



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Girlene Cordeiro de Lima Santos

Serra Talhada
2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

(USO DE TÉCNICAS LABORATORIAIS NA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
RUMINANTES EM AMBIENTES SEMIÁRIDOS / PRODUÇÃO ANIMAL)

Relatório apresentado ao curso de
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do grau
de Bacharel em Zootecnia.

Professor orientador: Ana Maria
Duarte Cabral
Supervisor de estágio: Salete Alves
de Moraes

Girlene Cordeiro de Lima Santos

Serra Talhada
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

S237u Santos, Girlene Cordeiro de Lima

Uso de técnicas laboratoriais na avaliação da produção de ruminantes em ambientes semiáridos: Produção animal/ Girlene Cordeiro de Lima Santos. – Serra Talhada, 2019.

38 f.: il.

Orientadora: Ana Maria Duarte Cabral

Relatório (Graduação em Bacharelado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2019.

Inclui referências.

1. Análise bromatológica. 2. Aquecimento global. 3. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. I. Cabral, Ana Maria Duarte, orient. II. Título.

CDD 636

Relatório apresentado e aprovado em 18 de JANEIRO de 2019 pela comissão examinadora
composta por:

Dr^a Ana Maria Duarte Cabral

Dr^a Valéria Louro Ribeiro

Dr^a Ednéia de Lucena Vieira

Serra Talhada
2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu glorioso Deus, por me conceder o privilégio da vida e por está comigo em todos os momentos, por me conceder saúde, força e paz para que eu pudesse desempenhar bem minhas demandas e atribuições acadêmicas.

À minha mãe, Maria de Lourdes de Lima, por ter sido a minha base me dando o apoio necessário durante a minha graduação, por seus os incentivos e orientações durante toda a minha trajetória, por todo o acolhimento e comprometimento com a minha formação.

Aos meus irmãos Gerônimo Bartolomeu de Lima e Geraldo Arcanjo de Lima, por terem acreditado em mim e pela contribuição emocional a qual me deram nos momentos de dificuldades, pelas demonstrações de carinho e apoio a que se propuseram a me oferecer em todas as etapas de minha vida.

À minha orientadora Dra. Ana Maria Duarte Cabral, por todo o apoio me dado, tanto emocional quanto profissional, por ter me dado a oportunidade de concluir o curso com uma melhor qualificação e por todos os conselhos e orientações.

À minha supervisora Salete Alves de Moraes pela oportunidade e respeito.

A todos os meus colegas de curso, pelo companheirismo e apoio, em especial as minhas amigas Ethiana Freire e Mary Adriélla Cristianny Gregório por terem estado comigo tanto em momentos de alegria quando em momentos de dificuldades.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade Semiárido, pela oportunidade do estágio, e aos funcionários que tiveram diretamente envolvidos na minha aprendizagem.

A todo o corpo docente do curso de zootecnia, por terem contribuído no meu processo de formação.

À coordenação do curso de Bacharelado em Zootecnia, por agilizar o cumprimento das etapas burocráticas ao longo do curso.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realizar minha graduação.

À Unidade Acadêmica de Serra Talhada, por ter me acolhido e por ter me dado todo o suporte necessário para que eu pudesse concluir a graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FIGURAS	
1. RESUMO	
2. INTRODUÇÃO GERAL	9
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
3.1. INFORMAÇÕES GERAIS	13
3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES.....	14
3.2.1. Solução de ácido bórico (H_3BO_3) a 2%.....	14
3.2.2. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%	14
3.2.3. Solução para determinação de FDN	15
3.2.4. Solução para determinação de FDA	16
3.2.5. Solução para determinação de Lignina.....	16
3.2.6. Mistura catalizadora	17
3.3. CONDUÇÃO DE ANÁLISES BROMATOLÓGICAS.....	18
3.3.1. Determinação da matéria seca em duas etapas.....	18
3.3.1.1. Pré-secagem a 55°C	18
3.3.1.2. Determinação de matéria seca a 105°C.....	20
3.3.2. Determinação da matéria mineral (%MM) e da matéria orgânica (%MO).....	21
3.3.3. Determinação da fibra em detergente neutro (FDN).....	22
3.3.4. Determinação da fibra em detergente ácido (FDA).....	24
3.3.5. Determinação da proteína bruta (dosagem de nitrogênio total)	25
3.3.6. Determinação de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS).....	27
3.3. DETERMINAÇÃO DE DIÓXIDO DE TITÂNIO.....	29
3.4. ANÁLISE DE CREATININA EM CAPRINOS	30
3.5. NITROGÊNIO DE URINA	31
3.6. NITROGÊNIO AMONIACAL	32
3.7. EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE.....	32
3.8. LEITURA DE METANO (CH_4)	33
4. DIFICULDADES ENCONTRADAS	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes do branco, teste e padrão usados na análise de creatinina de urina de cabras	31
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) pesagem do ácido bórico; (B), mistura do ácido bórico com água destilada; (C) mistura de verde bromocresol na solução; e, (D) mistura de vermelho de metila na solução. Fonte: (SANTOS, 2018).....	15
Figura 2. (A) hidróxido de sódio; e, (B) mistura de hidróxido de sódio. Fonte: (SANTOS, 2018).....	15
Figura 3. (A) reagentes utilizados; (B) pesagem dos reagentes; (C) medição do etileno glicol no bloco digestor; e, (D) mistura dos reagentes. Fonte: (SANTOS, 2018).....	16
Figura 4. (A) Pesagem do Cetil trimetil amônio brometo; e, (B) mistura dos reagentes. Fonte: (SANTOS, 2018).	17
Figura 5. (A) medição do ácido sulfúrico; e, (B) mistura do ácido sulfúrico na água gelada. Fonte: (SANTOS, 2018).....	17
Figura 6. (A) pesagem do sulfato de cobre pentaidratado; (B) grau e pistilo; e, (C) maceração do sulfato de cobre pentaidratado Fonte: (SANTOS, 2018).	18
Figura 7. (A) bandejas com as amostras secas em estufas; (B) moagem das amostras; (C) moinho de facas; e, (D) amostras moídas Fonte: (SANTOS, 2018).	19
Figura 8. (A) cadinhos no dessecador; e, (B) balança analítica usada para pesar os cadinhos Fonte: (SANTOS, 2018).....	20
Figura 9. (A) preparo dos sacos; (B) determinador de fibra; (C) galeria com as amostras; e, (D) amostras imersas em acetona. Fonte: (SANTOS, 2018).....	24
Figura 10. (A) ácido bórico nos erlenmyer; (B) medição do hidróxido de sódio a ser colocado destilador; (C) remoção do tubo do destilador; e, (D) titulação da amostra, Fonte: (SANTOS, 2018).....	26
Figura 11. (A) filtragem do líquido ruminal realizada em campo; (B) medidor de PH; (C) preparação das amostras; e, (D) injeção de CO ₂ nas amostras. Fonte: SANTOS (2018).	29
Figura 12. (A) amostras; (B) inserção das amostras no espectrofotômetro; (C) cubetas com amostras e branco no aparelho espectrofotômetro; e, (D) leitura das amostras. Fonte: (RIBEIRO, 2018).....	30
Figura 13. (A) adição de água destilada nas amostras de urina e, (B) banho maria das amostras e do reagente Fonte: (RIBEIRO, 2018).	31
Figura 14. (A) inserção de água destilada nas amostras; (B) medição do hidróxido de sódio para inserção no destilador; (C) destilação; e, (D) titulação da amostra. Fonte: (SANTOS, 2018).....	32
Figura 15. (A) líquido filtrado; e, (B) destilação do N-amoniacal. Fonte: (SANTOS, 2018)..	33
Figura 16. (A) amostras de metano; (B) cromatógrafo; (C) inserção da seringa contendo a amostra; e, (D) sistema do cromatógrafo no computador. Fonte: (SANTOS, 2018).....	33

