

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**VALIDAÇÃO DO NANOLIPE COMO INDICADOR PARA
ESTIMATIVA DO CONSUMO EM BOVINOS LEITEIROS**

NÉLIO CUNHA GONÇALVES

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012**

NÉLIO CUNHA GONÇALVES

**VALIDAÇÃO DO NANOLIPE COMO INDICADOR PARA
ESTIMATIVA DO CONSUMO EM BOVINOS LEITEIROS**

**Dissertação apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia**

Área de Concentração: Nutrição Animal

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Eloísa de Oliveira
Simões Saliba**

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012**

Dissertação defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2012, pela comissão examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr^a. Eloísa de Oliveira Simões Saliba
(Orientadora)

Dr. Norberto Mário Rodríguez

Dr. Geraldo Sérgio Senra Carneiro Barbosa

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao bom Deus pela graça de viver com saúde e paz!

À minha esposa Valéria, sempre ao meu lado. Agradeço pelo amor, compreensão, paciência, companheirismo.

Aos meus pais, Nélio e Graça, pelo carinho e incentivo em todas as horas. Vocês sempre serão meus maiores exemplos de vida.

A toda minha família, em especial meus irmãos, Rogério, Rafael e Fernando, e meus tios Dorvalina, José de Paula e Onésio, agradeço o apoio e as orações.

A minha orientadora Dr^a Eloísa de Oliveira Simões Saliba, pelos ensinamentos, pelo entusiasmo e pela amizade.

Ao Dr. Guilherme Rocha Moreira, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela consultoria estatística.

Ao Dr. Geraldo Sérgio Senra Carneiro Barbosa e ao Dr. Norberto Mário Rodríguez, pelo apoio, em especial para a realização dos estudos a campo.

Ao Dr. Cristóvão Colombo de Carvalho Couto Filho, aos zootecnistas Filipe Aguiar e Silva e Andressa Nathalie Nunes, à química Regeane Martins de Freitas e à médica veterinária Stela Baracho Moura, pela grande ajuda para realização desse estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso na realização desse trabalho.

| SUMÁRIO | |
|---|-----------|
| VALIDAÇÃO DO NANOLIPE COMO INDICADOR PARA ESTIMATIVA DO CONSUMO EM BOVINOS LEITEIROS | |
| RESUMO..... | 09 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| <hr/> | |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 11 |
| <hr/> | |
| CAPÍTULO 1 | |
| Revisão de Literatura | |
| 1.1. Importância da aferição do consumo na bovinocultura leiteira..... | 12 |
| 1.2. A relação entre consumo, digestibilidade e produção fecal..... | 12 |
| 1.3. Metodologias para aferição do consumo em bovinos leiteiros..... | 13 |
| 1.4. Princípios da utilização de indicadores para estimativa da produção fecal..... | 14 |
| 1.5. Alguns indicadores utilizados..... | 16 |
| 1.5.1. NANOLIPE: Nanotecnologia aplicada ao LIPE®..... | 16 |
| 1.5.2. Proteína bruta fecal..... | 17 |
| 1.5.3. Lignina..... | 18 |
| 1.6. Referências Bibliográficas..... | 19 |
| <hr/> | |
| CAPÍTULO 2 | |
| Validação do NANOLIPE como indicador para a estimativa do consumo em bovinos leiteiros | |
| RESUMO..... | 22 |
| ABSTRACT..... | 22 |
| 2.1. Introdução..... | 23 |
| 2.2. Material e Métodos..... | 24 |
| 2.3. Resultados e Discussão..... | 27 |
| 2.4. Conclusões..... | 30 |
| 2.5. Referências Bibliográficas..... | 30 |
| <hr/> | |
| CAPÍTULO 3 | |
| Avaliação estatística da linearidade do método de espectrometria no infravermelho para quantificação do NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros | |
| RESUMO..... | 32 |
| ABSTRACT..... | 32 |
| 3.1. Introdução..... | 33 |
| 3.2. Material e Métodos..... | 33 |
| 3.3. Resultados e Discussão..... | 34 |
| 3.4. Conclusões..... | 38 |
| 3.5. Referências Bibliográficas..... | 38 |
| <hr/> | |
| CAPÍTULO 4 | |
| Considerações Finais..... | 40 |
| Referência Bibliográfica Citada..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Composição nutricional dos ingredientes da dieta oferecida (%).....24
- Tabela 2. Quadro de análise de variância.....26
- Tabela 3. Consumo de matéria seca (CMS), produção de matéria seca fecal (PF) e digestibilidade aparente *in vivo* da matéria seca (DIVMS), aferidos pela coleta total (média e desvio padrão referentes aos cinco dias de coleta).....27
- Tabela 4. Médias de consumo de matéria seca (% PV) obtidas pelos diferentes métodos de aferição.....27
- Tabela 5. Concentração dos indicadores NANOLIPE e Lignina Klason (LK) nas amostras de fezes e de alimentos. Consumo de matéria seca (CMS) estimado pela equação de Silva (2007), com substituição do LIPE[®] pelo NANOLIPE (dose diária de 500 mg).....29

CAPÍTULO 3

- Tabela 1. Curva analítica para a quantificação do NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros.....34
- Tabela 2. Avaliação das premissas para o estudo da linearidade da curva de NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros (0,05 a 0,20 mg/g).....35
- Tabela 3. Análise de variância da linearidade para a curva de NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros (0,05 a 0,20 mg/g).....36
- Tabela 4. Concentração média do indicador NANOLIPE (mg/g), obtida em amostras de fezes, coletadas entre 24 e 36 horas após a segunda, e última, aplicação do indicador. Produção de matéria seca fecal (PF) obtida a partir da fórmula: PF em kg = (500 mg que foi a dose diária aplicada do NANOLIPE / concentração do indicador na matéria seca fecal em mg/g) / 1000. Coeficiente de digestibilidade aparente *in vivo* da matéria seca (DIVMS), obtido por meio de coleta total em ensaio de cinco dias. Consumo de matéria seca (CMS), em relação ao peso vivo dos animais, estimado pelo NANOLIPE através da fórmula: CMS em porcentagem do peso vivo = [(PF em kg / (100 – DIVMS em porcentagem)) / peso vivo do animal em kg] x 100.....38
-

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Gráfico de dispersão da concentração de proteína bruta fecal (PB fecal), em porcentagem na matéria seca, em relação ao consumo de matéria seca (CMS), em porcentagem do peso vivo (PV).....26

Figura 2. – Gráfico de dispersão dos valores de concentração fecal do NANOLIPE (mg/g) em relação ao tempo em horas. Média da concentração do NANOLIPE (mg/g) nas amostras de fezes coletadas entre 0 e 12 horas (tempo 0), entre 12 e 24 horas (tempo 12), entre 24 e 36 horas (tempo 24) e entre 36 e 48 horas (tempo 36) após a segunda aplicação do indicador. Amostras coletadas a cada defecação voluntária.....28

CAPÍTULO 3

Figura 1. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$) para avaliação das premissas do teste de linearidade.....36

Figura 2. Curva de calibração, para análise quantitativa do indicador NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros, por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier. Respostas correspondentes à altura do pico no comprimento de onda $1035,62 \text{ cm}^{-1}$37

Figura 3. Resíduos da curva de calibração para análise quantitativa do indicador NANOLIPE, em fezes de bovinos leiteiros, por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier.....37

LISTA DE SIGLAS

ATR: Reflexão Total Atenuada
CMS: Consumo de Matéria Seca
CNCPS: Cornell Net Carbohydrate and Protein System
DIVMS: Digestibilidade *in vivo* da Matéria Seca
DMS: Digestibilidade da Matéria Seca
EE: Extrato Etéreo
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO: Food and Agriculture Organization
FDAi: Fibra Detergente Ácido Indigestível
FDN: Fibra Detergente Neutro
FDNi: Fibra Detergente Neutro Indigestível
FT-IV: Infravermelho com Transformada de Fourier
LIPE[®]: Lignina Isolada Purificada e Enriquecida
LK: Lignina Klason
MO: Matéria Orgânica
MS: Matéria Seca
NANOLIPE: Lignina Isolada Purificada Enriquecida e Nano Particulada
NIDN: Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro
PB: Proteína Bruta
PB_f: Proteína Bruta Fecal
PF: Produção Fecal
PV: Peso Vivo

RESUMO

Cinco novilhas mestiças foram utilizadas com o objetivo de se validar o NANOLIPE como indicador de consumo em bovinos leiteiros. Os resultados obtidos com o referido indicador foram comparados com outros três métodos de aferição do consumo: coleta total, proteína bruta fecal, e Lignina Klason (em combinação com o NANOLIPE). Não houve diferença entre os métodos testados ($P > 5\%$), fato que valida o NANOLIPE como indicador para estimativa de consumo. Também foram determinados a melhor forma e o melhor horário de coleta das fezes nos estudos com o NANOLIPE. A combinação do NANOLIPE (indicador externo) com a Lignina Klason (indicador interno) se mostrou uma alternativa simples e eficiente para determinar o consumo. Com o objetivo de se avaliar estatisticamente a linearidade do método de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, para quantificação do indicador NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros, uma curva analítica em matriz foi criada. Definiram-se quatro níveis de concentração para avaliação da faixa linear de trabalho, sendo estes: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 miligramas de NANOLIPE por grama de fezes. A altura do pico de absorvância no número de onda $1035,62 \text{ cm}^{-1}$ proporcionou a relação mais adequada à determinação do NANOLIPE nas fezes. Foram aplicados os testes: Ryan-Joiner, Durbin-Watson e Brown-Forsythe para verificar a normalidade, a independência e a homocedasticidade dos resíduos, respectivamente. A análise de variância demonstrou serem não significativos os desvios de linearidade. O valor do coeficiente de correlação de 0,9998, sustentado pela avaliação estatística apresentada, é excelente.

Palavras-chave: consumo, digestibilidade, indicador, lignina, produção fecal

ABSTRACT

Five crossbred heifers were used in order to validate the NANOLIPE as a marker to estimate dry matter intake in dairy cattle. The results obtained with this marker were compared with three other methods: total collection, fecal crude protein and Klason Lignin (in combination with NANOLIPE). There was no difference between the methods tested ($P > 5\%$), a fact that validates the NANOLIPE as an efficient marker in estimating dry matter intake. The best way and time of fecal sampling in studies with NANOLIPE were also determined. The combination of Klason Lignin (internal marker) with NANOLIPE (external marker) proved to be a simple and efficient alternative to determine dry matter intake in dairy cattle. In order to statistically evaluate the linearity of the method of infrared spectrometry with Fourier transform to quantify the marker NANOLIPE in feces of dairy cattle, an analytical curve in matrix was created. Four levels of concentration were defined to evaluate the linear range of work: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 milligrams of NANOLIPE per gram of feces. The height of the absorbance peak at wavenumber 1035.62 cm^{-1} provided the most appropriated relationship to determine NANOLIPE. Three tests were applied to ensure normality, independence and homoscedasticity of the residuum, respectively: Ryan-Joiner, Durbin-Watson and Brown-Forsythe. Analysis of variance showed that the deviations of the linearity were no significant. The value of the correlation coefficient of 0.9998, supported by the statistical analysis presented is excellent.

