118 , 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_07\\_03\\_18\\_01\\_44\\_versao\\_final\\_junho\\_2017\\_\(internet\).pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_03_18_01_44_versao_final_junho_2017_(internet).pdf)>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Indicadores da Agropecuária. Observatório Agrícola**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 01–82, 2014. Disponível em : <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_01\\_31\\_12\\_02\\_04\\_conab\\_janeiro\\_versao\\_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_31_12_02_04_conab_janeiro_versao_final.pdf)>

COSTA, R. L. D. da. **Avaliação do peso e do retorno ao estro em ovelhas e do desempenho ponderal de cordeiros, em ovinos da raça Santa Inês, de acordo com o manejo de amamentação**. 2003. 87 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2003.

COSTA, S. R.; BUENO, M. G. **A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC**. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004. 144 p.

COUTINHO, E. M. Gossypol: A contraceptive for men. **Contraception**, Los Altos, v. 65, n. 4, p. 259–263, 2002.

COZZOLINO, S. M. F. Deficiências de minerais. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 21, n. 60, p. 119–126, 2007.

CUNHA, E. A. da et al. Santa Inês: uma boa alternativa para a produção intensiva de carne de cordeiros na região Sudeste. **O Berro**, Uberlândia, 2003. Disponível em: <http://www.revistaberro.com.br/?materias/ler,252>. Acesso em: 4 abr. 2017.

CUNHA, M. D. G. G. et al. Características quantitativas de carcaça de ovinos Santa Inês confinados alimentados com rações contendo diferentes níveis de caroço de algodão integral. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 6, p. 1112–1120, 2008.

DODOU, K. Investigations on gossypol: past and present developments. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 14, n. 11, p. 1419–1434, 2005.

DUARTE, M. S. et al. Effects of pregnancy and feeding level on carcass and meat quality traits of Nelore cows. **Meat Science**, Barking, v. 94, n. 1, p. 139–144, 2013.

EDWARDS, J. D. Total synthesis of gossypol. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 80, n. 14, p. 3798–3799, 1958.

ELIAS, C. **Amostragem sustentável de bromélias nativas para estudos ambientais em unidades de conservação**. 2008. 174 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ELIAS, C. et al. Instrumental neutron activation analysis of kilogram-sized samples of dog food. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 306, n. 3, p. 617–621, 2015.

EL-MOKADEM, M. Y. et al. Alleviation of reproductive toxicity of gossypol using selenium supplementation in rams<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 3274–3285, 2012.

FALCÃO, R. et al. Medições testiculares. **INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira**, v. SÉRIE TÉCNICA: GENÉTICA, p. 1–15, 2010. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/6377349-Medicoes-testiculares.html>>

FAO. **Food balance**. Rome, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 19 abr. 2017a.

FAO. **Production**. Rome, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 19 abr. 2017b.

FEITOSA, F. L. F. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 17–22, 1999.

GADELHA, I. C. N. et al. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 129–135, 2011.

GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol Toxicity from Cottonseed Products. **The Scientific World Journal**, Kaduna, Nigeria, v. 2014, p. 1–11, 2014.

GAMBOA, D. A. et al. Use of expander cottonseed meal in broiler diets formulated on a digestible amino acid basis. **Poultry Science**, Chamapign, v. 80, n. 6, p. 789–794, 2001.

GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under postmortem conditions. **Journal of Animal Science**, Champaing, v. 77, n. 10, p. 2685–2692, 1999.

GIL, S. et al. Selenium in bovine plasma, soil and forage measured by neutron activation analysis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horiaonte, v. 56, n. 2, p. 264–266, 2004.

GIZEJEWSKI, Z. et al. Cottonseed feeding delivers sufficient quantities of gossypol as a male deer contraceptive. **European Journal of Wildlife Research**, Berlin, v. 54, n. 3, p. 469–477, 2008.

GOMES, A. H. B. et al. Evaluation of hematological and biochemical parameters of bulls fed diets with different levels of free gossypol. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, n. 2, p. 161–180, 2014.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reproductive behavior. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Hoboken: Wiley Online Library, 2016. p. 291–306.

HAMIDATOU, L. et al. Concepts, instrumentation and techniques of neutron activation analysis. In: PESEK, K. (Ed.). **Imaging and radioanalytical techniques in interdisciplinary research** - Fundamentals and cutting edge applications. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 75–100.

HASCHKE, M. **Laboratory micro-x-ray fluorescence spectroscopy**: Instrumentation and applications. Cham: Springer International Publishing, 2014.

HASSAN, M. E. et al. Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, n. 6, p. 1171–1179, 2004.

IAEA. **Practical aspects of operating a Neutron Activation Analysis Laboratory**. Vienna, 1990. (TECDOC, 564).

INTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC: National Academies Press, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo agropecuário**. Tabelas. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9827-censo-agropecuario.html?&t=o-que-e>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

INJUK, J.; VAN GRIEKEN, R. Literature trends in x-ray emission spectrometry in the period 1990-2000-a review. **X-Ray Spectrometry**, Hoboken, v. 32, n. 1, p. 35–39, 2003.