1. RESUMO

Neste relatório estão descritas as atividades conduzidas durante o estágio supervisionado obrigatório (ESO) realizado, de 18 de setembro a 07 de dezembro de 2018, totalizando a carga horária de 330 h, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, Unidade Embrapa Semiárido, localizada no município de Petrolina, PE. Durante este período foram aplicadas técnicas laboratoriais de avaliação do desempenho vegetal e animal que compõem sistemas de produção de ruminantes em ambiente semiárido, garantindo assim, maior fixação dos assuntos abordados em sala de aula da graduação do curso Bacharelado em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada. As atividades foram realizadas através de análises desenvolvidas nos laboratórios de Nutrição Animal, Microbiologia do Solo e Cromatografia da Embrapa Semiárido e, na Universidade Federal do Vale do São Francisco. As análises fizeram parte de projetos de pesquisa de alunos de graduação e de mestrado acompanhados por pesquisadores da Embrapa Semiárido. Outras atividades das análises fizeram parte do projeto Bem Diverso, vinculado a esta Empresa. Nesse ESO foram preparadas soluções de ácido bórico (H_3BO_3) a 2%, hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, detergente neutro, detergente ácido e solução de lignina. Além de soluções ainda houve o preparo de uma mistura catalizadora. Etapas de análises bromatológicas de plantas forrageiras foram treinadas, tais como a pré-secagem da matéria verde a 55°C, matéria seca a 105°C, cinza, matéria orgânica, FDN, FDA, proteína bruta (dosagem de nitrogênio total) e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca. O método de medição de dióxido de titânio foi usado como indicador de consumo e da digestibilidade de nutrientes em fêmeas caprinas mantidas sob pastejo em área de Caatinga e suplementadas com diferentes níveis de concentrado. Ainda neste experimento foi quantificada a creatinina e o nitrogênio amoniacal na urina das cabras. A extração de DNA de bactérias e a determinação de nitrogênio foram feitas em silagem de guandu, milho, milheto e de suas associações. A emissão de metano na silagem da rebrota de sorgo quando adicionados de feno de espécies vegetais foi medida a partir de amostras de ar coletadas. Para a implementação de cada técnica foram manuseados vários reagentes e equipamentos. Houve, sempre, a necessidade da digitalização de leituras em planilhas eletrônicas para mensuração dos resultados finais das análises. Estes métodos foram usados com vistas à avaliação dos sistemas de produção adaptados pela empresa para a criação de ruminantes nas condições do Semiárido brasileiro. Esta experiência foi decisiva para minha qualificação profissional e no direcionamento do meu aperfeiçoamento em nível de pós-graduação.

Palavras-chave: análise bromatológica, aquecimento global, nitrogênio amoniacal, técnicas laboratoriais.

2. INTRODUÇÃO GERAL

As discussões sobre o aquecimento global tem se intensificado desde a década de 90 do século passado com o surgimento do 1º relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas. Agora no seu 5º relatório é consenso sobre os danos significativos e irreversíveis que este fenômeno pode trazer para várias atividades humanas, inclusive ao setor agropecuário. Nos últimos 120 anos, a temperatura média global aumentou 0,8°C em decorrência, sobretudo da intensificação da atividade industrial, que culminou na maior emissão de gases do efeito estufa (GEE) como dióxido de carbono (CO₂), óxido nitroso (N₂O) e metano (CH₄) (NOBRE; REID; VEIGA, 2012). Dentre estes gases, o CH₄ é o mais associado à pecuária, uma vez que no processo fermentativo do rúmen dos animais. As bactérias *Archaeas metanogênicas* promovem a degradação dos carboidratos e há formação desse gás (MOURA et al., 2015). Neste sentido, o tipo de alimento oferecido ao animal ruminante pode provocar o aumento do aquecimento global. Logo, é importante a formulação de dietas que minimizem a emissão de gases, e que não impactem na produção e no retorno econômico ao produtor (SALMAN et al., 2010).

Uma das regiões mais vulneráveis ao aquecimento global é o Nordeste brasileiro, uma vez que boa parte de sua extensão é formada por ambiente semiárido. O Nordeste possui 1,56 milhão de km², o que representa 18% do território brasileiro. Por sua vez, o semiárido representa 70% desta extensão, a qual possui médias anuais de temperatura de 23 a 27°C, com evaporação de 2.000 mm ao ano e 50% de média de umidade (MOURA et al., 2007). De acordo com Araújo (2011), o semiárido brasileiro possui clima quente e seco com precipitações pluviométricas entre 280 a 800 mm. A estação chuvosa dura em torno de 3 a 5 meses e o período seco por volta 7 a 9 meses. 80% dos solos são predominantemente rasos com rochas cristalinas, que dificulta o acúmulo de água (ZANELLA, 2014). Essas condições edafoclimáticas entram a pecuária regional, uma vez que grande parte do rebanho é criado em manejo extensivo com principal fonte alimentar oriunda das plantas da Caatinga. Além disso, o elevado déficit hídrico, por causa das altas temperaturas e baixas chuvas, inibe em grande parte do ano a disponibilidade de alimentos. Logo, faz-se necessários estudos de sistemas de produção adaptados a esses ambientes com o objetivo de garantir a alimentação dos animais, sobretudo diante dos cenários de aquecimento global.

A escolha do tipo de sistema de produção é um fator importante, não apenas quando se trata da disponibilidade de alimentos, mas também pelos impactos que esta atividade pode

causar ao meio ambiente. Atualmente, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas para melhorar o uso desses sistemas e, torná-los altamente sustentável.

De acordo com o regime alimentar, os sistemas de produção podem ser: extensivo (sistema apenas com pastagens nativas e cultivadas); semi-intensivo (pastagens nativas e cultivadas com suplemento minerais, proteico-energéticos a pasto); e, intensivo (pastagens com suplementação e confinamento) (CEZAR et al., 2005).