Keyword: digestibility, fecal output, intake, lignin, marker

INTRODUÇÃO GERAL

Para validação do NANOLIPE, este trabalho foi dividido em quatro capítulos.

Apresentou-se, inicialmente, a revisão de literatura no **Capítulo 1**. Nesta, pontuou-se acerca da importância da aferição do consumo na bovinocultura leiteira e das metodologias disponíveis para sua realização. Em seguida, foram expostos os princípios da utilização de indicadores, para estimativa de consumo, e revisados aqueles utilizados nesse estudo: o NANOLIPE, a proteína bruta fecal; e a Lignina Klason.

A validação do NANOLIPE, como um indicador eficiente para estimativa do consumo pelos bovinos leiteiros, além da definição do melhor horário e forma para coleta de fezes, quando este é utilizado, são descritos no **Capítulo 2**.

O **Capítulo 3** tratou da avaliação estatística da linearidade do método de espectrometria no infravermelho para quantificação do NANOLIPE em fezes de bovinos.

O **Capítulo 4** apresenta as considerações finais com questões relacionadas a cada um dos capítulos e propostas para prosseguimento dos estudos nesta linha de pesquisa.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – Importância da aferição do consumo na bovinocultura leiteira

A produção leiteira do Brasil, no ano de 2009, ocupou a quinta posição no ranking mundial divulgado pela Food and Agriculture Organization (FAO), com mais de 29 milhões de toneladas de leite produzidas (EMBRAPA, 2011). Como em todo sistema de produção, almeja-se o constante aumento na eficiência produtiva do leite. Produzir mais e utilizar cada vez menos os recursos financeiros, os recursos de mão-de-obra e, mais do que nunca, os recursos naturais disponíveis, é a busca constante de todos envolvidos na cadeia produtiva, mas em especial da pesquisa científica voltada para essa área.

O consumo de nutrientes, no entanto, é um dos principais fatores limitantes da eficiência da produção animal, em especial da bovinocultura leiteira, e depende de fatores ligados ao animal, ao alimento, ao ambiente e suas interações (Peripolli, 2010). Conhecer bem essa variável é fundamental para se entender a complicada dinâmica metabólica animal e, assim, se atuar no sentido de promover respostas produtivas cada vez melhores.

A constante busca por metodologias confiáveis e práticas para se aferir o consumo dos bovinos objetiva, em suma, permitir o eficaz diagnóstico nutricional dos rebanhos, para se formular dietas cada vez mais eficientes e de menor custo. O modelo *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* (CNCPS) expressa bem o caminho para o qual convergem os estudos em nutrição. Ou seja, a criação de modelos matemáticos, que utilizem relações mecanicistas, para o diagnóstico nutricional e formulação de dietas para bovinos. O CNCPS é constituído de um conjunto de planilhas eletrônicas, e de um extenso banco de dados, contendo informações acerca da composição e das características dos alimentos, e dos requisitos nutricionais de diversas categorias de bovinos, submetidos a diferentes condições de manejo e de ambiente (Fox et al., 2004). O consumo animal, nessas diversas condições, é uma das respostas previstas por esse modelo. O constante desenvolvimento do CNCPS, e outros modelos desse tipo, está aliado à disponibilização de dados de consumo confiáveis e em grande escala. Portanto, a busca atual de formas simples, precisas e acuradas de se estimar o consumo, resultará em modelos de predição muito eficientes no futuro, podendo até vir a eliminar, em grande parte, a necessidade dos estudos a campo, e assim, contribuir largamente com o avanço da pesquisa em bovinocultura leiteira.

1.2 – A relação: consumo, digestibilidade e produção fecal

Consumo, digestibilidade e produção fecal são os três pilares dos estudos que objetivam conhecer a qualidade dos alimentos para animais. O consumo e a digestibilidade são indicativos diretos do valor nutritivo de uma dieta, já a produção fecal se constitui uma ferramenta útil para estimar os dois primeiros.

O conhecimento de dois desses fatores sempre permitirá a estimativa do terceiro. A relação é bem simples: a produção de matéria seca fecal (PF) é igual ao consumo de matéria seca (CMS) multiplicado pela fração do alimento que não é absorvido, ou seja, um menos o coeficiente de digestibilidade da matéria seca (DMS). Podemos representar matematicamente da seguinte forma:

$$PF = CMS \times (1 - DMS)$$

ou

$$CMS = PF / (1 - DMS)$$

ou

$$DMS = 1 - (PF / CMS)$$

Teoricamente, o método mais simples, que permitiria a aferição dessas variáveis, seria a pesagem direta do alimento e das fezes, para se obter o consumo e a produção fecal, seguida da aplicação da fórmula matemática, expressa anteriormente, para obtenção da digestibilidade. Na prática, no entanto, em estudos com bovinos, geralmente trabalha-se com dezenas de animais e em ambientes de difícil controle. Exemplo disso são os estudos com animais soltos em pastejo. Por isso, ao longo dos anos, diferentes métodos têm sido propostos, e utilizados, com o intuito de facilitar a aferição daquelas variáveis, de forma mais eficiente.

1.3 – Metodologias para aferição do consumo em bovinos leiteiros

Quando se trabalha com animais confinados a aferição do consumo, pela pesagem do alimento oferecido e das sobras é exequível, embora bastante laboriosa. No entanto, quando se trabalha com animais em pastejo, são impostas grandes limitações, tais como: impossibilidade de se pesar precisamente o alimento consumido e as fezes produzidas, dificuldade de se obter amostras representativas do que o animal ingere e dificuldade de obtenção de dados sem alteração no comportamento ingestivo dos animais. No entanto, diversos métodos para contornar essas limitações, na aferição do consumo nos animais em pastejo, foram propostos e são utilizados.

Segundo Astigarraga (1997), a estimativa de consumo de animais manejados sob condição de pastejo é tão complexa que todos os métodos utilizados têm limitações e comprometimentos que podem induzir a erros, sendo assim, o autor conclui que, enquanto nenhuma das técnicas é completamente adequada, cada uma delas tem valor em situações específicas e podem produzir resultados válidos, desde que suas limitações sejam conhecidas e consideradas.

A aferição do consumo de animais em regime de pastejo pode ser feita por métodos: (a) baseados na diferença de pesos dos animais; (b) baseados nas diferenças de peso do

pasto; (c) baseados no comportamento ingestivo dos animais; (d) baseados na predição das características da forragem; (e) baseados no desempenho animal; (f) baseados na quantificação de elementos chamados, genericamente, *n*-alcanos; (g) baseados na obtenção da produção fecal aliada à predição da digestibilidade do pasto (Moore e Solleberger, 1997).

O presente estudo se insere no último item do parágrafo anterior, ou seja, preconiza-se a estimativa do consumo de forma indireta, pelo conhecimento da produção fecal e da digestibilidade do alimento consumido pelos bovinos. Assume-se aqui, que o método mais simples, e de maior acurácia e precisão, para determinação do consumo em ruminantes, em condição de pastejo, baseia-se na predição da produção fecal, através do uso de indicadores, aliada à predição da digestibilidade *in vitro* do alimento consumido.

A melhor forma de determinação da digestibilidade *in vitro*, no entanto, não será tratada neste estudo, pois a discussão dos métodos existentes e utilizados nos laboratórios não é objetivo desse trabalho. A estimativa de produção fecal pelo uso de indicadores, sendo o tema central dessa dissertação, terá uma abordagem mais aprofundada.

1.4 – Princípios da utilização de indicadores para estimativa da produção fecal

Indicadores são compostos de referência usados para monitorar aspectos químicos (como a hidrólise e síntese de compostos) e físicos da digestão (como a taxa de passagem) (Owens e Hanson, 1992), promovendo estimativas qualitativas ou quantitativas da fisiologia animal (Saliba, 1998). Estas substâncias, também denominadas indicadores, traçadores, substâncias de referência ou substâncias indicadoras, são rotineiramente utilizadas para estimar o fluxo da digesta, a digestibilidade e a produção fecal em diversas espécies animais. Comparativamente com processos invasivos, os indicadores minimizam a interferência com os padrões de comportamento animal e simplificam os procedimentos, tendo em vista a não necessidade de utilização de cânulas reentrantes no trato digestivo, sacolas de coleta de fezes e, até mesmo, esvaziamento do trato digestivo ou abate dos animais (Rodriguez, et al, 2006).

Uma distinção, para fins didáticos, foi proposta para dividir os indicadores em dois grandes grupos: indicadores internos e externos. Quando um indicador está presente naturalmente no alimento que o animal ingere ele é chamado interno. Quando não é uma substância encontrada nos alimentos, por não participar da constituição dos mesmos, ou ainda por ter sido criado ou modificado em laboratório, ele é chamado indicador externo. Saliba e Rodriguez (2009) propuseram uma nova classe de indicadores, denominados intra-indicadores. Estes últimos compreendem grupamentos funcionais constituintes de moléculas, como as metoxilas e hidroxilas fenólicas presentes na molécula de lignina.

Qualquer substância, ou composto químico, deve cumprir dois princípios básicos para ser utilizada como indicador: não sofrer nenhuma alteração no processo de digestão e não ser absorvida pelo trato gastrointestinal, ou seja, ser inerte ao animal. Em outras palavras, o indicador ingerido pelo animal, deve ser recuperado integralmente nas fezes, sem alterações físico-químicas. Virtualmente, qualquer entidade química que cumpra esses dois pré-requisitos poderá ser utilizada como indicador. No entanto, segundo Owens e

Hanson (1992) nenhuma das substâncias usadas como indicador preenche todas os requisitos desejáveis, porém, possuem características adequadas para fornecer dados importantes.

Um grande entrave a utilização de muitas substâncias como indicadores é a dificuldade em dosá-las nas fezes, e no alimento, no caso dos indicadores internos. Em alguns casos a análise, mesmo que seja possível, representa um custo demasiadamente alto, inviabilizando a mesma.

Para determinação da produção fecal, uma vez atendido o que foi mencionado nos parágrafos anteriores, basta utilizar uma relação matemática simples: a produção fecal (PF) é igual à razão entre a quantidade de indicador ingerida e a concentração do indicador nas fezes:

$$PF = \text{dose ingerida} / \text{concentração fecal}$$

A ingestão do indicador pode ser voluntária, no caso dos indicadores internos, ou involuntária, pela administração de um indicador externo. A concentração do indicador nas fezes é aferida após um período de adaptação à dieta, no caso dos indicadores internos, e adaptação à dieta e ao próprio indicador, no caso dos indicadores externos. O que define o tamanho do período de adaptação é o tempo necessário para que o indicador alcance o chamando “steady-state”, ou seja, um patamar de excreção constante nas fezes. Quanto mais rápido esse patamar é alcançado, menor é o tempo necessário para adaptação e, por consequência, melhor é o indicador.

