

NUTRIÇÃO DE BOVINOS

Conceitos Básicos e Aplicados

EDITORES:

Aristeu Mendes Peixoto
José Carlos de Moura
Vidal Pedroso de Faria

SÉRIE:

Atualização em
Zootecnia
Volume 7



1993

SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS

Aliomar Gabriel da Silva

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) foi trazida para o Brasil, pelos japoneses, há cerca de 80 anos, porém sua cultura manteve-se restrita e com pouco desenvolvimento, até o final da década de sessenta. A partir de então, o cultivo dessa leguminosa apresentou um crescimento fantástico, que veio colocar o Brasil, já no final da década de setenta, como o segundo maior exportador mundial de soja e seus derivados (112).

Com o crescimento da indústria moageira, a pecuária brasileira passou a contar com um valioso subproduto - o farelo de soja - para uso na alimentação animal. O farelo de soja é a fonte protéica básica usada no preparo de rações, principalmente para aves e suínos.

A soja e seus derivados também são usados na alimentação de bovinos leiteiros. Este é o tema deste artigo.

2. SOJA COMO FONTE DE NUTRIENTES

O grão de soja contém de 15 a 21% de óleo e de 36 a 40% de proteína, sendo, assim, uma excelente fonte de nutrientes, tanto para o homem como para os animais domésticos. A proteína da soja se apresenta entre as mais bem balanceadas em aminoácidos dentre as proteínas vegetais. O aminoácido limitante é a metionina, porém, os demais apresentam-se em proporções adequadas para a maioria das espécies domésticas (14).

Apesar de suas altas qualidades, a soja contém uma série de substâncias tóxicas, estimuladoras ou inibidoras de certas funções metabólicas. Ela contém pelo menos quatro proteínas que inibem a ação da tripsina e da quimotripsina. Estes fatores são conhecidos, genericamente, como fatores inibidores da tripsina ou, tomando-os como um todo, fator inibidor da tripsina. Possui também um componente bociogênico que, em caso de uso prolongado, pode levar ao aparecimento de bócio em alguns animais, principalmente naqueles recebendo rações de baixo teor de iodo. A soja também apresenta um estrogênio vegetal, a genisteína, que talvez possa ser o responsável, parcial, pelas propriedades estimulantes do crescimento observadas em alguns casos. Possui altos níveis de ácido fítico que, além de tornar o fósforo a ele ligado indisponível aos animais, pode induzir a baixa absorção de cálcio, ferro e zinco e algumas espécies (69, 98, 100). Possui ainda alguns fatores antigênicos que provocam reações alérgicas, carboidratos complexos que dificultam a digestibilidade de alguns nutrientes, além de fatores anticoagulantes (14, 57).

Os conhecimentos adquiridos, sobre estes fatores antinutricionais, permitem que os processos industriais, utilizados no preparo da soja para a alimentação, sejam capazes de inativar, se não todos, pelo menos os principais deles.

A soja é utilizada de diversas maneiras na alimentação animal.

O grão integral pode ser usado, com sucesso, desde que sofra um processo adequado de tratamento térmico e moagem. Nestas condições,

apresenta cerca de 38% de proteína bruta, 18% de gordura e 5% de fibra, sendo, portanto, além de fonte protéica, um alimento energético (14).

A industrialização da soja, para a obtenção de óleo, resulta num subproduto conhecido como farelo de soja. Os processos utilizados pela indústria moageira no Brasil são a prensagem mecânica, a extração contínua por solventes ou a pré-prensagem seguida pela extração por solventes (112). O processo de prensagem mecânica exige que a soja, depois de triturada, seja cozida durante 15 a 20 minutos e então prensada. Durante a prensagem a temperatura é elevada ainda mais, o que pode reduzir a digestibilidade e o valor biológico da proteína. Normalmente, exposição a aquecimento moderado, durante curto espaço de tempo, é utilizada para inativar alguns dos fatores antinutritivos existentes na soja, porém, quando o calor é excessivo ou prolongado, podem ocorrer reações químicas formando ligações entre glucose e alguns aminoácidos. Quando isso ocorre, estes aminoácidos tornam-se menos disponíveis para os animais já que, em muitos casos, estas ligações não podem ser hidrolisadas durante o processo digestivo. A maior preocupação é com a lisina, porém também pode haver alguma perda de arginina, histidina e triptofano. O solvente mais utilizado no processo de extração por solvente é o hexano. Este processo, normalmente ocorre a baixa temperatura, sendo que, após a evaporação do solvente, o farelo resultante deve ser tratado com calor para a inativação dos fatores prejudiciais. O terceiro processo utilizado é um misto dos dois primeiros. Inicialmente, o óleo é parcialmente removido através da prensagem e, então, o restante é removido com o uso de solventes (14). A modernização da indústria moageira, no Brasil, está levando ao aumento no uso do processo de pré-prensagem, seguida pela extração por solventes. Isto tem resultado num farelo de soja de padrão mais uniforme (112). O farelo de soja tem teor médio de proteína variando de 40 a 48%, com aminoácidos bem balanceados. É uma boa fonte de lisina e o tratamento por calor, usado para inibir ou inativar fatores tóxicos (57), também melhora a disponibilidade de seu mais limitante aminoácido, a metionina. Ele contém baixos teores de cálcio (0,2 a 0,3%) e de sódio (0,3 a 0,4%). Possui cerca de 0,6 a 0,7% de fósforo, dos quais cerca de 70% na forma de fitina. Além de reter o fósforo, a fitina interfere, diminuindo a absorção de cálcio, ferro e zinco (69, 76, 98, 100). O farelo de soja é uma boa fonte de potássio e de elementos traços. É deficiente em vitaminas lipossolúveis, porém, com exceção da vitamina B₁₂, é uma boa fonte de vitaminas do complexo B.

A farinha de soja é um material finamente pulverizado, obtido a partir do farelo de soja, através de um processo de peneiramento. É comumente usada como fonte protéica no preparo de sucedâneos do leite para bezerros.

A proteína concentrada de soja provém de tratamento especial, aplicado ao farelo de soja, visando remover constituintes não protéicos, solúveis em água.

3. SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE BEZERROS

Dentre os diversos produtos utilizados como fonte de proteína, na alimentação do bezerro leiteiro, a soja e seus subprodutos são os que têm mostrado resultados mais promissores. A proteína da soja tem substituído até cerca de 66% da proteína do leite contido nos sucedâneos do leite para bezerros, com relativo sucesso, no entanto, um longo trabalho de pesquisas e estudos se fez necessário para que esta tecnologia fosse desenvolvida. Apesar disto, muitas interrogações ainda existem sobre o assunto.

São quatro os principais subprodutos usados no preparo de sucedâneos do leite para bezerros. São eles: farelo de soja, farinha de soja, proteína concentrada de soja e proteína isolada de soja, que têm, respectivamente, 45, 60, 70 e 90% de proteína bruta e 45, 35, 25 e 5% de carboidratos (10).

Apesar da soja ser um dos poucos vegetais que contém proteína com composição de aminoácidos razoavelmente balanceada (72), os resultados obtidos com bezerros são, geralmente, inferiores àqueles obtidos com o uso do leite (9, 110). Menor ganho de peso, menor digestibilidade da matéria seca, da proteína e da gordura e menor absorção de minerais têm sido vinculados à maior participação da proteína de soja nos sucedâneos do leite para bezerros (67, 68, 70). Estes resultados negativos têm sido atribuídos à presença de inibidor ou inibidores da tripsina (43, 44), de carboidratos residuais como arabino-galactanas (de reação neutra) e polissacarídeos e arabinanas (de reação ácida) (50), e às globulinas antigênicas glicinina e beta-conglicinina (51, 53, 86), bem como a fator ou fatores ainda desconhecidos (40, 67).

O inibidor da tripsina (IT), presente na soja, foi um dos primeiros fatores responsabilizados pelo mau desempenho de bezerros recebendo sucedâneo contendo proteína de soja. GORRILL & THOMAS (43) relataram que o suco pancreático e o conteúdo intestinal de bezerros apresentavam menor atividade da tripsina e da quimotripsina, naqueles recebendo farinha de soja do que naqueles recebendo leite. Dietas contendo farinha de soja foram relacionadas com redução da secreção gástrica (111) e do tempo de retenção da proteína no abomaso (22, 88), o que resultou na diminuição da proteólise.

Tratamento ácido ou básico da farinha de soja tostada (22, 23, 24) ou extração com álcool (30, 68, 84, 85, 89), têm melhorado a sua qualidade. Tratamento termo-básico, usando baixa temperatura, tem inativado o IT mais eficientemente que tratamento termo-ácido (108).

A presença de carboidratos complexos em subprodutos da soja, principalmente no farelo e na farinha que têm 45 e 35% de carboidratos, respectivamente, talvez possa explicar alguns dos resultados negativos observados quando bezerros são alimentados com estes produtos. ROY et al. (76) concluíram que o efeito detratinal da farinha de soja poderia ser devido, além da presença de IT, à presença de fitina, de hamaglutininas e de grandes quantidades de oligossacarídeos, que, provavelmente, não são utilizados pelo bezerro. O desaparecimento de uma considerável quantidade de carboidratos existentes em fontes de proteína de soja, no intestino do bezerro, é, presumivelmente, devido à fermentação intestinal e não à sua absorção (48, 67, 68). A pré-digestão da farinha de soja não estimulou o crescimento de bezerros, apesar da extensiva degradação dos carboidratos existentes.

Algumas desordens observadas, em bezerros alimentados com proteína de soja, foram identificadas como reações alérgicas. Bezerros pré-ruminantes, recebendo farinha de soja pré-aquecida, produziram altos títulos, no soro, dos anticorpos IgG e IgE, específicos para as globulinas da soja, glicinina e beta-conglicinina (51, 52). BARRET et al. (5) descreveram um complemento fixador de IgG1, a precipitina, como o anticorpo predominante em bezerros recebendo proteína de soja extraída com álcool. O antígeno da soja mostrou-se resistente à proteólise e, em grau menor, à ação dos microorganismos presentes no fluido ruminal. Não foram observadas evidências do desenvolvimento de tolerância e bezerros

previamente sensibilizados responderam com aumento acentuado dos níveis de anticorpos. O isotiocianato de benzil, presente na soja, também foi identificado como proeminente causador de alergia (39).

A deterioração gradual da integridade das vilosidades intestinais foi observada, por SEEGRABER & MORRILL (81), em bezerros recebendo proteína de soja, porém uma tendência de reversão do processo ocorreu quando a dieta de leite foi substituída. KILSHAW & SLADE (53) descreveram uma atrofia parcial das vilosidades e aumento no comprimento das criptas intestinais e bezerros recebendo farinha de soja pré-aquecida. A primeira exposição à proteína da soja causou ligeiro encurtamento das vilosidades, porém, após massivas dosagens, os animais desenvolveram nítida anormalidade da mucosa e diarréia severa. Trabalhos conduzidos por SILVA (83) sugerem que os bezerros, com a idade de 2 semanas, são mais suscetíveis à atrofia das vilosidades, causada pela proteína da soja, do que quando mais velhos, sendo que estas respostas foram mais nítidas em bezerros que haviam sido previamente sensibilizados, através de sucessivas alimentações com proteína de soja. Além das anormalidades observadas nas vilosidades, esses animais mostraram crescimento lento, menor capacidade de absorção de nutrientes e maior velocidade de excreção da xilose da corrente sanguínea, quando este açúcar foi injetado por via jugular (84, 85). KILSHAW & SLADE (53) mostraram que sucessivos fornecimentos de farinha de soja pré-aquecida, para bezerros pré-ruminantes, causaram aumento progressivo na permeabilidade intestinal e no título de anticorpos (IgG, IgA e IgM) contra a proteína da soja, presente no soro sangüíneo.

O aminoácido da proteína da soja, limitante ao desenvolvimento de ratos, aves e suínos é a metionina. GORRILL & NICHOLSON (42) não encontraram melhoria, no crescimento ou na retenção de nitrogênio, em bezerros recebendo sucedâneo, contendo 70% de sua proteína proveniente da proteína concentrada de soja que havia sido suplementada com metionina. Contudo, PORTER & HILL (73) conseguiram melhor desenvolvimento de bezerros quando o teor de metionina, da proteína isolada de soja, foi elevado de 1,5 para 2,3g/100g de proteína. DONAHUE et al. (33) concluíram que o teor de metionina da proteína da soja limita a utilização do nitrogênio absorvido da dieta por bezerros desmamados cedo, recebendo ração inicial completa, peletada, baseada em milho e proteína de soja.