Outras opções sustentáveis são os sistemas agroflorestais (SAFs), que de acordo Machado; Balbino e Ceccon (2011), o uso da terra, as árvores, a agricultura e, ou, animais possuem uma comunicação ecológica ajustada entre as atividades que o compõem. Neste tipo de sistema, tem-se as seguintes derivações: agropastoril (agricultura e pecuária); silvipastoril (floresta e pecuária); agrossilviculturais ou silviagrícolas (agricultura e floresta); e agrossilvipastoris (agricultura, floresta e pecuária). Machado, Balbino e Ceccon (2011) ainda citam que esses sistemas podem ser também classificados como: interação lavoura-pecuária ou agropastoril; interação lavoura, pecuária, floresta ou agrossilvipastoris; interação pecuária-floresta ou silvipastoril; e interação lavoura-pecuária-floresta ou silviagrícola. O sistema de integração lavoura pecuária-floresta (ILPF) utiliza-se de pecuária e agricultura associados à vegetação arbórea (FIGUEIREDO; OLIVEIRA, 2015), de tal forma que beneficia o estado físico de consistência e porosidade do solo e o acúmulo de carbono orgânico quando comparado aos sistemas convencionais e ou de floresta secundária (SALES et al., 2018).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, Unidade Semiárido, formou um grupo multidisciplinar de pesquisadores que têm adaptado esses sistemas integrados para a produção de ruminantes nas condições edafoclimáticas do Semiárido brasileiro, objetivando o plano ABC (agricultura de baixa emissão de carbono). Levando em consideração que para cada tipo de ambiente, os diversos sistemas de produção se comportam de distintas maneiras, por causa das características climáticas, tipo solo e manejo adotado, a avaliação contínua destes por meio de técnicas de acompanhamento do desempenho vegetal e animal é muito importante na tomada de decisão de qual sistema deve ser adotado. Neste sentido, análises bromatológicas, extração de DNA de bactérias e de nitrogênio amoniacal em material vegetal, medição da emissão de metano, dióxido de titânio (TiO₂) fecal, creatinina e nitrogênio da urina dos animais são algumas técnicas laboratoriais utilizadas para esse fim.

As técnicas laboratoriais como análises bromatológicas de alimentos são de grande valia na produção animal, uma vez que é possível conhecer a sua composição nutricional, visando a

melhor escolha no momento da oferta ao animal (BERALDO; ARAÚJO, 2017). Outras técnicas utilizadas para avaliação, mas durante o processo de conservação de forragens, é a quantificação de nitrogênio amoniacal presente nas silagens. Vários autores citam que a quantidade de nitrogênio amoniacal pode indicar uma boa ou má qualidade da silagem (BUMBIERIS JUNIOR et al., 2008; COAN et al., 2007; PAZIANI, 2004). Ainda na silagem, a mensuração e identificação de bactérias são importantes, visto que é desejável a presença de bactérias que favorecem o meio fermentativo e daquelas indesejáveis que podem comprometer a qualidade da silagem (BUMBIERIS JUNIOR et al., 2008; COAN et al., 2007; PAZIANI, 2004). Logo, a aplicação da técnica de extração de DNA de bactérias é de extrema relevância.

É possível ainda avaliar o alimento através do balanço de nitrogênio na urina do animal. Com o excesso de amônia no rumem, há aumento de sua excreção, causando custo energético e, como consequência, a perda de nitrogênio metabólico. A partir da técnica de balanço de nitrogênio na urina é possível quantificar a sua fração metabólica, comparando-a com a dieta ofertada ao animal (CORDEIRO, 2008; TOSTO et al., 2016). Através da urina animal, ainda é possível a mensuração de creatinina. Com alteração da creatinina sérica ocorre um aumento das funções pré-reaais ou mudanças musculares por baixas quantidades de sangue, o que causa uma redução da filtração glomerular (FERNANDES; LARSSON, 2000).

A qualidade do alimento é muito importante, ao passo que, a digestibilidade do mesmo, ou seja, o quanto o animal consegue aproveitar de um determinado alimento para atender suas demandas nutricionais é crucial. Uma das técnicas utilizadas para determinar a digestibilidade das forragens é por meio da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (GOES, 2010), outra técnica também muito utilizada é uso de marcador externo como o dióxido de titânio (TiO_2), o qual permite conhecer o consumo e a digestibilidade dos animais (DIAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012).

Além da qualidade do alimento é relevante conhecer como ele pode contribuir na produção de CH_4 durante o processo fermentativo no rumem do animal, tendo em vista que este gás é um dos principais do efeito estufa. Ao mesmo tempo em que, os animais ruminantes perdem energia durante o processo de formação desse gás (PEDREIRA et al., 2004). Portanto, conhecer a composição do alimento através de análises laboratoriais permite escolher um alimento capaz melhorar a eficiência alimentar do animal, com menor emissão de CH_4 . Existem algumas técnicas utilizadas para quantificação de CH_4 emitido pelo animal, tais

como: técnica de câmara respirométrica, técnica do marcador hexafluoreto de enxofre (SF₆), técnica *in vitro* de produção de gases para medições de metano (TIVPG), técnica de marcador interno CO₂ (MOURA et al., 2015).

Nos vegetais, Costa (2006), estudando métodos para a avaliação das emissões de metano no sistema solo-atmosfera, citam que para quantificação em laboratório desse gás pode ser feito utilizando analisadores de infravermelho e cromatografia gasosa. Zanoni et al. (2015) realizaram trabalho sobre emissão de metano por decomposição de resíduo florestal, concluindo que resíduo florestal contribui no aumento de emissão de metano, induzindo a necessidade de avaliação em vários tipos de sistemas de produção.

Com base no exposto, objetivou-se por meio deste relatório descrever as atividades conduzidas durante o estágio supervisionado obrigatório (ESO) na Embrapa Semiárido, quanto ao uso de técnicas laboratoriais de avaliação do desempenho de vegetais e de animais que compõem sistemas de produção em ambiente semiárido, garantindo assim, maior fixação dos assuntos abordados em sala de aula durante a graduação do curso bacharelado em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, na Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

3.1. INFORMAÇÕES GERAIS

O ESO realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, Unidade Embrapa Semiárido, localizada no município de Petrolina, PE, rodovia BR-428, Km 152, Zona Rural, ocorreu no período de 18 de setembro a 07 de dezembro de 2018, totalizando a carga horária de 330 horas. Este foi supervisionado pela pesquisadora Dr^a Salete Alves de Moraes da área de Sistemas Sustentáveis de Produção Animal, e orientado pela Dr^a Ana Maria Duarte Cabral, professora do curso de Bacharelado em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, na Unidade Acadêmica de Serra Talhada - UAST.

As atividades foram desenvolvidas através de análises conduzidas nos laboratórios de Nutrição Animal, Microbiologia do Solo e Cromatografia da Embrapa Semiárido e, algumas outras realizadas na Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF. Seguiu-se as regras de boas práticas por meio do uso de jaleco, luvas e sapato fechado. Para algumas atividades também foram utilizados protetor auricular, óculos e máscara.

As análises realizadas fazem parte das pesquisas de alunos de graduação e mestrado acompanhadas por pesquisadores da Embrapa Semiárido, além do projeto Bem Diverso, vinculado a esta Empresa, do qual foram realizadas análises de amostras de várias plantas forrageiras, tais como capim elefante, maniva de mandioca, mucilagem de sisal, angico de caroço, macambira, silagem de milho, (pelo, amêndoa e torta de licuri), faveleira, icó, catingueira, maniçoba, atriplex, e, palma gigante e doce.