Após a adaptação faz-se as coletas de fezes, em geral uma vez ao dia. Alguns pesquisadores optam por realizar duas ou mais coletas de fezes diárias, nesse caso se usam intervalos de amostragem equidistantes, e se trabalha com a média de concentração do indicador nos tempos de amostragem.

Após a adaptação, os ensaios têm duração de cinco dias, tradicionalmente. Há estudos que utilizam três dias somente (Ferreira et al., 2009). A tendência é se trabalhar com períodos mais curtos possível, para minimizar o tempo e o custo despendido nos experimentos.

O óxido crômico (Cr_2O_3) é, sem dúvida, o indicador mais amplamente difundido e utilizado em todo o mundo para estimativa da produção fecal em bovinos. Esse fato se explica pelas três características, citadas por Titgemeyer (1997): seu baixo custo, a facilidade com que se incorpora à digesta e a relativa simplicidade em sua análise, por absorção atômica. No entanto, muitas pesquisas demonstram algum grau de ineficiência. Owens e Hanson (1992) apontam significativas variações na excreção do indicador em diferentes animais e também ao longo do dia, no mesmo animal. Além disso, Peddie et al., em 1982, já indicavam o potencial carcinogênico do Cr_2O_3 . Sendo assim, tal substância coloca em risco a saúde do pesquisador que o manipula. Essa última característica sozinha já é suficiente para limitar a utilização do Cr_2O_3 como indicador. Alia-se a isso o fato de existir uma grande variedade de substâncias com o mesmo potencial de utilização. Nesse

trabalho, optou-se pela não utilização do Cr_2O_3 . Pelo contrário, buscou-se estudar a utilização de outros indicadores, tendo como referência não o Cr_2O_3 , mas sim a coleta total.

1.5 – Alguns indicadores utilizados

1.5.1 – NANOLIPE: nanotecnologia aplicada ao LIPE[®]

Saliba et al. (2003) desenvolveram um indicador externo a partir da lignina isolada do *Eucalyptus grandis*. Para tal, enriqueceram esse composto com grupamentos fenólicos, não comumente encontrados na lignina da dieta animal, obtendo assim um hidroxifenilpropano modificado e enriquecido, ao qual denominaram LIPE[®] (Lignina Isolada Purificada e Enriquecida). Recentemente, uma substância derivada do LIPE[®] foi proposta como um novo indicador para estimativa da produção fecal em bovinos leiteiros, sendo denominado NANOLIPE (Saliba et al., 2011).

O LIPE[®] foi inicialmente utilizado em estudo de consumo e digestibilidade, em comparação à coleta total de fezes, em coelhos. As estimativas de produção fecal e de digestibilidade revelaram a eficiência do LIPE[®] como indicador externo, não apresentando diferenças estatísticas com relação à coleta total. Além disso, apresentou vantagens como o curto período de adaptação e o baixo custo. Em seguida, o LIPE[®] foi comparado com a coleta total de fezes em experimento de avaliação do feno de Tifton 85 para ovinos (SALIBA et al., 2003). Os resultados obtidos pela técnica in vivo foram estatisticamente semelhantes aos encontrados pelo uso do indicador externo LIPE em ambos os experimentos, sendo os valores de coeficiente médio de digestibilidade de 63,23% e de 64,78% e de produção fecal de 365,39 g/dia e de 383,07 g/dia, respectivamente.

Trabalhando com três e cinco dias, respectivamente, para períodos de adaptação e de coleta de fezes, OLIVEIRA et al. (2005) relataram que o LIPE[®], administrado em dose única (15:00 h) em cápsulas contendo 0,5 g, mostrou-se ser um indicador externo capaz de estimar satisfatoriamente a excreção fecal e o consumo de MS de novilhos da raça Nelore manejados sob condição de pastejo em *Brachiaria brizantha* cv. Marandú.

Silva et al. (2008), Merlo et al. (2008) e Silva et al. (2008b), trabalhando com ovinos, não observaram diferença entre o método de coleta total de fezes e o LIPE[®] na determinação da digestibilidade em dietas com níveis crescentes de castanha de caju, farelo de coco e torta de babaçu, respectivamente. Também não foi detectada variação na excreção do indicador ao longo do dia. Aqueles autores concluíram, portanto, que o LIPE[®] pode ser empregado como indicador externo de digestibilidade em ovinos.

Ferreira et al. (2009) realizaram um estudo comparativo dos indicadores FDAi, FDNi, Cr_2O_3 , TiO_2 , e LIPE[®] em bovinos. Afirmam que o LIPE[®] estimou de forma satisfatória a digestibilidade dos nutrientes, a qual não diferiu da digestibilidade determinada pela coleta total de fezes. No estudo realizado por Silva et al. (2010) o LIPE[®] foi eficaz para prever o consumo de novilhas alimentadas com cana-de-açúcar e uréia. Silva et al. (2011) demonstraram a eficiência do LIPE[®] em estudo com vacas em lactação,

no qual não foi encontrada diferença significativa entre o consumo de matéria seca estimado pelo indicador e o consumo real estimado pela coleta total.

Avanços metodológicos na obtenção do LIPE[®] permitiram a evolução do mesmo em um novo indicador, o qual foi chamado NANOLIPE (Saliba et al., 2011). A criação do NANOLIPE foi possível graças a modificações físico-químicas durante a fabricação do LIPE[®] as quais garantiram uma redução significativa no tamanho das partículas do indicador. Estas alcançaram a escala nano, ou seja, algo em torno de 10^{-9} m de diâmetro. Esse tamanho reduzido das partículas do indicador permite sua dispersão ao longo do trato digestivo, ocorra mais rapidamente. Assim, o estado de equilíbrio, ou *steady state*, é alcançado mais rapidamente, com conseqüente redução do tempo experimental.

1.5.2 – Proteína bruta fecal

A utilização do nitrogênio fecal, ou da proteína bruta fecal (PB_f), como indicador para estimativa de consumo dos bovinos, foge um pouco da lógica de uso de indicadores exposta até agora. Ela parte do pressuposto de que a concentração de PB_f é diretamente proporcional à excreção de matéria orgânica fecal e ao consumo de alimentos (Oliveira et al., 2007). Sendo assim, equações de regressão podem ser criadas em função da concentração da proteína bruta nas fezes dos bovinos. Após estabelecida a equação de regressão, a concentração do indicador, no caso a PB_f, é determinada em amostras de fezes, coletadas dos animais em pastejo por exemplo, e o consumo é determinado matematicamente.

Segundo Harris et al. (1959) a equação de regressão obtida sob essas condições não se aplica necessariamente a um outro conjunto de condições. Desta maneira, para cada condição deveria ser determinada uma equação de regressão (Peripoli, 2010).

A utilização da proteína bruta fecal para estimativa do consumo é atrativa, principalmente em sistemas de pastejo extensivo, devido a sua fácil aplicabilidade, tendo em vista a simplicidade de análise e de amostragem das fezes, as quais podem ser coletadas diretamente no campo, não sendo necessário o uso de animais preparados cirurgicamente (Peripoli, 2010).

A excreção de proteína bruta nas fezes é em sua maior parte de origem microbiana e endógena (representada por células de descamação), mas também contém proteína residual dos alimentos, geralmente quantificado como nitrogênio insolúvel de detergente neutro (NIDN). Em teoria, em animais que possuem ação fermentativa, a proteína fecal reflete principalmente a concentração bacteriana fecal, que é tanto mais elevada quanto mais digestível a dieta ou quanto maior o consumo de matéria seca. Adicionalmente, Van Soest (1994) indicou que as bactérias contribuem com aproximadamente 85% da proteína bruta fecal e são responsáveis pela variação fecal encontrada em alguns experimentos, enquanto Manson (1969) encontrou que a concentração de proteína bruta fecal, em ruminantes, aumenta com o aumento da qualidade da dieta.

1.5.3 – Lignina

Lignina é o nome coletivo dado ao constituinte da parede celular da planta que é insolúvel em solução de ácido sulfúrico a 72%. No entanto a lignina de uma planta pode ser quimicamente diferente da lignina de outra, sua composição pode variar com o estágio de crescimento da planta, a lignina ingerida pelo animal pode diferir daquela excretada, e vários métodos de análise de lignina podem medir diferentemente este constituinte da planta. Todos esses fatores contribuem para o sucesso variável na utilização desse composto como indicador (Peripoli, 2010).

A lignina determinada pela técnica do ácido sulfúrico 72%, denominada Lignina Klason (LK), foi aqui utilizada como indicador interno em uma forma pouco usual. Ao invés de utilizarmos a Lignina Klason para estimar a digestibilidade, esta foi utilizada em combinação com o indicador externo NANOLIPE, permitindo a estimativa do consumo, sem a necessidade de se estimar a digestibilidade *in vitro* da dieta em laboratório. A ideia é facilitar ainda mais a estimativa de consumo em bovinos em pastejo.

Silva (2007) obteve bons resultados ao utilizar a Lignina Klason dessa forma. Este pesquisador afirmou que a possível contaminação da fração Lignina Klason, proveniente do hidroxifenilpropano modificado e enriquecido LIPE[®], gerou a hipótese de uso combinado da Lignina Klason e do LIPE[®], como indicadores interno e externo, respectivamente, tal como no princípio dos n-alcenos. Estes últimos baseiam-se no fornecimento de um n-alceno sintético associado ao n-alceno natural das plantas e obtenção do consumo por cálculos a partir da concentração dos mesmos na dieta e nas fezes (Dove e Mayes, 1991). Com base nessas informações Silva (2007) realizou uma simulação de estimativa de consumo dos animais utilizados em seu experimento (novilhas confinadas que recebiam dieta a base de silagem de capim elefante) a partir do uso combinado da Lignina Klason e do LIPE[®]. Propuseram então a seguinte fórmula, adaptada de Dove e Mayes (1991):

$$\text{Consumo}(kgMS/d) = \frac{LIPE^{\circ} \text{ fornecido}(g)}{\left(\frac{LIPE^{\circ} \text{ fezes}(g/kg)}{LK \text{ fezes}(g/kg)} \right) \times [(LK \text{ fezes}(g/kg) - LIPE^{\circ} \text{ forragem}(g))]}$$

Essa mesma fórmula foi utilizada nesse experimento, no entanto foram utilizados dados do NANOLIPE, em substituição ao LIPE[®].

1.6 – Referências Bibliográficas

ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de ruminantes en pastoreo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. Anais... Maringá: Cooper. Graf. Artes Gráficas Ltda., 1997. p. 1-23.

DOVE, H., MAYES, R. W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 42, n. 6, p. 913-952, 1991.

EMBRAPA Gado de Leite: Principais países produtores de leite no mundo – 2009. Atualização feita em junho de 2011. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>. Acesso em 13/12/2011 às 22:44 h.

FERREIRA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; MARCONDES, M. I.; PAIXÃO, M. L.; PAULINO, M. F.; VALADARES, R. F. D. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 8, p. 1568-1573, 2009.