O nível máximo de substituição da proteína do leite pela da soja varia com o tipo de proteína da soja utilizada. GORRILL & THOMAS (43) relataram que a substituição de 86% da proteína do leite por proteína concentrada de soja resultou em ganhos de peso semelhantes aos observados em bezerros recebendo leite integral. GORRILL & NICHOLSON (42) concluíram que a proteína concentrada de soja poderia suprir até 70% da proteína do leite, na criação de bezerros. Em contraste, MORRILL et al. (64) concluíram que proteína concentrada de soja poderia substituir, com sucesso, 22%, mas não 44%, da proteína total dos sucedâneos. De GREGÓRIO et al. (30) não encontraram diferenças, em ganho de peso, entre bezerros recebendo sucedâneos com 66% da proteína do leite substituída por uma proteína de soja modificada (farinha de soja tratada com álcool e calor, sob pressão controlada) e bezerros recebendo sucedâneo com 100% da proteína proveniente proveniente do leite; contudo, SILVA (83) concluiu que a substituição de 66% da proteína do leite, presente no sucedâneo, por proteína de soja modificada, resultou em menores ganhos de peso, quando comparada com bezerros recebendo 100% da proteína do sucedâneo proveniente do leite. EZEQUIEL et al. (35) concluíram ser possível a substituição de até 20% do leite fornecido aos bezerros, com idade inferior a 2 meses, por leite de soja. A partir desta idade a substituição podia atingir gradativamente 40 a 60% do leite, apesar de ser observada queda no desempenho dos animais recebendo os níveis mais altos de leite de soja.

4. SOJA NA ALIMENTAÇÃO DA VACA

Dentre a soja e seus derivados, o farelo é o produto mais utilizado na alimentação da vaca leiteira. A razão disto está no seu alto teor de proteínas, de boa qualidade, custo relativamente baixo e boa aceitação pelo animal. Produções diárias de 30 a 35kg de leite têm sido alcançadas com vacas recebendo dietas nas quais o farelo de soja fornecia a maior parte da proteína (55, 78, 79).

A alta degradabilidade da proteína da soja, que ocorre ao nível do rúmen (16, 96), conduziu a estudos visando aumentar a quantidade desta proteína alcançando o intestino delgado e, desta maneira, aumentar a produção de leite. A digestão da proteína, no rúmen, é menos eficiente do que a digestão pós-ruminal, porque parte do nitrogênio protéico é perdido

como amônia. A amônia é transformada em uréia no fígado, sendo que, parte dela, é subsequentemente eliminada na urina (29). Por outro lado, a infusão pós-ruminal de proteínas tem resultado em aumento na produção e no teor de proteína do leite, bem como na eficiência da utilização do nitrogênio (19, 75, 94, 105). Diversos tipos de tratamentos têm sido utilizados visando diminuir a degradabilidade da proteína da soja, ao nível do rúmen. Tratamentos, físicos ou químicos, têm levado a resultados que mostram ser possível atingir este objetivo.

DEVENPORT et al. (32) concluíram que o aquecimento da soja, durante o processo normal de extração de óleo, foi suficiente para diminuir a degradação da proteína no rúmen, ao compararem o farelo de soja com a soja em grão. No entanto, existem diferenças entre farelos produzidos por diferentes processos de extração do óleo. Farelo, obtido pelo processo de prensagem mecânica, foi mais resistente à degradação no rúmen do que aquele obtido pelo processo de extração por solventes (21).

Suplementação de dietas de ruminantes com niacina tem sido considerada desnecessária devido à habilidade das bactérias do rúmen para sintetizarem este aminoácido. No entanto vários autores (74, 80, 82) têm mostrado aumento, "in vitro", da síntese de proteína, pela suplementação com niacina. DENNIS et al. (31) relataram que o fluido ruminal de bovinos recebendo farelo de soja, tratado com calor, continha menos protozoários ciliados do que o de animais recebendo farelo de soja normal. A suplementação com niacina, do farelo de soja tratado termicamente, aumentou o número de protozoários. A síntese da proteína, no rúmen (4), foi menor em bovinos recebendo farelo de soja aquecido do que naqueles recebendo farelo de soja normal. A suplementação deste farelo com niacina aumentou a síntese de proteína, porém (45) este aumento não foi devido ao aumento da quantidade de proteína bacteriana.

Vacas de alta produção requerem mais proteína do que o rúmen é capaz de produzir (12). Isto é especialmente verdadeiro durante a fase inicial da lactação, quando as vacas atingem o pico de produção, o que ocorre entre a sexta e oitava semana após o parto, enquanto que a ingestão máxima de alimento só ocorre entre a décima e décima quarta semana (1, 17). Normalmente alguma proteína escapa ao processo de degradação no rúmen, porém, para atingir os requerimentos de proteínas das altas produtoras, é vantajoso o fornecimento, na dieta, de alguma proteína não

degradável (17). O tratamento térmico do fareo de soja diminui a solubilidade da proteína e sua taxa de degradação no rúmen (56), o que pode resultar no aumento da quantidade de proteína que atinge o duodeno. KUNG et al. (56) demonstraram que o farelo de soja, tratado com calor, é menos degradável no rúmen do que o farelo de soja comum. SAHLU et al. (78) demonstraram que vacas de alta produção, recebendo farelo de soja extrudado ou farelo de soja tratado com calor, produziram mais leite do que vacas que recebiam farelo de soja comum; no entanto, vacas produzindo menos de 30kg de leite por dia não responderam aos tratamentos contendo proteína tratada com calor. As baixas produtoras podem não ter respondido ao farelo de soja, tratado termicamente, porque seus requerimentos protéicos poderiam estar sendo supridos através da síntese de proteína microbiana, acrescida da proteína proveniente do farelo de soja comum que ultrapassa normalmente o rúmen (17).