As análises bromatológicas e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) conduzidas no estágio fizeram parte do projeto Bem Diverso. A extração de DNA de bactérias e nitrogênio amoniacal fez parte do trabalho de conclusão de curso da discente Ana Thaíres Pereira de Araújo, que teve como objetivo de avaliar características fermentativas, microbiológicas e bromatológicas de silagens mistas de gramíneas e leguminosas, utilizando silagens de guandu, milho e milheto, e de suas associações. A extração de DNA de bactérias foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo e as análises de nitrogênio amoniacal no LANA da Embrapa Semiárido.

A quantificação de dióxido de titânio fecal, creatinina e nitrogênio da urina de animais fez parte do trabalho de dissertação da mestrande Rejane Ribeiro da Universidade Federal do Vale São Francisco. As análises de creatinina foram realizadas nesta própria instituição, já a

quantificação de dióxido de titânio fecal foi realizada no laboratório de solos e a análise de nitrogênio de urina no LANA da Embrapa Semiárido.

A leitura de CH₄ em material vegetal foi realizada em laboratório de cromatografia para cumprimento de pesquisa que teve como objetivo a avaliação da inclusão de feno de espécies vegetais durante a ensilagem da rebrota de sorgo.

As atividades aqui detalhadas foram ordenadas com base nas metodologias aplicadas, sem um critério cronológico, uma vez que muitas ações foram simultaneamente conduzidas ao longo de vários dias ou semanas.

3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES

3.2.1. Solução de ácido bórico (H₃BO₃) a 2%

- Equipamentos: 01 agitador de soluções AP59, 01 agitador magnético, e 01 balança com precisão de 0,0001 g.
- Materiais: 02 balões volumétricos de 2.000 ml e 01 Becker de 4.000 ml.
- Reagentes: 40 g de ácido bórico, 1.200 ml de água, 12 ml de verde bromocresol a 0,1% e 30 ml de vermelho de metil.
- Preparo: Inicialmente, pesou-se 40 g de ácido bórico e foi colocado em um béquer de 2.000 ml contendo 1.200 ml de água para aquecimento e mistura da solução até dissolver. Após isso, adicionou-se 12 ml de verde bromocresol a 0,1 % e 30 ml de vermelho de metila (Figura 1), antes preparados. Em seguida, transferiu-se a solução para outro béquer de 2.000 ml para esfriar, aferir, homogeneizar e armazenar em um novo recipiente para uso posterior.

3.2.2. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%

- Equipamentos: 01 bloco digestor com temperatura controlada até 400°C.
- Materiais: 01 béquer de 4.000 ml, e 01 bastão de vidro.
- Reagentes: 2.000 ml de água e, 1.000g de hidróxido de sódio.
- Preparo: mediu-se 2.000 ml de água e foi transferida para um béquer de 4.000 ml. Em seguida, na capela, foi acrescentada 1.000 g de hidróxido de sódio, mexendo com um bastão de vidro (Figura 2), esperar esfriar, para então, guardar em novo recipiente para posterior uso.

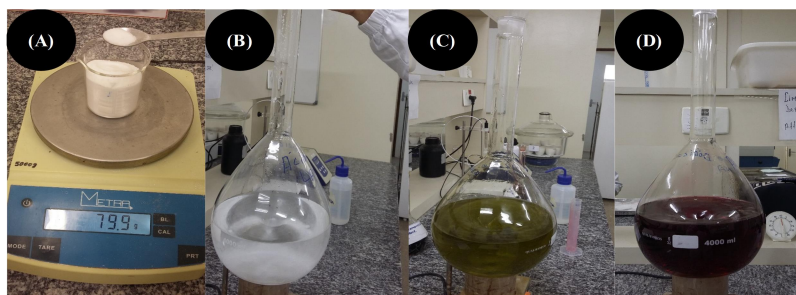


Figura 1. (A) pesagem do ácido bórico; (B), mistura do ácido bórico com água destilada; (C) mistura de verde bromocresol na solução; e, (D) mistura de vermelho de metila na solução. Fonte: (SANTOS, 2018).

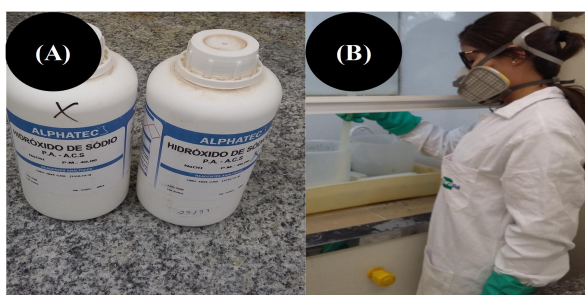


Figura 2. (A) hidróxido de sódio; e, (B) mistura de hidróxido de sódio. Fonte: (SANTOS, 2018).

3.2.3. Solução para determinação de FDN

- Equipamentos: 01 agitador magnético, e 01 balança de precisão de 0,0001g.
- Materiais: 01 becker de 1.000 ml, 01 balão volumétrico de 1.000 ml, 01 bastão de vidro, 01 barra magnética, e 01 pisseta.
- Reagentes: 1 L de água destilada, 30 g de lauril sulfato de sódio, 10 ml de etileno glicol, 18,60 g de EDTA de sódio (2H₂O), 6,81 g de borato de sódio (10H₂O), e 4,56 g de fosfato de sódio anidro.
- Preparo: primeiro, pesou-se individualmente, todos os reagentes em distintos recipientes, para em seguida, adicioná-los em um béquer de 1.000 ml contendo 400 ml de água morna destilada. Posteriormente, para remoção dos resíduos dos reagentes nos recipientes, todos foram lavados com auxílio de uma pisseta, usando água destilada. Em seguida, mexeu-se a solução cuidadosamente (Figura 3) e colocou-se a solução em balão volumétrico de 1.000 ml, para então, agitar e deixar em repouso para que os reagentes pudessem reagir.

3.2.4. Solução para determinação de FDA

- Equipamentos: 01 agitador magnético, 01 balança de precisão de 0,0001g e 01 bloco digestor com temperatura controlada até 400°C.

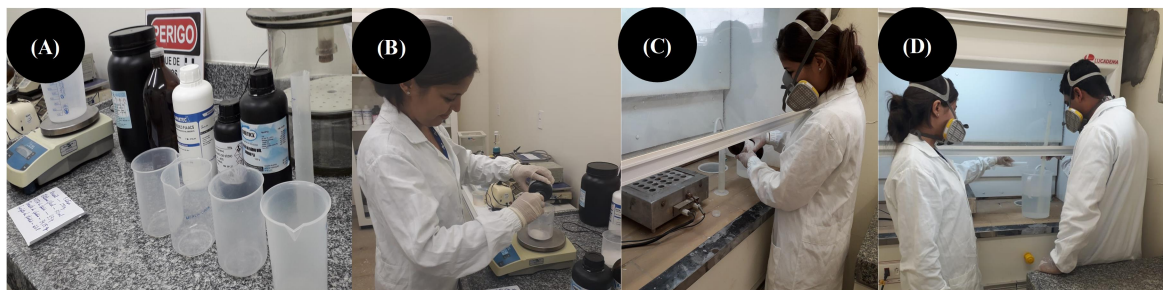


Figura 3. (A) reagentes utilizados; (B) pesagem dos reagentes; (C) medição do etileno glicol no bloco digestor; e, (D) mistura dos reagentes. Fonte: (SANTOS, 2018)

- Materiais: 01 becker de 1.000 ml, 01 balão volumétrico de 1.000ml, 01 bastão de vidro e 01 barra magnética.
- Reagentes: ácido sulfúrico (H_2SO_4) e Cetil trimetil amônio brometo (CTAB).
- Preparo: Para preparação da solução, adicionou-se, em um béquer de 1.000 ml com 500 ml de água, 28,5 ml de ácido sulfúrico medido por meio de uma proveta de 100 ml. Posteriormente, pesou-se 20,4 g de Cetil trimetil amônio brometo (CTAB) e foi transferido lentamente para o béquer que possuía uma solução de H_2SO_4 . Sem seguida, esta solução foi colocada em balão volumétrico de 1.000 ml para medição, agitação e repouso visando a interação entre os reagentes. Esse procedimento foi feito em ambiente de exaustão forçada, utilizando luvas e máscara como pode ser observado na Figura 4.