FOX, D.G.; TEDESCHI, L.O.; TYLUTKI, T.P. et al. The Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology*, v.112, p.29-78, 2004.

HARRIS, L. E.; COOK, C. W.; BUTCHER, J. E. Symposium on forage evaluation. Intake and digestibility techniques and supplemental feeding in range forage evaluation. *Agronomy Journal*, v. 51, p. 226-234, 1959.

MANSON, V. C. Some observations on the distribution and origin of nitrogen in sheep faeces. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* v. 73, p. 99-111, 1969.

MERLO, F. A. ; SILVA, A. G. M. ; BORGES, Iran ; NEIVA, José Neuman ; RODRIGUEZ, Norberto Mário ; SALIBA, Eloísa de O S ; MORAES, Salette Alves de ; SILVA, J. J. ; SOUSA, T. D. S. ; MAGALHAES JUNIOR, L. L. ; GONCALVES, N. C. ; BARROS, V. P. ; VALLE, R. C. A. . Avaliação do LIPE como indicador externo de digestibilidade em ovinos recebendo dietas com farelo de coco. In: Zootec 2008, 2008, João Pessoa. Anais... João Pessoa: ABZ, 2008.

MOORE, J.E.; SOLLENBERGER, L.E. Techniques to predict pasture intake. In: GOMIDE, J.A. (Ed.) SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV, 1997, p. 81-96.

OLIVEIRA, L.; KOSLOSKY, G. V.; CHIESA, A. R.; HÁRTER, C. J.; LIMA, L. D.; JÚNIOR, R. L. C. Uso do nitrogênio fecal para estimar o consumo por ruminantes: uma abordagem ensaios de digestibilidade com ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007 (Disponível em CD-ROM).

OLIVEIRA, L.O.F.de.; SALIBA, E.de.O.S.; BORGES, I. et al. Concentração de óxido crômico e Lipe® nas fezes de bovinos em pastagem de *Brachiaria brizantha* utilizadas nas estimativas de consumo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. Anais... Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005b (Disponível em CD-ROM).

OWENS, F. N.; HANSON, C. F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 9, p. 2605-2617, 1992.

PEDDIE, J.; DEWAR, W. A.; GILBERT, A. B. The use of titanium dioxide for determining apparent digestibility in mature domestic fowls (*Gallus domesticus*). *Journal Agricola Science*, v. 99, p.233-263, 1982.

PERIPOLLI, V. Uso do nitrogênio fecal para estimar o consumo e a digestibilidade em ruminantes em pastejo. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

RODRIGUEZ, N. M; SALIBA, E. O. S.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade. In: 43ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006, João Pessoa. Anais da 43ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. João Pessoa, 2006.

SALIBA, E. O. S.; BARBOSA, G. S. S. C.; RODRIGUEZ, N. M.; COUTO FILHO, C. C. C.; MOREIRA, G. R.; GONÇALVES, N. C.; SILVA, F. A.; Utilization of nanotechnology to the development of a marker of fecal output in dairy cattle. In: 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH8), 2011, Aberystwyth, Wales, UK. Abstract published in *Advances in Animal Biosciences*, 2011.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M. Uso de indicadores na avaliação da digestibilidade em ruminantes - LIPE® Lignina Purificada e enriquecida. In: SILVA, L. F. P.; RENNÓ, F. P (Ed.) *II Simpósio Internacional: Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes*. Pirassununga: USP, 2009. p. 50-67.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; PILO-VELOSO, D. Purified lignin extraded from *Eucalyptus grandis* (PELI), used as an external marker in digestibility trials in various animal species. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., Porto Alegre, 2003. Proceedings... Porto Alegre: WAAP/ALPA/SBZ/UFRGS, 2003.

SALIBA, E. O. S. Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostas à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1998, 251p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).

SILVA, F. A.; BARBOSA, G. S. S. C.; SALIBA, E. O. S.; MOURA, S. B.; GONÇALVES, N. C.; SILVA, C. R. M.; Avaliação do LIPE[®] na estimativa de consumo de bovinos leiteiros. In: 48^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2011, Belém. Anais da 48^a Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Belém: RBZ, 2011.

SILVA, A. G. M. ; BORGES, Iran ; NEIVA, José Neuman ; RODRIGUEZ, Norberto Mário ; SALIBA, Eloísa de O S ; MORAES, Salete Alves de ; SILVA, J. J. ; MERLO, F. A. ; SOUSA, T. D. S. ; MAGALHAES JUNIOR, L. L. ; GONCALVES, N. C. ; BARROS, V. P. ; VALLE, R. C. A. . Avaliação do LIPE como indicador externo de digestibilidade em ovinos recebendo dietas com castanha de caju integral 1. In: Zootec 2008, 2008, João Pessoa. Anais da Zootec 2008. João Pessoa : ABZ, 2008.

SILVA, A. G. M. ; BORGES, Iran ; NEIVA, José Neuman ; RODRIGUEZ, Norberto Mário ; SALIBA, Eloísa de O S ; MORAES, Salete Alves de ; SILVA, J. J. ; MERLO, F. A. ; SOUSA, T. D. S. E. ; MAGALHAES JUNIOR, L. L. ; GONÇALVES, N. C. ; BARROS, V. P. ; VALLE, R. C. A. . Avaliação do LIPE como indicador externo de digestibilidade em ovinos recebendo dietas com torta de babaçu. In: I Congresso brasileiro de nutrição animal, 2008b, Fortaleza. Anais do I Congresso Brasileiro de Nutrição Animal. Fortaleza : AMVECE, 2008b.

SILVA, J. J. *Indicadores de consumo total, consumo diferenciado e de cinética ruminal em bovinos leiteiros*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007, 78p. Tese (Doutorado em Zootecnia).

SILVA, J. J.; SALIBA, E. O. S.; BORGES, I.; GONÇALVES, L. C.; RODRÍGUEZ, N. M.; AROEIRA, L. J. M.; SILVA, A. G. M.; COSTA, F. J. N. Indicadores para estimativa de consumo total por novilhas holandês x zebu mantidas em confinamento. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v. 11, n. 3, p 838-848, 2010.

TITGEMEYER, E. C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal Animal Science*, v. 75, p. 2235-2247, 1997.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. New York: Cornell University Press, 1994, 476p.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DO NANOLIPE COMO INDICADOR PARA ESTIMATIVA DO CONSUMO EM BOVINOS LEITEIROS

RESUMO: Cinco novilhas mestiças foram utilizadas com o objetivo de se validar o NANOLIPE como indicador de consumo em bovinos leiteiros. Os resultados obtidos com o referido indicador foram comparados com outros três métodos de aferição do consumo: coleta total (método de referência), proteína bruta fecal, e Lignina Klason (em combinação com o NANOLIPE). Não houve diferença entre os métodos testados ($P > 5\%$), fato que valida o NANOLIPE como indicador de consumo. Também foram determinados a melhor forma e o melhor horário de coleta das fezes nos estudos com NANOLIPE. A combinação do NANOLIPE com a Lignina Klason se mostrou uma alternativa simples e eficiente para determinar o consumo.

Palavras-chave: lignina, produção fecal, digestibilidade

VALIDATION OF NANOLIPE AS A MARKER FOR ESTIMATING DRY MATTER INTAKE OF DAIRY CATTLE

ABSTRACT: Five crossbred heifers were used in order to validate the NANOLIPE as a marker to estimate dry matter intake in dairy cattle. The results obtained with this marker were compared with three other methods: total collection (reference method), fecal crude protein and Klason Lignin (in combination with NANOLIPE). There was no difference between the methods tested ($P > 5\%$), a fact that validates the NANOLIPE as an efficient marker. The best way and time of fecal sampling in studies with NANOLIPE were also determined. The combination of Klason Lignin with NANOLIPE proved to be a simple and efficient alternative to determine dry matter intake in dairy cattle.

Keywords: lignin, fecal output, digestibility

2.1 – Introdução

O consumo de nutrientes é um dos principais fatores limitantes da eficiência da produção animal, em especial da bovinocultura leiteira, e depende de fatores ligados ao animal, ao alimento, ao ambiente e suas interações (Peripolli, 2010). Conhecer bem essa variável é fundamental para se entender a complicada dinâmica metabólica animal e, assim, se atuar no sentido de promover respostas produtivas cada vez melhores.

Métodos indiretos de estimativa do consumo, baseados no uso de substâncias denominadas indicadores, são alternativas que facilitam os estudos da digestão. Existem diversos indicadores capazes de prever o consumo, no entanto, segundo Owens e Hanson (1992) nenhuma das substâncias usadas preenche todas as características desejáveis, porém, várias são suficientemente adequadas para fornecer dados importantes.

Saliba et al. (2003) desenvolveram um indicador externo, para estimativa do consumo e digestibilidade, a partir da lignina isolada do *Eucalyptus grandis*, o qual denominaram LIPE[®] (Lignina Isolada Purificada e Enriquecida). Recentemente, avanços metodológicos na obtenção do LIPE[®] permitiram a evolução do mesmo em um novo indicador, o qual foi chamado NANOLIPE (Saliba et al., 2011).

A criação do NANOLIPE foi possível graças a modificações físico-químicas durante a síntese do LIPE[®] as quais garantiram uma redução significativa no tamanho das partículas do indicador. Estas alcançaram a escala nano, ou seja, algo em torno de 10^{-9} m de diâmetro. A esse tamanho reduzido das partículas é atribuído o fato da dispersão do indicador, ao longo do trato digestivo, ocorrer de forma mais acelerada. Assim, o *steady state* é alcançado mais rapidamente e, conseqüentemente, reduz-se o tempo experimental.

Silva (2007) obteve bons resultados com o uso combinado da Lignina Klason e do LIPE[®], como indicadores interno e externo, respectivamente, tal como no princípio dos n-alcenos. Estes últimos baseiam-se no fornecimento de um n-alceno sintético, associado ao n-alceno natural das plantas, e obtenção do consumo por cálculos a partir da concentração dos mesmos na dieta e nas fezes (Dove e Mayes, 1991). Com base nessas informações Silva (2007) realizou uma simulação de estimativa de consumo a partir do uso combinado da Lignina Klason e do LIPE[®].

Outra forma indireta de se estimar o consumo, porém pouco usual, é a utilização da proteína bruta fecal (PB_f) como indicador. É um método atrativo, principalmente em sistemas de pastejo extensivo, devido a sua fácil aplicabilidade, tendo em vista a simplicidade de análise e de amostragem das fezes, as quais podem ser coletadas diretamente no campo, não sendo necessário o uso de animais preparados cirurgicamente (Peripolli, 2010). Esse método parte do pressuposto de que a concentração de PB_f é diretamente proporcional à excreção de matéria orgânica fecal e ao consumo de alimentos (Oliveira et al., 2007). Sendo assim, equações de regressão podem ser criados em função da concentração da proteína bruta nas fezes dos bovinos.