IRVINE, D. S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, Colchester, UK, v. 1, n. 1, p. 6–12, 1996.

JERÔNIMO, J. F. et al. Qualidade da semente e fibra de algodão na caracterização do descaroçador de 25 serras. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 664–671, 2014.

JIMENEZ, C. et al. Hematological and parasitological responses of Santa Ines ewes fed whole cottonseed. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 19., 2016, Belém, PA. **Resumos...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2017. p. 6.

JÚNIOR, R. P. et al. Efeitos do gossipol em diferentes níveis na dieta de novilhas Nelore. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 120–126, 2016.

KANNGIESSE, B. Quantification procedures in micro X-ray fluorescence analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 609–614, 2003.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, Barking, v. 43, p. 193–201, 1996.

LEITÃO, R. et al. Study of response to zinc in human prostate spheroids using X-ray microfluorescence. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, New York, v. 64, n. 8, p. 2121–2126, 2015a.

LEITÃO, R. G. et al. Study of the differential response to zinc of prostate cell spheroids using the synchrotron radiation X-ray microfluorescence technique. **X-Ray Spectrometry**, Hoboken, v. 44, n. 4, p. 204–208, 2015b.

LIMA, P. de M. T. et al. Methane emission of Santa Inês sheep fed cottonseed by-products containing different levels of gossypol. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 46, n. 1, p. 285–288, 2014.

LIN, Y. C.; CHITCHAROENTHUM, M.; RIKIHISA, Y. Effect of gossypol on thyroid hormones in young female rats. **Contraception**, Los Altos, v. 41, n. 4, p. 431–440, 1990.

LINDSEY, T. O.; HAWKINS, G. E.; GUTHRIE, L. D. Physiological responses of lactating cows to gossypol from cottonseed meal rations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 63, n. 4, p. 562–73, 1980.

LOUVANDINI, H. et al. Desempenho, características de carcaça e constituintes corporais de ovinos Santa Inês alimentados com farelo de girassol em substituição ao farelo de soja na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 603–609, 2007.

MADRUGA, M. S. et al. Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4 suppl., p. 1838–1844, 2006.

MALHEIROS, M. A. da C.; HÖFLER, C. E.; PATIAS, J. Cadeia produtiva da ovinocultura: uma análise sob a ótica dos produtores. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 10, n. 2, p. 371-394, 2017.

MARTINS, E. C.; GARAGORRY, F. L.; FILHO, H. C. **Evolução da ovinocultura brasileira no período de 1975 a 2003**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2006. (Comunicado Técnico, 67).

MAZIÈRE, B. et al. Application of neutron activation analysis to the study of the variations of the concentration of trace elements in various organs of rat as a function of age. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 37, n. 2, p. 617–629, 1977.

MCDOWELL, L. R. Feeding minerals to cattle on pasture. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 3–4, p. 247–271, 1996.

MCMANUS, C. et al. Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 366–372, 2010.

MCMANUS, C. et al. Pecuária e mudanças climáticas. **Revista UFG**, Goiânia, v. 13, p. 73–82, 2012.

MENA, H. et al. The effects of feeding varying amounts of gossypol from whole cottonseed and cottonseed meal in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, n. 10, p. 2231–2239, 2004.

MONTOSSI, F. et al. Sustainable sheep production and consumer preference trends: compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. **Meat Science**, Barking, v. 95, n. 4, p. 772–789, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminates: sheep, goats, cervids and world camelids**. Washington, DC: The National Academy of Science Press, 2007.

NICODEMO, M. L. F.; SERENO, J. R. B.; AMARAL, T. B. **Minerais na eficiência reprodutiva de bovinos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. 68 p. (Documentos, 80).

OLDHAM, C. M. et al. The birthweight and survival of Merino lambs can be predicted from the profile of liveweight change of their mothers during pregnancy. **Animal Production Science**, Lancaster, v. 51, n. 9, p. 776-783, 2011.

PAIANO, D. et al. Farelo de algodão na alimentação de suínos (30 - 90 kg). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 15, n. 3, p. 790–800, 2014.

PAIM, T. P. et al. Impact of feeding cottonseed coproducts on reproductive system of male sheep. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 73, n. 6, p. 489–497, 2016.

PAIM, T. P. **Effect of feeding lambs with cottonseed co-products on reproductive system and meat quality**. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PAIM, T. P. et al. Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 13, p. 24–37, 2010.

PICKLER, A. et al. Quantitative analysis in femur of Wistar rats after chemotherapy treatment for breast cancer using synchrotron X-ray microfluorescence and microtomography. **X-Ray Spectrometry**, Hoboken, v. 44, n. 4, p. 305–310, 2015.

QIAN, S. Z.; WANG, Z. G. Gossypol: A potential antifertility agent for males. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 24, n. 2, p. 329–60, 1984.