REUGREGGER et al. (77) observaram aumento na produção de leite por altas produtoras durante a fase inicial da lactação, quando foram alimentadas com soja integral tratada com calor em comparação com rações controle contendo soja integral não tratada. SCHINGOETHE et al. (79) concluíram que a produção de vacas, no início da lactação, aumentou pela suplementação da dieta com farelo de soja contendo metionina, protegida da degradação no rúmen, ou pela substituição do farelo de soja comum por farelo de soja aquecido ou extrudado. A suplementação, com metionina, dos farelos tratados termicamente, não resultou em aumento significativo da produção de leite (106, 79) nem afetou significativamente, o pH do rúmen e os teores de ácidos graxos voláteis, amônia e uréia no soro (77). KUNG & HUBBER (55) conseguiram aumentos de 1,2kg de leite por dia, usando farelo de soja tratado com calor. Outros autores não obtiveram respostas ou as respostas foram pequenas, quando usaram vacas na fase final da lactação (66, 71).

Os métodos de tratamento, pelo calor, do grão ou do farclo de soja, são variados. Existem desde aqueles nos quais o produto sofre o aquecimento normalmente observado nos processos de extração do óleo em que resultam na diminuição da degradação da proteína em nível de rúmen (32), até aqueles em que o produto é tostado a temperaturas de 128 a 149°C (71, 41) ou, ainda, cozidos a 144°C (99).

A última década tem sido pródiga em trabalhos visando diminuir a degradabilidade da proteína no rúmen, pelo uso de tratamento com formaldeído. Apesar dos resultados positivos alcançados com ovinos (37) e com ruminantes em crescimento (15, 36, 91, 92, 93, 97, 99), os resultados, para a produção de leite, não têm se mostrado consistentes (8, 18, 37, 45, 48, 61, 103, 106).

É interessante observar que o tratamento, com formaldeído, foi efetivo na preservação do perfil original dos aminoácidos do farelo de soja, enquanto que o tratamento pelo calor proporcionou pouca ou nenhuma proteção contra a mudança do perfil dos aminoácidos devido à ação do rúmen (27). No entanto, alguns autores (28, 38, 61) sugerem que a proteção da proteína do farelo de soja, pelo formaldeído, tem apenas benefício marginal para animais com relativamente altas taxas de ingestão e altas taxas de passagem. Além desta, outras razões são apresentadas para a falta de aumento da produção de vacas leiteiras devido ao tratamento da proteína com formaldeído. São elas (13, 26): a) a produção não está sendo limitada pela absorção de aminoácidos; b) o tratamento resultou em proteína de baixo valor biológico; c) a proteína é protegida inadequadamente; d) a proteína é excessivamente protegida e e) ocorre diminuição da proteína microbiana no rúmen.

A extrusão, processo em que o grão é expandido pelo calor e pressão, tem sido utilizada visando aumentar a quantidade de proteína não degradável no rúmen (2, 6, 87, 96). STERN et al. (96) concluíram que a extrusão da soja integral, a 149°C, diminuiu a degradação da proteína no rúmen e aumentou o fluxo de aminoácidos no duodeno. O tratamento não diminuiu a digestão da proteína no intestino delgado, mas, pelo contrário, aumentou-a, provavelmente pela desnaturação do inibidor da tripsina. A absorção de aminoácidos foi maior na soja extrudada do que na soja crua ou no farelo de soja. Existem trabalhos (6, 79, 87) indicando que a soja extrudada aumenta a produção de leite das vacas com ela alimentadas. No entanto, outros trabalhos (2) não consideraram vantajoso o processo de extrusão para a produção leiteira, mesmo quando a soja extrudada foi suplementada com metionina (11), ou fornecida misturada com glúten de milho (3) ou semente de girassol (34).

Além dos métodos mencionados, outros têm sido utilizados visando diminuir a degradabilidade da proteína da soja no rúmen e aumentar a

quantidade de aminoácidos disponíveis no duodeno. Tratamentos ácidos e alcalinos (7, 90, 109), ou utilizando álcoois (58, 59, 60, 101, 102, 103), lingosulfonato de cálcio (113, 114) e óleos (63, 95), ou ainda, processos de caramelização com uso de açúcares redutores (20), têm mostrado algum potencial; no entanto, os resultados ainda são preliminares.

5. CONCLUSÕES

A) A soja e seus derivados, são boas fontes de proteínas para a alimentação do gado leiteiro.

B) A proteína da soja pode substituir até 2/3 da proteína do leite usada no preparo de sucedâneos para bezerros. Esta proteína deverá ter seus princípios tóxicos inativados previamente, para que eles possam apresentar desempenho aceitável.

C) O farelo de soja apresenta alto teor de proteína de boa qualidade, de custo relativamente baixo, e é bem aceito pelos animais. Devido a estas características, é o suplemento protéico mais utilizado na alimentação de vacas leiteiras.

D) A redução da degradabilidade da soja no rúmen e o aumento da disponibilidade de aminoácidos no intestino delgado mostraram-se efetivos no aumento da produção leiteira, em vacas de altas produções, principalmente durante as primeiras 6 a 8 semanas de lactação.

E) Tratamentos, tanto físicos como químicos, têm sido usados, visando diminuir a degradabilidade da proteína da soja no rúmen e aumentar a disponibilidade de aminoácidos no intestino delgado.

F) Os diversos tratamentos térmicos, entre os tratamentos físicos, e os tratamentos com formaldeído, entre os químicos, são os que melhores resultados têm apresentado.

G) Outros tratamentos, como aqueles utilizando álcoois, ácidos, bases etc. têm sido estudados, porém os resultados são, ainda, preliminares.