Os objetivos desse estudo foram validar o NANOLIPE como indicador de consumo em bovinos leiteiros, frente ao método de referência (coleta total), e definir a melhor forma de amostragem das fezes em estudos com o referido indicador. Além

disso, propõe a utilização da PB_f como indicador e modificações da fórmula de Dove e Mayes (1991) adaptada por Silva (2007), utilizando a combinação da Lignina Klason com o NANOLIPE (em substituição ao LIPE[®]) para determinação do consumo por bovinos leiteiros.

2.2 – Material e métodos

O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), na cidade de Florestal (19° 53' 20"S 44° 25' 58"W), em Minas Gerais, a 60 km da capital, Belo Horizonte. O clima nessa região é considerado tropical de altitude. A fase experimental a campo ocorreu no período final do outono, do ano de 2010, entre os dias 31 de maio e 17 de junho.

Foram utilizadas cinco novilhas mestiças holandês-zebu, fistuladas no rúmen, com peso vivo médio de 489,2 kg (\pm 74,1 kg), e com idade média de 29,2 meses (\pm 8,6 meses).

Os animais foram mantidos em confinamento, alojados em sistema “Tie Stall”, sendo o piso de concreto, sem revestimento de borracha, contendo comedouros de alvenaria, bebedouros automáticos individuais e cochos separados para mistura mineral. Os animais passaram por um período de adaptação de doze dias, às instalações e à dieta.

A dieta foi composta por silagem de milho, oferecida *ad libitum*, e farelo de soja, em quantidade igual a 3 kg para cada animal, diariamente. A composição nutricional desses alimentos está expressa na Tabela 1. Mistura mineral comercial também foi disponibilizada à vontade.

Tabela 1 – Composição nutricional dos ingredientes da dieta oferecida (%):

| Nutriente | Silagem de milho | Farelo de soja |
|------------------|-------------------------|-----------------------|
| MS | 37,79 | 85,90 |
| MO | 94,11 | 93,45 |
| PB | 11,09 | 51,82 |
| EE | 04,52 | 01,82 |
| FDN | 59,45 | 13,86 |

A silagem foi fornecida em duas porções diárias, às sete horas da manhã e às quatro horas da tarde, e o farelo de soja foi fornecido em uma porção diária, às sete horas da manhã, sendo misturado ao volumoso no cocho, no momento do fornecimento.

Após um período de doze dias para adaptação das novilhas às instalações e à dieta, foi iniciada a aferição do consumo e da produção fecal, pela coleta total, por um período consecutivo de cinco dias.

Para fins didáticos será considerado “dia experimental um” (dia I) o primeiro dia de coleta total, e assim por diante, até o “dia experimental cinco” (dia V), compreendendo assim, o período de coletas para aferição do consumo.

Diariamente, a quantidade de alimento oferecido subtraída da quantidade de alimento residual nos cochos, determinou a quantidade de alimento consumido, e, pela pesagem do total de fezes produzidas, determinou-se a produção fecal. Amostras de

alimentos, sobras e fezes foram coletadas para determinação dos teores de matéria seca. A digestibilidade aparente *in vivo* da matéria seca foi calculada como descrito do item 1.2.

Cápsulas contendo 500 mg do indicador NANOLIPE foram introduzidas diretamente no rúmen dos animais, via fístula ruminal, uma vez ao dia, sempre às oito horas da manhã, durante dois dias (no dia anterior ao dia I e no próprio dia I). A concentração do NANOLIPE, nas amostras de fezes coletadas no dia II, foi usada para estimar o consumo dos animais. Esse último foi comparado com o consumo médio real, obtido do dia I ao V, através da pesagem dos alimentos (oferecido e sobra). Portanto, foram usados dois dias de adaptação e um dia de amostragem fecal para o indicador NANOLIPE.

A escolha do melhor dia e do melhor horário de amostragem, foi baseada em resultados obtidos nesse experimento e será discutida posteriormente.

No laboratório, as amostras de fezes foram previamente secas, em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, e processadas em moinho tipo Willey provido de peneira com crivos de 1 mm de diâmetro.

Posteriormente foi realizada a quantificação do NANOLIPE, por espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV). Nessa técnica, as amostras são depositadas no espectrômetro, na porção da placa de Reflexão Total Atenuada (ATR) destinada a este fim, e o aparelho informa a concentração do NANOLIPE nas fezes, em mg/g. A produção fecal foi então calculada, de acordo com a fórmula exposta no item 1.4 e o consumo estimado com a fórmula exposta no item 1.2, na qual utilizou-se o dado de digestibilidade aparente *in vivo*, obtido por coleta total em cinco dias.

Nas amostras de alimentos, sobras e fezes, coletadas diariamente, do dia I ao dia V, foi determinada a concentração de lignina pelo método da Lignina Klason, proposto por Van Soest (1994) com algumas adaptações: dois gramas do material pré-seco e moído (fezes e alimentos) foram colocados em béquer de 50 mL. Em seguida foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico (72%) em temperatura de 5°C.

Após três horas de contato com o ácido, tendo sido misturadas a cada 15 minutos, as amostras foram filtradas, com auxílio de uma bomba de vácuo, em cadinho filtrante. Estes últimos tinham o fundo forrado com uma fina camada de lã de vidro, para evitar entupimento dos poros do cadinho. Água quente em abundância foi utilizada para lavar as amostras e eliminar todo resíduo de ácido durante a filtração.

Após a secagem em estufa e pesagem, os cadinhos filtrantes contendo as amostras foram levados à mufla. Após permanecerem quatro horas, em temperatura de 500°C, foram resfriados em dessecador e em seguida pesados. O resíduo mineral, restante após essa queima, foi descontado do resíduo após solubilização com ácido sulfúrico, obtendo assim, por gravimetria diferencial, a concentração de lignina das amostras.

O consumo estimado pelo indicador Lignina Klason foi calculado em combinação com dados do indicador NANOLIPE, como expresso no item 1.5.3.

A concentração da proteína bruta, nas amostras de fezes coletadas entre os dias I e V, foi determinada pelo método de Dumas, em aparelho LECO®. Os dados obtidos nessa análise foram relacionados com os dados de consumo real, obtidos pela pesagem

dos alimentos (oferecido e sobras), resultando no seguinte modelo matemático, do tipo linear simples:

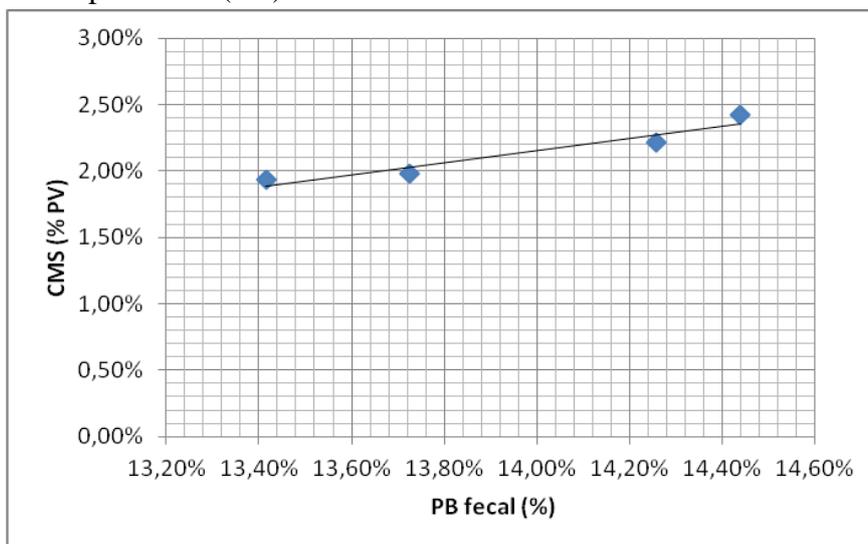
$$y = 0,4584x - 0,0426 \quad (\text{Figura 1})$$

Onde,

y = Consumo de matéria seca em porcentagem do peso vivo;

x = Concentração de proteína bruta, em porcentagem, na matéria seca fecal;

Figura 1. Gráfico de dispersão da concentração de proteína bruta fecal (PB fecal), em porcentagem na matéria seca, em relação ao consumo de matéria seca (CMS), em porcentagem do peso vivo (PV)*:



*Dispersão criada com dados médios de concentração de PB fecal e CMS, dos animais utilizados no experimento, ao longo de cinco dias. $R^2 = 91,46\%$.

O referido modelo foi utilizado para estimar o consumo de matéria seca através da concentração fecal de proteína bruta.

Para as comparações foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso. Os cinco animais constituíram os blocos. Os tratamentos foram as quatro formas de determinação do consumo de matéria seca: (1) coleta total; (2) NANOLIPE; (3) proteína bruta fecal; (4) lignina Klason (Tabela 2).

Tabela 2 – Quadro de análise de variância:

| Fonte de Variação | Grau de Liberdade |
|-------------------|-------------------|
| Total | 19 |
| Bloco | 04 |
| Tratamento | 03 |
| Erro | 12 |

2.3 – Resultados e Discussão

As médias, com seus respectivos desvios padrão, obtidas pelo método de coleta total, para consumo de matéria seca (CMS) em porcentagem do peso vivo (% PV), produção fecal (PF), em kg de matéria seca, e digestibilidade aparente *in vivo* da matéria seca (DMS), em porcentagem, estão expostas na Tabela 3. As médias de consumo de matéria seca, em porcentagem do peso vivo, obtidas com os quatro métodos (Coleta Total, NANOLIPE, Proteína Bruta Fecal e Lignina Klason) estão expostas na Tabela 4.

Tabela 3 – Consumo de matéria seca (CMS), produção de matéria seca fecal (PF) e digestibilidade aparente *in vivo* da matéria seca (DIVMS), aferidos pela coleta total (média e desvio padrão referentes aos cinco dias de coleta):

| Animal | CMS (% PV) | PF (kg) | DIVMS (%) |
|---------------|-------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,94 ± 0,08 | 4,04 ± 0,55 | 65,09 ± 5,42 |
| 2 | 1,98 ± 0,12 | 3,63 ± 0,37 | 65,23 ± 3,76 |
| 3 | 1,70 ± 0,17 | 2,71 ± 0,76 | 65,42 ± 6,69 |
| 4 | 2,21 ± 0,10 | 3,12 ± 0,67 | 67,16 ± 6,96 |
| 5 | 2,43 ± 0,23 | 3,83 ± 0,23 | 62,92 ± 3,56 |

Tabela 4 – Médias de consumo de matéria seca (CMS) em porcentagem do peso vivo (% PV) obtidas pelos diferentes métodos de aferição:

| Método de aferição | CMS (% PV) |
|-----------------------------|-------------------|
| Coleta total | 2,0501 |
| NANOLIPE | 2,1068 |
| Proteína bruta fecal | 2,1647 |
| Lignina Klason | 1,9435 |

Médias iguais pelo teste t a 5% de probabilidade de erro ($P > 0,05$); Coeficiente de Variação = 8,63%.

O consumo de matéria seca estimado pelo NANOLIPE não diferiu do consumo real, estimado pela coleta total. Fato que valida essa substância como indicador útil e eficiente nas predições de consumo.