3.2.5. Solução para determinação de Lignina

- Materiais: béquer de vidro, blocos de gelo e bandeja.
- Reagentes: 415 ml de água destilada e 663 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
- Preparo: Na elaboração desta solução, colocou-se 415 ml de água destilada para congelar em um béquer de vidro.



Figura 4. (A) Pesagem do Cetil trimetil amônio brometo; e, (B) mistura dos reagentes. Fonte: (SANTOS, 2018).

Posteriormente, o béquer com a água congelada foi acomodado em uma bandeja contendo água e blocos de gelo (Figura 5) e aos poucos, foi adicionado 663 ml de ácido sulfúrico sem deixar a água ferver. Esperou-se uma hora para poder usar a solução, sendo que para cada saco de amostra utilizou-se 10 ml da solução.

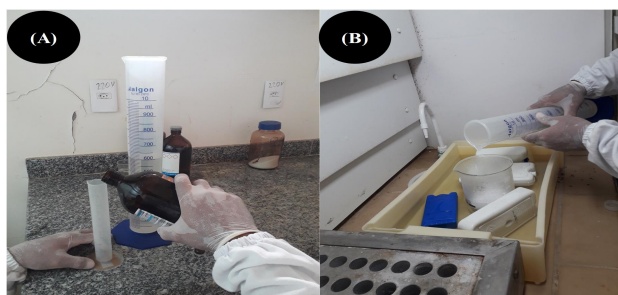


Figura 5. (A) medição do ácido sulfúrico; e, (B) mistura do ácido sulfúrico na água gelada. Fonte: (SANTOS, 2018).

3.2.6. Mistura catalizadora

- Equipamentos: balança de precisão de 0,0001g.
- Materiais: 02 béqueres de vidro e 01 grau e pistilo de porcelana.
- Reagentes: 10 g sulfato de cobre pentaidratado P.A. ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 1000g de sulfato de sódio anidro P.A. (Na_2SO_4).
- Preparo: conforme Figura 6, pesou-se em uma balança analítica, 10 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para cada 1000 g de sulfato de sódio.



Figura 6. (A) pesagem do sulfato de cobre pentaidratado; (B) grau e pistilo; e, (C) maceração do sulfato de cobre pentaidratado Fonte: (SANTOS, 2018).

O $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foi macerado aos poucos até perder a cor azul e misturado ao sulfato de sódio, repetindo este procedimento até o total preparo da solução. Depois a mistura foi armazenada em recipiente para uso posterior.

3.3. CONDUÇÃO DE ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

3.3.1. Determinação da matéria seca em duas etapas

3.3.1.1. Pré-secagem a 55°C

Nesta etapa de pré-secagem, denominada ASA (amostra seca ao ar), o objetivo é remover parcialmente a quantidade de água presente na matéria verde. A sua determinação é necessária para a condução das demais análises bromatológicas (proteína bruta, extrato etéreo, carboidratos estruturais e matéria mineral). Nas dietas de ruminantes, a MS pode variar de 10 a 80% (MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015).

Durante o estágio, este método foi procedido de acordo com a metodologia descrita em Silva e Queiroz (2002), utilizando equipamentos, materiais e procedimentos, a saber.

- Equipamentos: estufa de secagem de ar forçado (Temperatura de 55°C), balança analítica com precisão de aproximadamente de 0,0001g e moinho Wiley de facas com peneira de 1 mm.
- Materiais: Saco de papel perfurado (5 kg) ou bandejas metálicas (22x16x6 cm).
- Procedimento: Primeiramente, o peso do saco de papel ou com bandeja metálica foi tarado na balança, a depender do material vegetal. Em seguida, colocou-se no saco de papel ou

bandeja metálica, uma amostra de matéria natural, e a mesma foi pesada, obtendo-se com cerca de 250 g por repetição. Depois, o conjunto (saco mais amostra) foi inserido dentro de uma estufa de circulação forçada de ar com 55° a 60°C por 48 a 72 h. Após esse período, retirou-se o material da estufa, deixando de 30 a 40 min à temperatura do ambiente, para então, pesar e anotar o peso em ficha específica. Em seguida, o material vegetal foi moído em moinho de facas e, uma subamostra de 50 g foi armazenada em sacos plásticos devidamente identificados. Sempre após essa etapa de moagem, o moinho foi cuidadosamente limpo. Algumas ações desta etapa de pré-secagem podem ser observadas na Figura 7.

Com a tabulação dos resultados, os seguintes cálculos foram depois realizados:

$$MN = (T + MN) - T$$

$$ASA = (T + ASA) - T$$

$$\%ASA = \frac{ASA}{MN} \times 100$$

em que,

%ASA = percentual de amostra seca ao ar;

MN = massa da amostra em termos de matéria natural, ou seja, massa fresca (g);

ASA = massa de amostra seca em equilíbrio com a umidade relativa do ar (g);

T = tara ou peso do recipiente ou saco utilizado (g).



Figura 7. (A) bandejas com as amostras secas em estufas; (B) moagem das amostras; (C) moinho de facas; e, (D) amostras moídas Fonte: (SANTOS, 2018).

3.2.1.2. Determinação de matéria seca a 105°C

Esta etapa representa a ASE (amostra seca em estufa a 105°C), sendo necessária, uma vez que, mesmo com a pré-secagem da matéria verde a 55°C (ASA), a amostra ainda pode conter de 1 a 5 % de água, logo, este procedimento tem como finalidade remover esse resíduo. Em alimentos com mais de 80% de MS, a ASA é dispensada (MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015).

Este método seguiu a metodologia de Van Soest (1967), descrito em Silva e Queiroz (2002).

- Equipamentos: balança de precisão de 0,0001 g, estufa a 105 °C e mufla a 600 °C,
- Materiais: Cadinho de porcelana e Dessecador.
- Procedimentos: Antes de iniciar a determinação da ASE, colocou-se cadinhos vazios em estufa a 105 °C durante 2 h e, logo depois mais 40 min em um dessecador (Figura 8). Então, os cadinhos secos foram pesados individualmente e, 2 g de amostra foram adicionadas, para depois seguirem para estufa a 105 °C, por uma noite ou 12 h. Posteriormente, colocou-se novamente os cadinhos no dessecador por 40 min, para depois pesar em balança analítica e anotar do peso em ficha específica.