6. REFERÉNCIAS

1. AHRAR, M. & D.J. SCHINGOETHE, 1979. Heat-treated soybean meal as a protein supplement for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 62: 932.
2. ANDERSON, M.J.; Y.E.M. OBADIAH; R.L. BOWAN; J.L. WALTERS, 1983. Comparison of whole cottonseed, extruded soybeans, or whole sunflower seeds for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 67: 569.
3. ANNEXSTAD, R.J.; M.D. STERN; D.E. OTTERBY; J.G. LINN; W.P. HANSEN, 1987. Extruded soybeans and corn gluten meal as supplemental protein sources for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 70: 814.
4. ARAMBEL, M.J.; S.M. DENNIS; D.D. RIDDELL; E.E. BARTLEY; J.L. CAMAC; A.D. DAYTON, 1982. Effect of heat treated soybean meal with and without niacin on rumen fermentation. *J. Animal Sci.*, 55(Suppl. 1): 405.
5. BARRATT, M.E.J.; P.J. STRACHAN; P. POTER, 1978. Antibody mechanisms implicated in digestive disturbances following ingestion of soya protein in calves and piglets. *Clin. Exp. Immunol.*, 31: 305.
6. BLOCK, E.; L.D. MULLER; L.C. GRIEL Jr.; D.L. GARWOOD, 1981. Brown mibrid-3 and heat extruded soybeans for early lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 64: 1813.
7. BOWMAN, J.M.; D.G. GRIEVE; J.G. BUCHANAN-SMITH; G.K. MacLEOD, 1988. Response of dairy cows in early lactation to sodium hydroxide-treated soybean meal. *J. Dairy Sci.*, 71: 982.
8. BRODERICK, G.A. & G.T. LANE, 1978. Lactational, in vitro and chemical evaluation of untreated and formaldehyde-treated casein supplements. *J. Dairy Sci.*, 61: 932.
9. CAMPOS, O.F., 1982. Spray-dried fish solubles, soy protein concentrate and limestone in milk replacers for young calves. East Lansing, Michigan State Univ. Tese Ph.D.
10. CAMPOS, O.F. & A.G. SILVA, 1986. Fontes alternativas de proteína no sucedâneo do leite para bezerros: Revisão da literatura. *Pesq. Agropec. Bras.*, 21: 1089.
11. GASPER, D.P.; D.J. SCHINGOETHE; C.M.J. YANG; C.R. MULLER, 1987. Protected methionine supplementation with extruded blend of soybeans and soybean meal for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 70: 321.
12. CEZERKAWSKI, J.W., 1978. Reassessment of efficiency of synthesis of microbial matter in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 61: 1261.
13. CHALUPA, W., 1984. Discussion of protein symposium. *J. Dairy Sci.*, 67: 1134.

14. CHURCH, D.C., 1984. *Livestock Feeds and Feeding*. O & B Books, Inc. Corvallis, Oregon.
15. CLARK, J.H., 1975. Nitrogen metabolism in ruminants: Protein solubility and rumen bypass of protein amino acids. Page 261 in Part 2, *Protein nutritional quality of food and feeds*. Vol. 1. Mendel Friedman, ed., Marcell Dekker, Inc. New York, N.Y.
16. CLARK, J.H. & B.A. COOKER, 1979. The effects of protein solubility on ruminal protein degradation. Page 1 in Proc. and Events Bookside Farms Lab. Assoc. Inc. Annu. Jamboree and Conference.
17. CLARK, J.H. & C.L. DAVIS, 1980. Some aspects of feeding high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 63: 873.
18. CLARK, J.H.; C.L. DAVIS; J.A. ROGERS, 1981. Manipulation of rumen fermentation and its effects on performance of ruminants Page 18 in Proc. 4th Semiannual Mtg. Am. Feed Manuf. Assoc. Counc. Am. Feed Manuf. Assoc., Arlington, V.A.
19. CLARK, J.H.; H.R. SPIRES; R.G. DERRIG; M.R. BENNINK, 1977. Milk production, nitrogen utilization and glucose synthesis in lactating cows infused postruminally with sodium caseinate and glucose. *J. Nutr.*, 107: 631.
20. CLEALE IV, R.M.; T.J. KLOPFENSTEIN; R.A. BRITTON; L.D. SATTERLEE; S.R. LOWRY, 1987. Induced non-enzymatic browning of soybean meal. III. Digestibility and efficiency of protein utilization by ruminants of soybean meal treated with xylose or glucose. *J. Animal Sci.*, 65: 1327.
21. COENEN, D.J. & A. TRENKLE, 1989. Comparisons of expeller-processed and solvent-extracted soybean meals as protein supplements for cattle. *J. Animal Sci.*, 67: 565.
22. COLVIN, B.M.; R.A. LOWE; H.A. RAMSEY, 1969. Passage of digesta from the abomasum of a calf fed soy flour milk replacer and whole milk. *J. Dairy Sci.*, 52: 687.
23. COLVIN, B.M. & H.A. RAMSEY, 1968. Soy flour in milk replacers for young calves. *J. Dairy Sci.*, 51: 898.
24. COLVIN, B.M. & H.A. RAMSEY, 1969. Growth of young calves and rats fed soy flour treated with acid or alkali. *J. Dairy Sci.*, 52: 270.
25. CROOKER, B.A.; J.H. CLARK; R.D. SHANKS, 1983. Effects of formaldehyde treated soybean meal on milk yield, milk composition, and nutrient digestibility in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 66: 492.
26. CROOKER, B.A.; J.H. CLARK; R.D. SHANKS, 1983. Effects of formaldehyde treated soybean meal on milk yield, milk composition, and nutrient digestibility in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 66: 492.