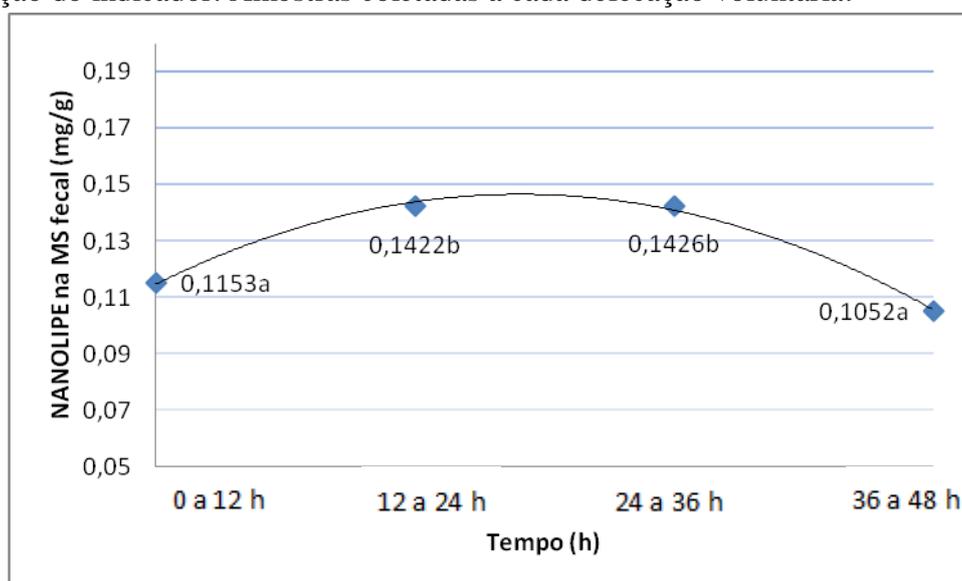
Para estimarmos o consumo dos bovinos é preciso, além da estimativa da produção fecal, dada pelo NANOLIPE, da estimativa da digestibilidade. O método proposto por Tilley e Terry (1963) é considerado válido e é sugerido aqui como o método padrão para análises desse tipo, porém, não foi utilizado nesse experimento. Ao invés disso, foram utilizados os dados de digestibilidade aparente *in vivo*, para evitar eventuais erros, na estimativa do consumo, advindos da técnica de determinação da digestibilidade *in vitro*.

O NANOLIPE foi capaz de estimar satisfatoriamente o consumo com apenas dois dias de adaptação e um período de coletas de 12 horas consecutivas, no terceiro dia.

Para determinação do melhor horário de coleta das amostras de fezes, para dosagem do NANOLIPE foram coletadas e analisadas amostras de todos os animais, cada vez que estes defecaram voluntariamente, em um período ininterrupto de 48 horas

após a segunda aplicação do indicador. Dessa forma foi obtida a curva de excreção fecal do NANOLIPE (Figura 2).

Figura 2 – Gráfico de dispersão dos valores de concentração fecal do NANOLIPE (mg/g) em relação ao tempo em horas. Média da concentração do NANOLIPE (mg/g) nas amostras de fezes coletadas entre 0 e 12 horas (tempo 0), entre 12 e 24 horas (tempo 12), entre 24 e 36 horas (tempo 24) e entre 36 e 48 horas (tempo 36) após a segunda aplicação do indicador. Amostras coletadas a cada defecação voluntária:



Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste t ($p < 0,05$). $R^2 = 99,41\%$.

Como expresso no gráfico, as médias de concentração fecal do NANOLIPE, nos tempos 12 e 24, foram estatisticamente iguais. Isso mostra que a excreção fecal do indicador foi estável, entre 12 e 36 horas após a administração da segunda cápsula. Ou seja, a excreção alcançou o chamado *steady state* nesse período, no qual também se obteve o pico de excreção do indicador nas fezes. O melhor horário de coleta, no entanto, foi definido como o período entre 24 e 36 horas após a segunda aplicação do NANOLIPE, ao invés de 12 a 36 horas. O intuito foi minimizar o tempo gasto em experimentos posteriores, tendo em vista a igualdade dos resultados de consumo obtidos entre essa forma de amostragem e a coleta total.

Portanto, se sugere nesse estudo que a melhor forma de amostragem das fezes, quando se utiliza o NANOLIPE, baseia-se na coleta de alíquotas do bolo fecal, a cada defecação voluntária, por um período consecutivo de 12 horas, entre 24 e 36 horas após a última aplicação do NANOLIPE. Vale lembrar que a amostragem de fezes, após defecação voluntária, interfere muito menos no comportamento animal, representando uma vantagem nesse tipo de estudo.

Um dado bastante interessante nesse estudo foi o resultado satisfatório da combinação dos indicadores NANOLIPE e Lignina Klason para estimativa do consumo de matéria seca (CMS). Essa combinação dispensa a aferição da digestibilidade por qualquer método. Basta quantificar nas fezes o NANOLIPE e a Lignina Klason, e, quantificar no alimento, a Lignina Klason (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração dos indicadores NANOLIPE e Lignina Klason (LK) nas amostras de fezes e de alimentos. Consumo de matéria seca (CMS) estimado pela equação de Silva (2007), com substituição do LIPE[®] pelo NANOLIPE (dose diária de 500 mg)*:

| Animal | Porção Considerada | NANOLIPE (g/kg) | LK (g/kg) | LK – NANOLIPE (g/kg) | CMS (kg) | CMS (% PV) |
|---------------|---------------------------|------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| 1 | Fezes | 0,1112 | 3,0139 | 2,9027 | 11,8544 | 1,9757 |
| 2 | Fezes | 0,1537 | 3,0899 | 2,9362 | 8,6756 | 1,6400 |
| 3 | Fezes | 0,1371 | 3,0561 | 2,9190 | 9,6690 | 2,1111 |
| 4 | Fezes | 0,1719 | 3,0844 | 2,9125 | 7,6944 | 1,7894 |
| 5 | Fezes | 0,1393 | 3,0334 | 2,8941 | 9,4351 | 2,1993 |
| - | Dieta total* | - | 1,1010 | 1,1010 | - | - |

*A dieta foi composta por 20% de concentrado e 80% de volumoso. A concentração da LK no concentrado foi considerada desprezível. Portanto, da concentração de LK obtida no volumoso (1,376 g/kg) 80% foi considerada como sendo a concentração de LK na dieta como um todo (1,101g/kg).

O CMS estimado pela combinação entre NANOLIPE e Lignina Klason também não diferiu do CMS real, estimado pela coleta total (Tabela 4). Esses resultados concordam com os obtidos por Silva (2007) e, mais uma vez, demonstram uma ferramenta simples e eficaz de determinação do consumo em bovinos, especialmente em condições difíceis, como nos ensaios com animais em pastejo.

Dois fatores ressaltam a importância dessa metodologia de utilização combinada do NANOLIPE e da Lignina Klason: (a) A amostragem da dieta é um dos grandes desafios nos estudos que objetivam estimar o consumo de animais sob pastejo, porém é essencial no caso de se utilizar um indicador de produção fecal, aliado à determinação da digestibilidade *in vitro* do alimento no laboratório. Sabe-se que a metodologia mais acurada nesse caso é a utilização de animais providos de fístula esofágica. No entanto, a contaminação do material com saliva é tida como um grande fator limitante da técnica, por interferir, significativamente, na posterior incubação *in vitro*. Sendo assim, a determinação da lignina Klason, a qual não sofre alterações pela presença da saliva contaminante ao alimento, em substituição à técnica *in vitro* de determinação da digestibilidade, representa uma saída para contornar a limitação com a amostragem via fístula esofágica; (b) Essa metodologia representa uma potencial técnica em substituição ao uso dos *n-alcenos*, os quais atualmente são de utilização muito limitada, principalmente devido ao seu alto custo.

A proteína bruta fecal foi útil nesse experimento para determinar o consumo, tendo seus resultados não diferidos da coleta total. No entanto, o modelo criado, muito provavelmente, se ajusta apenas a esse tipo de animais, recebendo esse tipo de dieta e nas mesmas condições de ambiente. Um modelo bem mais abrangente é essencial para estimativas futuras. O que se tem de concreto, nesse experimento, é o fato de que tal indicador é viável de ser utilizado e apresenta muitas vantagens, sendo a principal a simplicidade de análise no laboratório, no entanto tudo depende da criação de modelos mais abrangentes, e, portanto, mais confiáveis.

De acordo com Raymond (1969) três sérios erros podem estar envolvidos na aplicação prática dos métodos de indicador fecal, como a proteína bruta fecal: (a) existe a possibilidade que erros de aplicação possam surgir quando uma regressão baseada em medidas em galpão é aplicada no campo, devido às prováveis diferenças no nível de consumo da forragem nas duas situações; (b) é incorreta a pressuposição de que os erros foram distribuídos aleatoriamente na análise de regressão, e diferentes populações de alimentos mostram uma distribuição não aleatória acerca da linha geral de regressão; (c) recentes evidências questionam a premissa básica da técnica do indicador fecal, que a relação baseada na alimentação em galpão da forragem cortada pode ser usada para prever a digestibilidade daquela parte da forragem que o animal em pastejo seleciona no campo.

Holloway et al. (1981) encontraram que os indicadores fecais, como a proteína bruta fecal, não apresentam ampla aplicação devido às relações entre a PB_f e o consumo ou digestibilidade mudarem conforme as estações do ano, conteúdo de nitrogênio da forragem e a variação entre as espécies consumidas. Entretanto, no modelo de componentes da forragem como o extrato etéreo, constituintes da parede celular e matéria seca, juntamente com a proteína bruta fecal, minimiza esses problemas e aplicação desse indicador se torna possível.

2.4 – Conclusões

O NANOLIPE pode ser usado como indicador na estimativa de consumo de matéria seca em bovinos leiteiros.

A melhor forma de amostragem das fezes, para as estimativas de consumo com NANOLIPE, baseia-se na coleta de alíquotas do bolo fecal, eliminado voluntariamente, por um período consecutivo de 12 horas, o qual deve iniciar 24 horas após a segunda, e última, aplicação do referido indicador.

A combinação do NANOLIPE e da Lignina Klason, para estimativa do consumo, é válida, e simplifica ainda mais os estudos da digestão.

2.5 Referências Bibliográficas

DOVE, H., MAYES, R. W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 42, n. 6, p. 913-952, 1991.

HOLLOWAY, J. W.; ESTELL, R. E.; BUTTS, T. W. Relationship between fecal components and forage consumption and digestibility. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 52, p.836-848, 1981.

OLIVEIRA, L.; KOZLOSKY, G. V.; CHIESA, A. R.; HÁRTER, C. J.; LIMA, L. D.; JÚNIOR, R. L. C. Uso do nitrogênio fecal para estimar consumo por ruminantes: uma abordagem ensaios de digestibilidade com ovinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 44, 2007, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal, 2007.

OWENS, F. N.; HANSON, C. F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 9, p. 2605-2617, 1992.