Figura 8. (A) cadinhos no dessecador; e, (B) balança analítica usada para pesar os cadinhos
Fonte: (SANTOS, 2018).

Semelhante a ASA, na ASE se procedeu aos seguintes cálculos:

$$MS\% = 100 - ((PCA - PC) - (PCAS - PC)) \times 100$$

onde,

PCA = peso do cadinho com a amostra;

PC = peso do cadinho.

PCAS = peso do cadinho com a amostra

Combinando a ASA e ASE, obteve-se:

$$MS(\%) = (\%ASA \times \%ASE) / 100$$

3.2.2. Determinação da matéria mineral (%MM) e da matéria orgânica (%MO)

A %MM é a porção resultante da amostra aquecida de 500 a 600°C durante 4 h até a queima total da matéria orgânica (%MO), disponibilizando apenas uma indicação dos minerais contidos na amostra (RODRIGUES, 2010). A %MM contém especialmente os cátions (cálcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cobre, cobalto e alumínio) e ânions (sulfato, cloreto, silicato, fosfato, entre outros) (RODRIGUES, 2010). Quando se trata de amostra vegetal, a %MM indica poucas informações sobre seus componentes (BERALDO; ARAÚJO, 2017).

A %MM e a MO% foram obtidas seguindo as etapas descritas por Silva e Queiroz (2002).

- Equipamentos: balança de precisão de 0,0001 g e forno mufla a 600 °C.
- Materiais: cadinho de porcelana e dessecador.
- Procedimentos: o material dentro do cadinho foi incinerado em mufla a 600 °C, por 4 h. Após isto, a mufla foi desligada até que a mesma atingisse temperatura de 100 °C para retirar os cadinhos. Os mesmos foram colocados em dessecador por 40 min e depois pesados para obtenção da %MM, seguindo os cálculos:

$$MM = (CAD + MM) - CAD$$

$$\%MM = \frac{MM}{ASA} \times 100$$

$$\%MM = \frac{MM}{\%ASE} \times 100$$

onde,

MM = peso do cadinho e o peso da cinza;

CAD = peso do cadinho.

A partir dos valores de %MM, obteve-se %MO:

$$\%MO = 100 - \% \text{ Cinzas}$$

Corrigido para 100% da MS, tem-se:

$$\text{Base seca} = \frac{\% MO}{\% MS} \times 100$$

onde,

%MO = % de matéria orgânica na amostra;

% MS = % de MS na amostra a 105°C.

3.2.3. Determinação da fibra em detergente neutro (FDN)

A fibra compõe a parede celular dos vegetais. FDN é o resultado da fibra insolúvel do alimento, sendo indicador de consumo e digestibilidade na caracterização de dietas de ruminantes (MACEDO JÚNIOR et al., 2007; RODRIGUES, 2010). Rodrigues (2010) e Salman et al. (2010) citam que a parte solúvel em detergente neutro é composta por nitrogênio (N) ligado a fibra, nitrogênio não proteico (NNP), proteína, lipídios, açúcares, pigmentos, ácidos orgânicos e pectina. Diferente da fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), que é formada, principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Para cada 1000 g de fibra, 733 g é de FDN, ou seja, 7,33 % da MS do alimento é parte fibrosa (MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015).

O método usado durante o estágio para determinação da FDN foi proposta por Van Soest & Robrtson (1985), conforme descrito em Silva e Queiroz (2002).

- Equipamentos: 01 estufa de secagem a 105°C e um determinador de fibra.
- Materiais: Sacos tecido TNT gramatura de 100, 02 béqueres de 1.000 ml, 01 Dessecador e 01 espremedor de queijo.
- Soluções: solução de FDN, água destilada, enzima amilase termamyl e acetona P.A (C3H6O) 99,5%.

- Preparo: Inicialmente, para a confecção dos sacos, cortou-se um tecido TNT em pedaços de 10 cm de comprimento e 5 cm de largura. Estes pedaços de TNT cortados foram fechados usando uma máquina seladora, formando pequenos sacos. Em seguida foram numerados e levados para estufa a 105°C por 2 h, e depois por mais 40 min no dessecador, para então pesagem, 0,5 g da amostra foi colocado em cada saco, o qual foi fechado com o auxílio de uma seladora. Em seguida, os sacos lacrados foram inseridos nas galerias do determinador de fibra. Neste equipamento foram colocados 2 L da solução de detergente neutro e 30 gotas da enzima amilase termamyl 2x. Depois de posicionadas as amostras no equipamento, a torneira de água do equipamento foi aberta e o mesmo ligado até atingir 100°C. O temporizador foi acionado por 60 min e, em seguida, o equipamento foi novamente desligado. Os sacos foram retirados das galerias do determinador de fibra e acomodados em uma peneira (tipo espremedor) para lavar com água corrente. Em seguida, os sacos foram espremidos cuidadosamente para retirar o excesso de água, e colocados em béquer com água destilada com 90 a 100°C por 10 min. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, para então colocar os sacos em um béquer com acetona P.A (C₃H₆O) a 99,5% de pureza durante 5 min (Figura 9). O excesso de acetona dos sacos foi retirado e os mesmos foram deixados em bancada em uma bandeja por 2 h. Em seguida, os sacos foram levados para estufa a 55°C por 24 h, seguidos para estufa a 105°C durante 2 h e dessecador por mais 40 min, para então, pesagem e anotação dos resultados em planilha.

Posteriormente, cálculos foram procedidos:

$$\%FDN = \frac{[(T + FDN) - T] \times 100}{ASE}$$

Corrigido para cinzas:

$$\%FDN = [((T + FDN) - T)) - (T + Cinza) - T] \times 100$$

T = tara ou peso do recipiente ou saco utilizado (g).

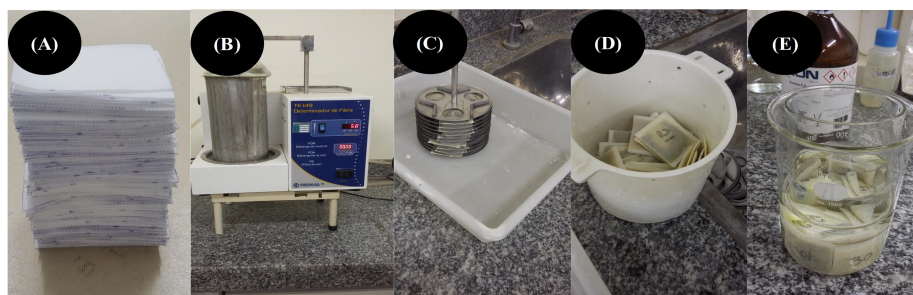


Figura 9. (A) preparo dos sacos; (B) determinador de fibra; (C) galeria com as amostras; e, (D) amostras imersas em acetona. Fonte: (SANTOS, 2018).

3.2.4. Determinação da fibra em detergente ácido (FDA)

A FDA é a parte menos digestível da parede celular dos alimentos, formada, sobretudo por lignina e celulose. A lignina é o primeiro fator antinutricional nas dietas de ruminantes, mesmo não sendo um carboidrato, faz parte da parede celular do vegetal. Já a celulose é a parte solúvel em detergente ácido, sendo obtida da diferença entre FDN e FDA (MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015; RODRIGUES, 2010; SILVA; QUEIROZ, 2002). Na %MS é aceita até 21% de FDA presente na dieta (RODRIGUES, 2010).