27. CROOKER, B.A.; J.H. CLARK; R.D. SHANKS; E.E. HATFIELD, 1986. Effect of ruminal exposure on the amino acid profile of heated and formaldehyde-treated soybean meal. *J. Dairy Sci.*, **69**: 2648.
28. CRAWFORD Jr, R.J. & W.H. HOOVER, 1984. Effects of particle size and formaldehyde treatment of soybean meal on milk production and composition for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **67**: 1945.
29. CUTHERBERTSON, D.P. & M.I. CHAMBERS, 1950. Utilization of a casein supplement administered to ewes by ruminal and duodenal fistulae. *Biochem.*, **46**: 17.
30. DE GREGORIO, R.M.; G.W. BARR; N. STAHEL; F.M. CRANE, 1982. Modified soy protein as a protein source in calf milk replacer. *J. Dairy Sci.*, **65** (Suppl. 1): 123.
31. DENNIS, S.M.; M.J. ARAMBEL; E.E. BARTLEY; D.O. RIDDELL; A.D. DAYTON, 1982. Effect of heated or unheated soybean meal with or without niacin on rumen. *J. Dairy Sci.*, **65**: 1643.
32. DEVENPORT, G.M.; J.A. BOLING; N. GAY; L.D. BUNTING, 1987. Effect of soybean lipid on growth and ruminal nitrogen metabolism in cattle fed soybean meal or ground whole soybeans. *J. Anim. Sci.*, **65**: 1680.
33. DONAHUE, P.B.; C.G. SCHWAB; J.D. QUIGLEY III; W.E. HYLTON, 1985. Methionine deficiency in early-weaned dairy calves fed pelleted rations based on corn and alfalfa or corn and soybean protein. *J. Dairy Sci.*, **68**: 681.
34. DRACKLEY, J.K. & D.J. SCHINGOETHE, 1986. Extruded blend of soybean meal and sunflower seeds for dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **69**: 371.
35. EZEQUIEL, J.M.B.; V.R. HERLINGS; W.A. ARAÚJO, 1988. Digestibilidade de rações fornecidas à bezerros Jersey desalcitados precocemente recebendo leite de soja. *Rev. Soc. Bras. Zootecnia*, **17**: 372.
36. FAICHNEY, G.J., 1971. The effect of formaldehyde treated casein on the growth of ruminant lambs. *Australian J. Agric. Res.*, **22**: 453.
37. FERGUSON, K.A., 1975. The protection of dietary proteins and amino acids against microbial fermentation in the rumen. Pg. 448 in *Digestion and metabolism in the ruminant*. I.W. McDONALD and A.C.I. WARNER, ed. New England Publ. Unit. Armidale, Australia.
38. FOLMAN, Y.; H. NEUMARK; M. KAIM; W. KAUFMANN, 1981. Performance, rumen and blood metabolites in high-yielding cows fed varying protein percents and protected soybean. *J. Dairy Sci.*, **64**: 759.
39. GARDNER, R.W.; D.L. MARTIN; D.J. WEBER, 1982. Allergenicity of soybean milk replacers fed to calves. *J. Dairy Sci.*, **65** (Suppl. 1): 122.

40. GERTLER, A. & Z. NITSAN, 1970. The effect of trypsin inhibitors upon the pancreato peptidase E, trypsin, chymotrypsin and amylase in the pancreas and intestinal tract of chicks, as compared to raw and heated soybean diets. *Br. J. Nutr.*, **24**: 893.
41. GLIMP, H.A.; M.R. KARR; C.D. LITTLE; P.G. WOOLFOLK; G.E. MICHELL Jr.; L.W. HUDSON, 1967. Effect of reducing soybean protein solubility by dry heat on the protein utilization of young lambs. *J. Animal Sci.*, **26**: 858.
42. GORRILL, A.D.L. & J.W.G. NICHOLSON, 1969. Growth, digestibility and nitrogen retention by calves fed milk replacers containing milk and soybean proteins, supplemented with methionine. *Can. J. Animal Sci.*, **49**: 315.
43. GORRILL, A.D.L. & J.W. THOMAS, 1967. Proteolytic activity of the bovine pancreas. *J. Animal Sci.*, **24**: 882.
44. GORRILL, A.D.L.; J.W. THOMAS; W.E. STEWART; J.L. MORRILL, 1967. Exocrine pancreatic secretion by calves fed soybean and milk protein diets. *J. Nutr.*, **92**: 86.
45. HANNAAH, S.M. & M.D. STERN, 1985. Effect of supplemental niacin or nacinamide and soybean source on ruminal bacterial fermentation in continuous culture. *J. Animal Sci.*, **61**: 1253.
46. HUTJENS, M.F. & L.H. SCHULTZ, 1971. Effect of feeding soybeans or formaldehyde treated soybeans on lipid metabolism in ruminants. *J. Dairy Sci.*, **54**: 1876.
47. HILG, D.J.; J.L. SOMMERFELDT; D.J. SCHINGOETHE, 1987. Lactational and systemic responses to the supplementation of protected methionine in soybean meal diets. *J. Dairy Sci.*, **70**: 620.
48. KAKADE, M.L.; R.M. THOMPSON; W.E. ENGELSTAD; C.G. BEHRENS; R.D. YODER; F.M. CRANE, 1976. Failure of soybean trypsin inhibitor to exert deleterious effect in calves. *J. Dairy Sci.*, **59**: 1484.
49. KELLAWAY, R.C.; S.S.E. RANAWANA; J.H. BUCKNAN; L.D. SMART, 1974. The effect of nitrogen source in the diet on milk production and amino acid uptake by the udder. *J. Dairy Res.*, **41**: 305.
50. KELLOR, R.L. Defatted soy flour and grits. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**: 77A.
51. KILSHAW, P.J. & J.W. SISSONS, 1979. Gastrointestinal allergy to soybean protein in preruminant calves; allergenic constituents of soybean products. *Res. Vet. Sci.*, **27**: 366.
52. KILSHAW, P.J. & J.W. SISSONS, 1979. Gastrointestinal allergy to soybean protein in preruminant calves; antibody production and digestive disturbances in calves fed soybean flour. *Res. Vet. Sci.*, **27**: 361.