PERIPOLLI, V. Uso do nitrogênio fecal para estimar o consumo e a digestibilidade em ruminantes em pastejo. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

RAYMOND, W. F. The nutritive value of forages crops. *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 21, p. 1-108, 1969.

SALIBA, E. O. S.; BARBOSA, G. S. S. C.; RODRIGUEZ, N. M.; COUTO FILHO, C. C. C.; MOREIRA, G. R.; GONÇALVES, N. C.; SILVA, F. A.; Utilization of nanotechnology to the development of a marker of fecal output in dairy cattle. In: 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH8), 2011, Aberystwyth, Wales, UK. Abstract published in *Advances in Animal Biosciences*, 2011.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; PILO-VELOSO, D. Purified lignin extraded from *Eucalyptus grandis* (PELI), used as an external marker in digestibility trials in various animal species. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., Porto Alegre, 2003. Proceedings... Porto Alegre: WAAP/ALPA/SBZ/UFRGS, 2003.

SILVA, J. J. *Indicadores de consumo total, consumo diferenciado e de cinética ruminal em bovinos leiteiros*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007, 78p. Tese (Doutorado em Zootecnia).

TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. A two stage technique for the in vitro digestion of forages crops. *Journal of British Grassland Society*, v. 18, n. 1, p. 104-111, 1963.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. New York: Cornell University Press, 1994, 476p.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO PARA QUANTIFICAÇÃO DO NANOLIPE EM FEZES DE BOVINOS LEITEIROS

RESUMO: Com o objetivo de se avaliar estatisticamente a linearidade do método de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, para quantificação do indicador NANOLIPE, em fezes de bovinos leiteiros, uma curva analítica em matriz foi criada. Definiram-se quatro níveis de concentração para avaliação da faixa linear de trabalho, sendo estes: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 miligramas de NANOLIPE por grama de fezes. A altura do pico de absorvância no número de onda $1035,62\text{ cm}^{-1}$ proporcionou a relação mais adequada à determinação do NANOLIPE nas fezes. Foram aplicados os testes: Ryan-Joiner, Durbin-Watson e Brown-Forsythe para verificar a normalidade, a independência e a homocedasticidade dos resíduos, respectivamente. A análise de variância demonstrou serem não significativos os desvios de linearidade. O valor do coeficiente de correlação de 0,9998, sustentado pela a avaliação estatística apresentada, é excelente.

Palavras-chave: indicador, produção fecal, consumo

STATISTICAL EVALUATION OF LINEARITY OF THE INFRARED SPECTROMETRY METHOD FOR QUANTIFICATION OF NANOLIPE IN FECES OF DAIRY CATTLE

ABSTRACT: In order to statistically evaluate the linearity of the method of infrared spectrometry with Fourier transform to quantify the marker NANOLIPE in feces of dairy cattle, an analytical curve in matrix was created. Four levels of concentration were defined to evaluate the linear range of work: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 milligrams of NANOLIPE per gram of feces. The height of the absorbance peak at wavenumber 1035.62 cm^{-1} provided the most appropriated relationship to determine NANOLIPE. Three tests were applied to ensure normality, independence and homoscedasticity of the residuum, respectively: Ryan-Joiner, Durbin-Watson and Brown-Forsythe. Analysis of variance showed that the deviations of the linearity were no significant. The value of the correlation coefficient of 0.9998, supported by the statistical analysis presented is excellent.

Keywords: marker, fecal output, intake

3.1 – Introdução

Saliba et al. (2003) desenvolveram um indicador externo, para estimativa do consumo e digestibilidade, a partir da lignina isolada do *Eucalyptus grandis*. Para tal, enriqueceram esse composto com grupamentos fenólicos, não comumente encontrados na lignina da dieta animal, obtendo assim um hidroxifenilpropano modificado e enriquecido, ao qual denominaram LIPE[®] (Lignina Isolada Purificada e Enriquecida). Recentemente, avanços metodológicos na obtenção do LIPE[®] permitiram a evolução do mesmo em um novo indicador, o qual foi chamado NANOLIPE (Saliba et al., 2011).

A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV) foi historicamente utilizada para quantificação do LIPE[®] e também foi o método de escolha para quantificação do NANOLIPE, pela semelhança química desses dois indicadores. Tal método compreende uma das principais técnicas instrumentais em análises químicas, sendo utilizado, principalmente, na caracterização de compostos orgânicos. Porém, atualmente, a técnica tem demonstrado eficiência em análises quantitativas, o que amplia, ainda mais, a sua aplicabilidade.

A técnica por espectrometria no infravermelho também oferece facilidade de preparo de amostra, rapidez na obtenção de resultados e menor impacto ambiental. Além disso, apresenta alta sensibilidade, requisito fundamental para a quantificação do NANOLIPE nas fezes bovinas, pois esse analito é encontrado, usualmente, em concentrações muito baixas, em torno de 0,1 miligramas por grama de fezes.

O desenvolvimento do método buscou a adequação às exigências de sua aplicação. Vale lembrar que a confiabilidade e a comparabilidade dos resultados obtidos são indispensáveis. Um dos pontos fundamentais para garantir a qualidade dos resultados consiste na avaliação da linearidade das curvas analíticas usadas nas determinações. Atualmente, esta avaliação passa por uma simples verificação do coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação no contexto do ensaio de linearidade é potencialmente enganador, e deve ser evitado (Thompson, 2005).

O protocolo IUPAC 2002 recomenda: “Apesar da sua atual utilização generalizada como uma indicação da qualidade do ajuste, o coeficiente de correlação é enganoso e inadequado como um teste de linearidade e não deve ser utilizado” (Thompson et al., 2002).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação, estatisticamente válida, da linearidade do método de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, para quantificação do NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros.

3.2 – Material e métodos

Foram utilizados: um espectrômetro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier, modelo Varian 800 FT-IR Scimitar Series; uma balança analítica Shimadzu AY220; indicador NANOLIPE, produzido pela P2S2[™]; amostras de fezes, de novilhas mestiças holandês-zebu, que foram pré-secas a 55°C por 72 horas e processadas em moinho tipo Willey, provido de peneira com crivos de 1 mm de diâmetro.

A faixa de trabalho do método foi escolhida de acordo com o conhecimento da concentração média das amostras na rotina: 0,05 a 0,20 miligramas de NANOLIPE por grama de fezes. Assim, definiram-se quatro níveis de concentração, neste intervalo, para avaliação da faixa linear de trabalho, sendo estes níveis: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 miligramas de NANOLIPE por grama de fezes. Os níveis foram escolhidos de forma igualmente espaçada para evitar pontos de alavanca no gráfico (*leverages*), e foram preparados de forma independente por três diferentes analistas em condições de repetibilidade. A determinação foi feita de forma aleatória (ordem aleatória de leitura) o que minimiza erros em níveis específicos.

Vale lembrar que as fezes possuem uma matriz de constituição extremamente complexa devido ao grande número de componentes presentes. Estes componentes podem gerar efeitos nas determinações. Devido a estas características, neste trabalho utilizou-se uma curva preparada em matriz.

A concentração do NANOLIPE foi obtida por leitura em infravermelho. O equipamento, programado para a realização de dez leituras de cada amostra, forneceu ao final da análise o espectro de infravermelho médio (com absorvância versus número de onda) e também a altura do pico no número de onda que proporcionou uma relação mais adequada à determinação do NANOLIPE nas fezes. Para realização das leituras foi feito um *background* utilizando um branco composto apenas por fezes.

3.3 – Resultados e Discussão

Após a realização dos procedimentos descritos anteriormente, obtiveram-se os resultados que estão apresentados na Tabela 1. A resposta está expressa em altura do pico em $1035,62 \text{ cm}^{-1}$, que foi o número de onda no qual se obteve maior linearidade entre a resposta e concentração do NANOLIPE.

Tabela 1 – Curva analítica para a quantificação do NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros:

| NANOLIPE fecal (mg/g) | Altura do pico em $1035,62 \text{ cm}^{-1}$ |
|-----------------------|---|
| 0,050 | 0,1815 |
| 0,050 | 0,1815 |
| 0,100 | 0,2263 |
| 0,100 | 0,2274 |
| 0,150 | 0,2746 |
| 0,150 | 0,2699 |
| 0,200 | 0,3130 |
| 0,200 | 0,3140 |
| 0,200 | 0,3123 |

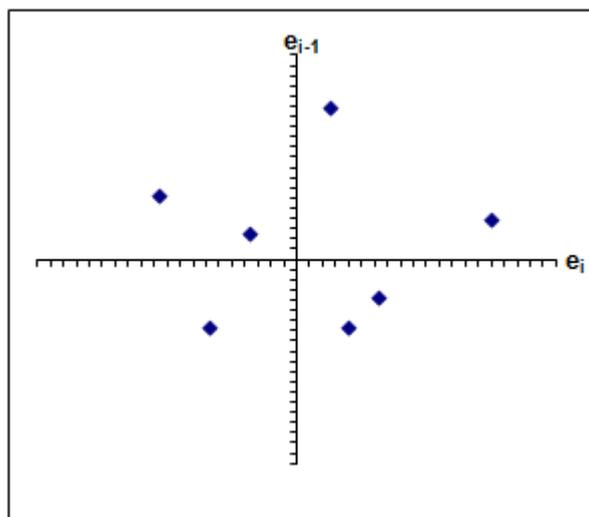
A regressão linear tem o inconveniente de ser muito sensível à presença de pontos *outliers* e/ou *leverages* (Souza e Junqueira, 2005). Inicialmente, verificou-se a existência, no conjunto de dados, algum *outlier* a ser excluído, através do teste de Resíduos Padronizado de Jackknife. Como a avaliação é baseada em testes de hipóteses estatísticas, realizou-se uma verificação básica das premissas relacionadas. Para o teste de linearidade as premissas são: os resíduos devem seguir a distribuição normal [$\xi \rightarrow N(0, \sigma^2)$], devem ser independentes [$Cov(\xi_i, \xi_j) = 0$] e homocedásticos [$Var(Y_i) = \sigma^2$]. Os testes para avaliação destas premissas foram respectivamente: Teste Ryan-Joiner, Teste de Durbin-Watson e Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado. Apenas após a avaliação destas premissas torna-se válida a regressão linear. Os resultados obtidos nesta etapa da avaliação estão apresentados na Tabela 2. A Figura 1 apresenta o Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), no qual fica evidente a independência entre os resíduos.

Tabela 2 – Avaliação das premissas para o estudo da linearidade da curva de NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros (0,05 a 0,20 mg/g):

| Parâmetro* | Curva analítica | Resultado da avaliação |
|-----------------------------|------------------------|---|
| Normalidade (R) | 0,9750 | Os resíduos seguem distribuição normal. |
| Valor crítico | 0,9248 | |
| Homocedasticidade (t_L) | -0,70 | Os resíduos são homocedásticos. |
| Valor crítico | 2,45 | |
| Independência (d) | 1,62 | Os resíduos são independentes. |
| p | >0,10 | |

*R= coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p= significância, t_L estatística T de Levene, d= estatística de Durbin-Watson.