A metodologia de Van Soest & Robrtson. (1985) citada em Silva e Queiroz (2002) foi usada durante o estágio.

- Equipamentos: 01 determinador de fibra.
- Materiais: 02 béqueres de 1.000 ml, 01 Dessecador e 01 espremedor de queijo.
- Soluções: solução de FDA, água destilada, e acetona P.A (C₃H₆O) 99,5%.
- Preparo: este procedimento é semelhante ao FDN (Figura 9). Nesta etapa, o resíduo da amostra utilizada na determinação da FDN é colocado novamente no determinador de FDN/FDA, no qual ainda foram adicionados 2 L de solução de detergente ácido. Depois de fechado o equipamento, a torneira de água foi aberta, a chave geral do equipamento ligada, e quando se atingiu 100°C, o temporizador foi acionado por 60 min. Após esse tempo, desligou-se o determinador, retirou-se a galeria e as amostras foram colocadas em peneira (tipo espremedor) para lavar com água corrente e espremer para retirar o excesso de água. Em seguida, os sacos foram colocados em um béquer com água destilada com temperatura de 90 a 100°C e, deixou-se por 10 min; posteriormente, retirou-se o excesso de água, repetindo o procedimento por mais duas vezes, para então, colocar os sacos em um beque com acetona P.A (C₃H₆O) a 99,5% de pureza durante 5 min. Depois, o excesso de acetona dos sacos foi

removido e, os mesmos foram deixados na bancada em uma bandeja por 2 h. Em seguida, os sacos foram levados para estufa a 55°C por 24 h, para estufa a 105°C durante 2 h, seguidos para o dessecador por mais 30 min, para então pesagem e anotação dos resultados em planilha.

Posteriormente, procedeu-se com os seguintes cálculos:

$$\%FDA = \frac{(T + FDA) - T \times 100}{ASE}$$

Corrigido para cinzas:

$$\%FDA = [((T + FDA) - T)) - (T + Cinza) - T] \times 100$$

3.2.5. Determinação da proteína bruta (dosagem de nitrogênio total)

Essa análise foi conduzida em três etapas: digestão, destilação e titulação. Na digestão, o nitrogênio orgânico é convertido em amônia, e esta é recebida em uma solução receptora durante a destilação, e assim quantificada (RODRIGUES, 2010). A concentração de N do alimento (%N) multiplicado por 6,25 é igual a proteína bruta total presente (MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015).

Este método foi feito, de acordo o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984), descrito em Silva e Queiroz (2002).

- Equipamentos: 01 balança com precisão 0,0001g, 01 bloco digestor com temperatura controlada até 400°C, 01 agitador de soluções AP59, 01 agitador magnético, 01 destilador de Nitrogênio Kjeldahl, modelo TE-036/1 e 01 bureta volumétrica de 50 ml.

- Materiais: erlenmyer de 125 ml, tubos para digestão com borda de 25 x 250 mm, 01 pisseta 500 ml, 01 proveta 100 ml e 01 dispensador de solução 1000 ml.

Soluções: ácido sulfúrico (H₂SO₄), mistura catalisadora, ácido bórico (H₃BO₃) 2%, ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de Sódio (NaOH) a 50%.

- Preparo: Para digestão, pesou-se 0,2 g de amostra e colocou-a em tubo de digestão para acrescentar 2 g de mistura catalisadora e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi inserido dentro do bloco digestor, o qual foi regulado para aumentar a temperatura em 100°C

a cada 30 min até atingir a temperatura de 350°C. O aquecimento se prolongou por 3,5 h. Depois o bloco digestor foi desligado. Na destilação, nos tubos já frios foram adicionados 5 ml de água destilada e os mesmos foram agitados para retirar a cristalização do sulfato de amônio. Logo depois, foi colocado 10 ml de ácido bórico a 2% em um erlenmyer com capacidade de 125 ml, o mesmo foi acoplado no aparelho destilador. Em seguida, acoplou-se o tubo com a amostra no destilador, colocou-se 15 ml de hidróxido de sódio a 50% no copo dosador e, em seguida, acrescentou-se água destilada para que o restante de hidróxido de sódio fosse totalmente liberado. Em seguida, a torneira da água de circulação do condensador foi aberta e o aquecimento do destilador foi ligado. A solução de ácido bórico vermelha passou a verde pela presença de amônia. Apenas quando a solução atingiu 75 ml, o erlenmyer foi levado para a titulação. Alguns procedimentos da destilação podem ser observados na Figura 10. Em fim, a titulação do destilado foi feita com uma solução de ácido clorídrico a 0,02 M, adicionando-se doseadamente o ácido clorídrico e, ao mesmo tempo, realizando movimentos giratórios até que atingisse o ponto de viragem, que é do verde para o vermelho. Então, os resultados da quantidade de ácido clorídrico utilizado foram anotados em ficha específica para depois proceder aos seguintes cálculos:

$$\%N = 0,14 \times f \times Vm$$

$$\text{Proteína Bruta: } \%N \times 6,25$$

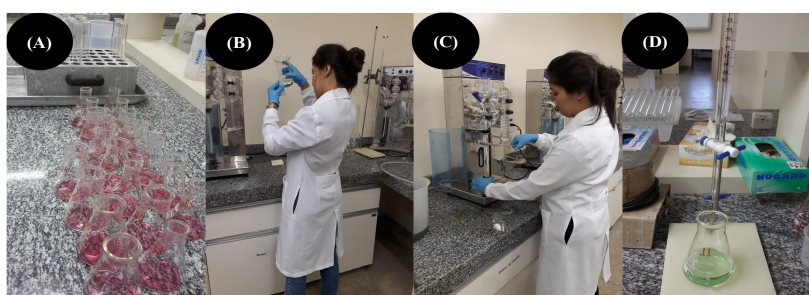


Figura 10. (A) ácido bórico nos erlenmyer; (B) medição do hidróxido de sódio a ser colocado destilador; (C) remoção do tubo do destilador; e, (D) titulação da amostra, Fonte: (SANTOS, 2018).

onde,

f = fator de correção da normalidade do ácido;

V_m = volume médio do ácido clorídrico gasto com a amostra.

3.2.6. Determinação de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

A digestibilidade representa a qualidade do alimento, sendo expressa pela diferença do alimento ingerido e o que é excretado. A digestibilidade pode ser determinada para MS ou energia ou para as partes integrantes da matéria orgânica, como: PB, EE, ENN, fibra bruta ou FDN e FDA (SALMAN et al., 2010). Silveira et al. (2009) citam que a digestibilidade *in vivo* de dietas compostas de silagem e concentrados é capaz de ser estimada pelo método *in vitro*. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) tem como objetivo simular, em laboratório, a degradação da matéria seca em nível de rúmen-retículo. Durante esse processo, utiliza-se saliva artificial e líquido ruminal (inócuo) em tubos contendo amostras do alimento a ser avaliado por um período de 48 h a 39°C. Este procedimento garante condições ideais para o desenvolvimento, manutenção e ação dos microrganismos ruminais, simulando assim as condições de um rúmen verdadeiro (RODRIGUES, 2010; SILVA; QUEIROZ, 2002).