53. KILSHAW, P.J. & H. SLADE, 1980. Passage of ingested protein into the blood during gastrointestinal hypersensitivity reactions; experiments in the preruminant calf. *Clin. Exp. Immunol.*, 41: 575.
54. KILSHAW, P.J. & H. SLADE, 1982. Villus atrophy and crypt elongation in the small intestine of preruminant calves fed with heated soybean flour or wheat gluten. *Res. Vet. Sci.*, 33: 305.
55. KUNG Jr., L. & J.T. HUBER, 1983. Performance of high producing cows in early lactation fed protein of varying amounts, sources, and degradability. *J. Dairy Sci.*, 66: 227.
56. KUNG Jr., L.; J.T. HUBER; L.D. SATTER, 1983. Influence of non protein nitrogen and protein of low rumen degradability on nitrogen flow utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 66: 1863.
57. LASSITER, J.W. & H.M. EDWARDS Jr., 1982. Animal Nutrition. Reston Publishing Company, Inc. Reston, Virginia.
58. LYNCH, G.L.; L.L. BERGER; G.C. FAHEY Jr., 1987. Effects of ethanol, heat, and lipid treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. *J. Dairy Sci.*, 70: 91.
59. LYNCH, G.L.; L.L. BERGER; N.R. MERCHEN; G.C. FAHEY Jr.; E.C. BAKER, 1987. Effects of ethanol and heat treatments of soybean meal and infusion of sodium chloride into the rumen on ruminal degradation and escape of soluble and total soybean meal protein in steers. *J. Animal Sci.*, 65: 1617.
60. LYNCH, G.L.; P.L. VAN DER AAR; L.L. BERGER; C.G. FAHEY Jr.; N.R. MERCHEN, 1988. Proteolysis of alcohol-treated soybean meal proteins by *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, pepsin, trypsin, and in the rumen of steers. *J. Dairy Sci.*, 71: 2416.
61. LUNDQUIST, R.G.; D.E. OTTERBY; J.G. LINN, 1986. Influence of formaldehyde-treated soybean meal on milk production.
62. MADSEN, J., 1982. The effect of formaldehyde-treated protein and urea on milk yield and composition in dairy cows. *Acta Agric. Scand.*, 32: 389.
63. MOHAMED, O.E.; L.D. SATTER; R.R. GUIMMER; F.R. EHLE, 1988. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. *J. Dairy Sci.*, 71: 2677.
64. MORRILL, J.L.; S.L. MELTON; A.D. DAYTON; E.J. GUY; M.J. PALLANSCH, 1971. Evaluation on milk replacers containing a soy protein concentrate and high whey. *J. Dairy Sci.*, 54: 1060.

65. MULLER, L.D.; D. RODRIGUEZ, D.J. SCHINGOETHE, 1975. Formaldehyde treated whey protein concentrate for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 58: 1847.
66. NETEMEYER, D.T.; L.J. BUSH; J.W. WARD; S.A. JAFRI, 1982. Effect of heating soybean meal for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 65: 235.
67. NITSAN, Z.R.; R. VOLCANI; S. GORDIN; A. HASDAI, 1971. Growth and nutrient utilization by calves fed milk replacers containing milk or soybean protein concentrate toasted to various degrees. *J. Dairy Sci.*, 54: 1294.
68. NITSAN, Z.R.; R. VOLCANI; A. HASDAI; S. GORDIN, 1972. Soybean protein substitute for milk protein in milk replacers for suckling calves. *J. Dairy Sci.*, 55: 811.
69. O'DELL, B.L., 1969. Effect of dietary components upon zinc availability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 22: 1315.
70. PEJIC, N. & M. KAY, 1979. Soya flour in milk replacers for young calves. *Anim. Prod.*, 28: 115.
71. PLEGGEE, S.D.; L.K. BERGER, G.C. FAHEY Jr, 1982. Effect of roasting on utilization of soybean meal by ruminant. *J. Animal Sci.*, 55: 395.
72. PORTER, J.W.G., 1969. Digestion in the preruminant animal. *Proc. Nutr. Sci.*, 28: 115.
73. PORTER, J.W.G. & W.B. HILL, 1964. Nitrogen balance trials with calves given synthetic milk diets. In: National Institute of Research on Dairying. Annual Report, Rearing.
74. RIDDELL, D.O.; E.E. BARTLEY; A.D. DAYTON, 1980. Effect of nicotinic acid on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Dairy Sci.*, 63: 1429.
75. ROGERS, J.A.; J.H. CLARK; T.R. DRENDEL; G.C. FAHEY Jr., 1984. Milk production and nitrogen utilization by dairy cows infused postruminally with sodium caseinate, soybean meal, or cottonseed meal. *J. Dairy Sci.*, 67: 1928.
76. ROY, J.H.B.; I.J.F. STOBO; S.M. SHOTTON; P. GANDERTON; C.M. GILLIES, 1977. The nutritive value of non-milk proteins for the pre-ruminating calf, the effect of replacement of milk protein by soya-bean or fish-protein concentrate. *Br. J. Nutr.*, 38: 167.
77. RUEGSEGGER, G.J.; L.H. SCHULTZ; D. SOMMER, 1983. Response of dairy cows in early lactation to the feeding of heat-treated whole soybeans. *J. Dairy Sci.*, 66(Suppl. 1): 168.
78. SAHLU, T.; D.J. SCHINGOETHE; A.K. CLARK, 1984. Lactational and chemical evaluation of soybean meal heat-treated by two methods. *J. Dairy Sci.*, 67: 1725.

79. SCHINGOETHE, D.J.; D.P. CASPER; C. YANG; D.J. ILLG; J.L. SOMMERFELDT; C.R. MUELLER. 1988. Lactational response to soybean meal, heated soybean meal, and extruded soybeans with ruminally protected methionine. *J. Dairy Sci.*, 71: 173.
80. SCHUSSLER, S.L.; G.C. FAHEY Jr.; J.B. ROBINSON; S.S. MASTERS; S.C. COERCH; J.W. SPEARS, 1978. The effect of supplemental niacin on in vitro cellulose digestion and protein synthesis. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 48: 359.
81. SEEGRABER, F.J. & J.L. MORRILL, 1982. Effect of soy protein on calves intestinal absorptive ability and morphology determined by scanning electron microscopy. *J. Dairy Sci.*, 65: 1962.
82. SHIELDS, D.R.; D.M. SCHAEFER; T.W. PERRY, 1983. Influence of niacin supplementation and nitrogen source on rumen microbial fermentation. *J. Animal Sci.*, 57: 1576.
83. SILVA, A.G., 1984. Factors affecting utilization of soybean proteins included in milk replacers for young calves. East Lansing, Michigan State Univ. Tese Ph.D.
84. SILVA, A.G.; J.T. HUBER; R.M. DeGREGORIO, 1986. Influence of substituting two types of soybean protein for milk protein on gains and utilization of milk replacers in calves. *J. Dairy Sci.*, 69: 172.
85. SILVA, A.G.; J.T. HUBER; T.H. HERDT; R. HOLLAND; R.M. DeGREGORIO; T.P. MULLANEY, 1986. Morphological alterations of small intestinal epithelium of calves caused by feeding soybean protein. *J. Dairy Sci.*, 69: 1387.
86. SISSONS, J.W. & R.H. SMITH. 1976. The effect of different diets including those containing soya-bean products, on digesta movement and water and nitrogen absorption in the small intestine of the pre-ruminant calf. *Br. J. Nutr.*, 36: 421.
87. SMITH, N.E.; K.S. COLLAR; D.L. BATH; W.L. DUNKLEY; A.A. FRANKE, 1980. Whole cotton seeds and extruded soybeans for cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 63 (Suppl. 1): 153.
88. SMITH, R.H.; W.B. HILL; J.W. SISSONS, 1970. The effect of diets containing soya products on the passage of digesta through the alimentary tract of the preruminant calf. *Proc. Nutr. Soc.*, 29: 2A.
89. SMITH, R.H. & J.W. SISSONS, 1975. The effect of different feeds, including those containing soya-bean products, on the passage of digesta from the abomasum of the preruminant calf. *Br. J. Nutr.*, 33: 329.
90. SOOFI, R.; G.C. FAHEY Jr.; L.L. BERGER, 1982. In situ and in vivo digestibilities and nutrient intakes by sheep of alkali-treated soybean stover. *J. Animal Sci.*, 55: 1206.