RAMOS, A. K. D. M. et al. Avaliação dos parâmetros ecográficos de desenvolvimento gestacional de ovinos da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 3, p. 537–543, 2007.

RANDEL, R. D. et al. Effects of diets containing free gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function in Brangus heifers treated with bFSH. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, n. 5, p. 911–922, 1996.

RANDEL, R. D.; CHASE, C. C.; WYSE, S. J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1628, 1992.

RIKIHISA, Y.; LIN, Y. C. Effect of gossypol on the thyroid in young rats. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 100, n. 4, p. 411–417, 1989.

ROGERS, G. M.; POORE, M. H.; PASCHAL, J. C. Feeding cotton products to cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 267–294, 2002.

SANTOS, J. E. P. et al. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: effects on lactation performance and plasma gossypol. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, n. 6, p. 1491–501, 2002.

SANTOS, L. G. C. dos. **Supressão Compton na análise por ativação neutrônica instrumental de produtos agrícolas destinados à alimentação humana**. 2004. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SANTOS, L. G. C. dos. **Confiabilidade metrológica da determinação de elementos tóxicos e essenciais em leite bovino de raças exploradas no Brasil**. 2009. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SANTOS, L. G. C. dos et al. Macro, minor and trace elements in bovine milk from two Brazilian dairy regions. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 291, n. 1, p. 207–211, 2012.

SERPA, R. F. B. et al. Topographic trace-elemental analysis in the brain of Wistar rats by X-ray microfluorescence with Synchrotron Radiation. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 24, n. 7, p. 839–842, 2008.

SHANDILYA, L. et al. Effects of gossypol on reproductive and endocrine functions of male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 27, n. 1, p. 241–252, 1982.

SIEGEL, D. M. From X-rays to Quarks: modern physicists and their discoveries by Emilio Segrè. **Isis**, Utrecht, The Netherlands, v. 72, n. 3, p. 502, 1981.

SOUFIR, J. C. et al. Gossypol-induced modifications in the microenvironment of rat epididymal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 86, n. 2, p. 427–34, 1989.

TAHA, T. A. et al. Reproductive toxicological effects of gossypol on male rabbits: semen characteristics and hormonal levels. **Animal Science**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 259–269, 2006.

TANG, F.; WONG, P. Y. Serum potassium and aldosterone levels in gossypol-treated rats. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 149–153, 1984.

TIZIOTO, P. C. et al. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nelore cattle. **Meat Science**, Barking, v. 96, n. 1, p. 436–440, 2014.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, v. 4, n. 12, p. 1–9, 2008.

VIANA, J. G. A.; MORAES, M. R. E. de; DORNELES, J. P. Dinâmica das importações de carne ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 3, p. 2223–2234, 2015. Supl 1.

VIANA, P. G. et al. Gossypol was not detected in the longissimus muscle of lambs fed several forms of cottonseed. **Animal Production Science**, Lancaster, v. 55, n. 6, p. 812–817, 2015.

WANG, J. M. et al. Effect of gossypol on testicular blood flow and testosterone production in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 71, n. 1, p. 127–33, 1984.

WASIM, M.; ARIF, M.; IQBAL, M. S. Determination of elements in different parts of goat brain using k 0 instrumental neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 300, n. 1, p. 249–254, 2014.

WELLS, N.; HALLFORD, D.; HERNANDEZ, J. Serum thyroid hormones and reproductive characteristics of Rambouillet ewe lambs treated with propylthiouracil before puberty. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, n. 5–6, p. 1403–1413, 2003.

WILL, S. E. A. de L. et al. Trace element of bovine placenta: histological analysis and distribution maps using  $\mu$ SXRF. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, Badajoz, Spain, v. 2, p. 1039–1046, 2010.

WILLARD, S. T. et al. Effects of free gossypol in the diet of pregnant and postpartum Brahman cows on calf development and cow performance. **Journal of Animal Science**, Champaing, v. 73, n. 2, p. 496–507, 1995.

WU, S. Y. et al. Postnatal changes in lambs of two pathways for thyroxine 5'-monodeiodination in brown adipose tissue. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 261, n. 2, p. E257–E261, 1991.

XAVIER, G. D. C. et al. Suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 103–111, 2008.

YARNEY, T. A.; SANFORD, L. M. Pubertal development of ram lambs: reproductive hormone concentrations as indices of postpubertal reproductive function. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 70, n. 1, p. 139–147, 2011.

YU, Z.-H.; CHAN, H. C. Gossypol as a male antifertility agent - why studies should have been continued. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 2–7, 1998.

ZBIDAH, M. et al. Gossypol-induced suicidal erythrocyte death. **Toxicology**, Amsterdam, v. 302, n. 2–3, p. 101–105, 2012.

ZEN, S.; SANTOS, M. C.; MONTEIRO, C. M. **Ativos ovinos e caprinos: Evolução da caprino e ovinocultura**. Brasília, DF: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2014.

ZHANG, W. J. et al. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 111, n. 1–2, p. 1–9, 2007.