Figura 1 – Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$) para avaliação das premissas do teste de linearidade:



Por meio de uma análise de variância demonstrou-se que o desvio de linearidade não é significativo. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na análise.

Tabela 3 - Análise de variância da linearidade para a curva de NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros (0,05 a 0,20 mg/g):

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Grau de Liberdade | Quadrado Médio |
|------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Regressão (R) | 2,27E-02 | 1 | 2,27E-02 |
| Resíduos (r) | 5,06E-06 | 6 | 8,43E-07 |
| Falta de Ajuste (f_{aj}) | 3,00E-06 | 2 | 1,50E-06 |
| Erro Puro (ep) | 2,06E-06 | 4 | 5,16E-07 |
| TOTAL | 2,27E-02 | 7 | |

Porcentagem de variação explicada = 99,97%. Porcentagem máxima de variação explicável = 0,9999%.

O resultado da razão entre as médias quadráticas apresentadas na Tabela 3, QM_R/QM_r é 4487,63. Este valor é muito superior ao valor crítico de $F_{1,6}$ 5,987 (95% de confiança) indicando que a regressão é estatisticamente significativa. O valor do quociente QM_{faj}/QM_{ep} igual 2,91 indica a qualidade do ajuste quando comparado ao valor crítico de $F_{2,4}$ que é 6,94 (95% de confiança). O valor do coeficiente de correlação de 0,9998, sustentado pela a avaliação estatística apresentada, é excelente. As Figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, o gráfico final com a curva analítica e o gráfico dos resíduos.

Figura 2 – Curva de calibração, para análise quantitativa do indicador NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros, por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier. Respostas correspondentes à altura do pico no comprimento de onda 1035,62 cm^{-1} :

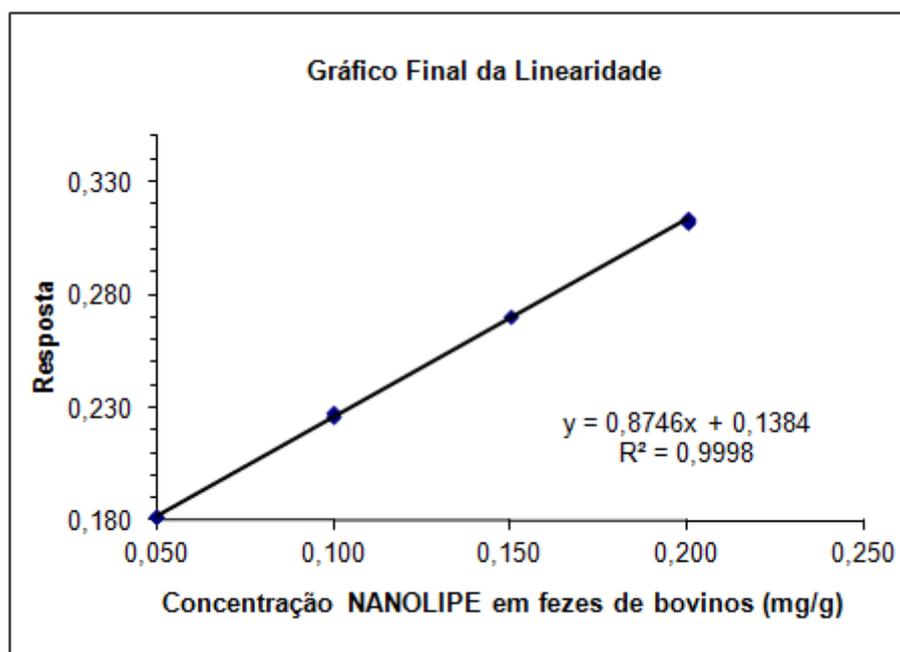
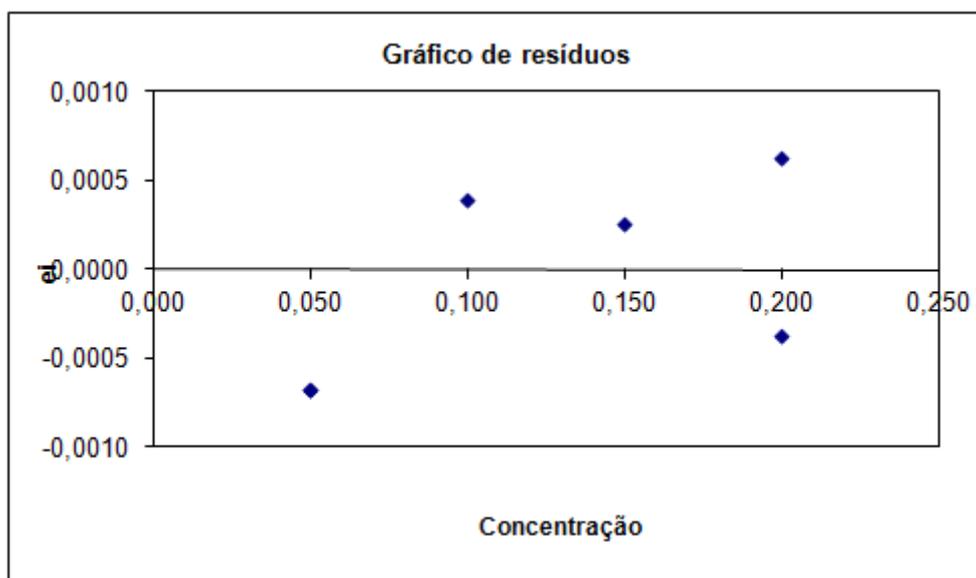


Figura 3 – Resíduos da curva de calibração para análise quantitativa do indicador NANOLIPE, em fezes de bovinos leiteiros, por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier:



A curva analítica obtida foi utilizada na determinação da concentração do NANOLIPE em amostras de fezes de novilhas mestiças holandês-zebu, que em última

análise, permitiu a determinação do consumo de matéria seca dos animais. Os resultados das determinações estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração média do indicador NANOLIPE (mg/g), obtida em amostras de fezes, coletadas entre 24 e 36 horas após a segunda, e última, aplicação do indicador. Produção de matéria seca fecal (PF) obtida a partir da fórmula: **PF em kg = (500 mg que foi a dose diária aplicada do NANOLIPE / concentração do indicador na matéria seca fecal em mg/g) / 1000**. Coeficiente de digestibilidade aparente *in vivo* da matéria seca (DIVMS), obtido por meio de coleta total em ensaio de cinco dias. Consumo de matéria seca (CMS), em relação ao peso vivo dos animais, estimado pelo NANOLIPE através da fórmula: **CMS em porcentagem do peso vivo = [(PF em kg / (100 – DIVMS em porcentagem)) / peso vivo do animal em kg] x 100**:

| Animal | NANOLIPE nas fezes (mg/g) | PF (kg) | DIVMS (%) | CMS (% PV) |
|--------|---------------------------------|---------|-----------|------------|
| 1 | 0,1112 | 4,4964 | 65,09 | 2,1467 |
| 2 | 0,1537 | 3,2531 | 65,23 | 1,7686 |
| 3 | 0,1371 | 3,6470 | 65,42 | 2,3027 |
| 4 | 0,1719 | 2,9087 | 67,16 | 2,0598 |
| 5 | 0,1393 | 3,5894 | 62,92 | 2,2564 |

Os dados de CMS expostos na Tabela 4 não diferiram do CMS real, obtido pela pesagem direta do alimento oferecido e das sobras, como descrito no **Capítulo 2**, fato esse que validou o NANOLIPE como indicador de consumo eficiente.

3.4 – Conclusão

A análise quantitativa da concentração do indicador NANOLIPE em fezes de bovinos leiteiros, por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, apresenta excelente linearidade no comprimento de onda $1035,62 \text{ cm}^{-1}$, e permite a utilização do referido indicador para estimativa do consumo daqueles animais.

3.5 – Referências Bibliográficas

SALIBA, E. O. S.; BARBOSA, G. S. S. C.; RODRIGUEZ, N. M.; COUTO FILHO, C. C. C.; MOREIRA, G. R.; GONÇALVES, N. C.; SILVA, F. A.; Utilization of nanotechnology to the development of a marker of fecal output in dairy cattle. In: 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH8), 2011, Aberystwyth, Wales, UK. Abstract published in *Advances in Animal Biosciences*, 2011.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; PILO-VELOSO, D. Purified lignin extraded from *Eucalyptus grandis* (PELI), used as an external marker in digestibility trials in various animal species. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., Porto Alegre, 2003. Proceedings... Porto Alegre: WAAP/ALPA/SBZ/UFRGS, 2003 (Disponível em CD-ROM).

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

Thompson, M. Analytical Methods Committee. *AMCTB* n. 3. Revised December 2005.

Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v.74, p. 835-855 -2002.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho descrito no **Capítulo 2**, além de validar o NANOLIPE, como indicador de consumo em bovinos leiteiros, demonstrou que a fórmula proposta por Silva (2007), de utilização combinada dos indicadores, interno e externo, para estimativa do consumo, é válida e extremamente útil. Essa combinação, do NANOLIPE (uma lignina modificada) e da lignina Klason, também revela a importância das ligninas, no contexto geral de estudos com indicadores.

Na revisão de literatura foi citada a importância dos modelos matemáticos para o diagnóstico nutricional dos rebanhos e formulação eficiente de dietas. Sendo assim, a combinação de um indicador de consumo com um software computacional, gerenciador de um modelo robusto de predição, se constituiria um pacote essencial aos nutricionistas, principalmente nos sistemas de criação extensiva, característicos do nosso país. Essa é a idéia do chamado kit AVANUTRI, ou seja, a combinação do LIPE[®] com um software de avaliação nutricional do rebanho. No entanto, pesquisas futuras são necessárias para avaliação e constante aprimoramento desse sistema, incluindo a utilização do NANOLIPE em substituição ao LIPE[®].

Vale lembrar também que a utilização da lignina purificada, enriquecida, modificada e nano particulada, NANOLIPE, como indicador para estimativa do consumo é uma iniciativa única e possui enorme potencial de utilização em todo o mundo. Esses fatos, aliados aos bons resultados obtidos até agora, justificam mais pesquisas para validação do NANOLIPE nas diferentes espécies, em diferentes dietas e ambientes.

Como exposto do **Capítulo 3**, a análise do NANOLIPE pela espectrometria no infravermelho representa uma enorme vantagem em sua utilização como indicador, haja vista a rapidez e precisão da análise. O potencial de utilização desse tipo de análise química, em nutrição animal, é enorme, no entanto, ainda pouco aplicado na prática. Pesquisas futuras devem buscar validar esse tipo de metodologia, para quantificação de muitos dos constituintes da matéria orgânica, vegetal e animal.

Referência Bibliográfica Citada

SILVA, J. J. *Indicadores de consumo total, consumo diferenciado e de cinética ruminal em bovinos leiteiros*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007, 78p. Tese (Doutorado em Zootecnia).