91. SPEARS, J.W.; J.H. CLARK; E.E. HATFIELD, 1979. Nitrogen utilization by steers fed formaldehyde treated soybean meal. *J. Animal Sci.*, **48** (Suppl. 1): 407.
92. SPEARS, S.W.; J.H. CLARK; E.E. HATFIELD, 1985. Nitrogen utilization and ruminal fermentation in steers fed soybean meal treated with formaldehyde. *J. Animal Sci.*, **60**: 1072.
93. SPEARS, J.W.; E.E. HATFIELD; J.H. CLARK, 1980. Influence of formaldehyde treatment of soybean meal on performance of growing steers and protein availability in the chick. *J. Animal Sci.*, **50**: 750.
94. SPIRES, H.R.; J.H. CLARK; R.G. DERRYL; C.L. DAVIS, 1975. Milk and production nitrogen utilization in response to postruminal infusion of sodium caseinate in lactating cows. *J. Nutr.*, **195**: 1111.
95. STEELE, W., 1984. High-oil, high-protein diets and milk secretion by cows. *J. Dairy Sci.*, **68**: 1409.
96. STERN, M.D.; K.A. SANTOS; L.D. SATTER, 1985. Protein degradation in rumen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cattle fed heat-treated whole soybeans. *J. Dairy Sci.*, **68**: 45.
97. TAMMINGA, S., 1979. Protein degradation in the forestomach of ruminants. *J. Animal Sci.*, **49**: 1615.
98. TAYLOR, T.G., 1979. The availability of the calcium and phosphorus of plant material for animals. *Proc. Nutr. Soc.*, **24**: 105.
99. THOMAS, E.; A. TRENKLE; W. BURROUGHS, 1979. Evaluation of protective agents applied to soybean meal and fed to cattle. II. Feedlot trials. *J. Animal Sci.*, **49**: 1347.
100. THOMPSON, D.B. & J.W. ERDMAN Jr, 1984. The effect of soy protein isolate in the diet on retention by the rat of iron from radiolabeled test meals. *J. Nutr.*, **114**: 307.
101. VAN DER AAR, P.J.; L.L. BERGER; G.C. FAHEY Jr., 1982. The effect of alcohol treatments on solubility and in vitro and in situ digestibilities of soybean meal protein. *J. Animal Sci.*, **55**: 1179.
102. VAN DER AAR, P.J.; L.L. BERGER; G.C. FAHEY Jr.; N.R. MERCHEN, 1984. Effect of alcohol treatments of soybean meal on ruminal escape of soybean meal protein. *J. Animal Sci.*, **59**: 483.
103. VAN DER AAR, P.J.; L.L. BERGER; K.M. WUJEK; I. MASTENBROEK; G.C. FAHEY Jr., 1983. Relationship between electrophoretic band patterns and in vitro ammonia release of soluble soybean meal protein. *J. Dairy Sci.*, **66**: 1272.

104. VÉ RITÉ, R. & M. JOURNET, 1977. Utilization des tourteaux traités au formol par les vaches laitières. II. Effects sur la production laitière du traitement des tourteaux et du niveau d'apport azoté au début de la lactation. *Ann. Zootech.*, 26: 183.
105. VIK-MO, L.; R.S. EMERY; J.T. HUBER, 1974. Milk protein production in cows abomasally infused with casein or glucose. *J. Dairy Sci.*, 57: 869.
106. YANG, C.M.J.; D.J. SCHINGOETHE; D.P. CASPER, 1986. Protected methionine and heat-treated soybean meal for high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69: 2348.
107. WACHIRA, J.D.; L.D. SATTER; G.P. BROOKE; A.L. POPE, 1974. Evaluation of formaldehyde treated protein for growing lambs and lactating cows. *J. Animal Sci.*, 39: 796.
108. WALLACE, G.M.; W.R. BANNATYNE; A. KHALEQUE, 1971. Studies on the processing and properties of soy milk. II. Effect of processing conditions on the trypsin inhibitors activity and the digestibility in vitro of proteins in various soy milk preparations. *J. Sci. Food Agric.*, 22: 256.
109. WALTZ, D.M. & S.C. LOERCH, 1986. Effect of acid and alkali treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. *J. Animal Sci.*, 63: 879.
110. WILLIAMS, J.B. & C.B. KNODT, 1951. The supplementation of milk replacements with enzymes and other products. *J. Animal Sci.*, 10: 975.
111. WILLIAMS, V.J.; J.H.B. ROY; C.M. GILLIES, 1976. Milk-substitute diet composition and abomasal secretion in the calf. *Br. Nutr.*, 36: 317.
112. WILLIAMS, G.W. & R.L. THOMPSON, 1988. A indústria de soja no Brasil, estrutura econômica e políticas de intervenção do governo no mercado. Coleção Análise e Pesquisa. Companhia de Financiamento da Produção.
113. WINDSCHITL, P.M. & M.D. STERN, 1988. Effects of urea supplementation of diets containing lignosulfonate-treated soybean meal on bacterial fermentation in continuous culture of ruminal contents. *J. Animal Sci.*, 66: 2948.
114. WINDSCHITL, P.M. & M.D. STERN, 1988. Evaluation of calcium lignosulfonate-treated soybean meal as a source of rumen protected protein for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 71: 3310.