Este método foi realizado conforme metodologia de Tilley e Terry. (1963) e modificada por Van Soest e Moore (1966) citada em Silva e Queiroz (2002).

- Equipamentos: Incubador, bужão de CO₂ equipado com válvula de saída controlável, balança de precisão de 0,0001 g e estufa de secagem a 105°C.
- Materiais: Pano de queijo garrafa térmica, proveta e dessecador.
- Soluções: Saliva artificial com PH (6,8), pepsina e água destilada.
- Inócuo: Líquido ruminal.
- Preparo: Esse método foi dividido em duas etapas. Na primeira, coletou-se o líquido ruminal de um bovino fistulado após 2 h sem comer e 1 h sem beber, alimentado com feno. O líquido foi coletado, espremido em quatro camadas de pano e colocado em garrafa térmica até chegar ao laboratório (Figura 11). Dentro de uma incubadora, com uma proveta, adicionou-se 12 ml do líquido ruminal no tubo e 10 ml de saliva artificial em tubos com tampa conjugada a uma válvula de busen (adaptados com a mangueira de borracha na tampa do tubo), já contendo a amostra do alimento em sacos de tecido TNT. A temperatura da incubadora foi controlada a 39°C. Os tubos foram agitados para que o líquido atingisse toda amostra e, em seguida, foi

inserido CO₂ dentro dos tubos com o objetivo de extrair do oxigênio do tubo. Com a rolha bem vedada e temperatura ambiente de 39°C por 48 h, os tubos foram agitados a cada 2 h ou 3 a 4 vezes ao dia para eliminar os gases formados (metano) e simular as condições no rúmen do animal *in vivo*. A segunda etapa ocorreu após completar às 48 h, adicionando-se 0,9 ml de solução de pepsina já misturada ao HCL. No animal *in vivo*, o pepsinogênio produzido na parede do estômago só torna-se ativo em meio ácido, por isso, utilizou-se o HCL. Por sua vez, a pepsina tem como objetivo quebrar as proteínas, convertendo-as em aminoácidos, logo também promovendo a morte dos microrganismos, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Após isto foi necessário aguardar 24 h, mexendo os tubos ocasionalmente, para posterior filtragem do líquido do tubo. Fez-se três lavagens das amostras dentro dos sacos com água morna destilada e, em seguida, levou-as à estufa a 105°C por uma noite. No dia seguinte, os sacos foram colocados no dessecador por 40 min para posterior pesagem do saco com o resíduo e cálculo da porção da amostra digestível. Para isso, os cálculos seguintes foram conduzidos:

$$\%DIMS = \frac{MS_i - MS_{ind} \times 100}{MS_i}$$

onde,

$$MS_{ind} = M.S_r - M.S_{br}$$

MS_i = matéria seca inicial

MS_{ind} = matéria seca indigestível

MS_r = matéria seca residual

MS_{br} = matéria seca do branco

Para ajustar a 100% da MS, utilizou-se a fórmula:

$$\text{Base seca} = \frac{\% \text{ do Resultado}}{ASE} \times 100$$

onde,

% do resultado = % de digestibilidade na análise.



Figura 11. (A) filtragem do líquido ruminal realizada em campo; (B) medidor de PH; (C) preparação das amostras; e, (D) injeção de CO₂ nas amostras. Fonte: SANTOS (2018).

3.3. DETERMINAÇÃO DE DIÓXIDO DE TITÂNIO

O consumo e a digestibilidade foram analisadas com uso de um indicador de produção fecal, o dióxido de titânio (TiO₂), ofertado às cabras através de cápsulas de papel seda com 2 g cada, em doses únicas via oral todos os dias pela manhã antes do pastejo. As fezes foram colhidas da ampola retal por cinco dias a partir do 10º dia de cada período experimental antes dos animais irem para campo. As amostras de fezes foram devidamente acomodadas em sacos plásticos, identificadas e congeladas até o momento das análises, quando foram pré-secas à 55°C, em estufa com circulação forçada de ar, durante 72 h, e moídas em moinho de bolas.

Em seguida, pesou-se 0,4 g de fezes, os quais foram colocados em tubos, e adicionou-se 4 g de mistura catalisadora e 10 ml de ácido sulfúrico. As amostras foram levadas ao bloco digestor, com a temperatura sendo aumentada em 50°C gradativamente a cada 30 min até atingir 350°C, permanecendo por 2 h até digestão total das amostras. Posterior a digestão foram adicionadas 10 ml de peróxido de hidrogênio a 30%, sendo 1 ml a cada 4 min. O material do tubo foi transferido para um balão de 100 ml, adicionando água destilada até completar 100 ml. Em seguida foi feita a filtração com papel filtro para uma garrafa plástica.

A obtenção da concentração de titânio das fezes foi feita usando um espectrofotômetro de absorção atômica (Figura 12), onde leituras de comprimento de onda de 410 nm foram conduzidas, em uma curva padrão de resposta de 0, 2, 4, 8 e 10 mg de dióxido de titânio. No momento da leitura foram adicionadas 3 gotas de peróxido de hidrogênio a 30%.

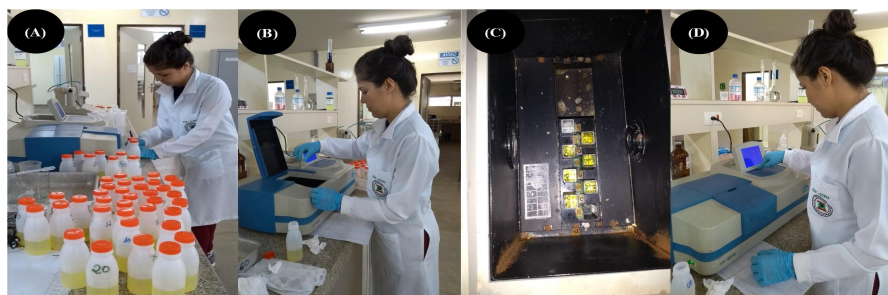


Figura 12. (A) amostras; (B) inserção das amostras no espectrofotômetro; (C) cubetas com amostras e branco no aparelho espectrofotômetro; e, (D) leitura das amostras. Fonte: (RIBEIRO, 2018).

3.4. ANÁLISE DE CREATININA EM CAPRINOS

Para a análise de creatinina, utilizou-se urina de cabras que foram suplementadas com concentrado, alimentadas em pastejo na Caatinga. No 16º dia de cada mês do período experimental era coletada amostras de urina de um animal em decúbito, por drenagem da uretra com uma sonda nº08. A urina foi armazenada em tubos de plásticos adicionando-se ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 0,036 N). Depois, as amostras foram identificadas e congeladas a $-20^{\circ}C$. A creatinina foi determinada por kit comercial (Labtest®).

A urina foi descongelada e homogeneizada e, retirou-se uma alíquota da amostra para realização das análises. 0,2 ml de urina foram diluídos em 4,8 ml de água destilada (Figura 13). As análises foram feitas no aparelho espectrofotômetro com leitura de ponto final. Os reagentes do branco, teste e padrão foram preparados conforme a Tabelas 1.

Todos os reagentes ficaram em banho maria com temperatura de $37^{\circ}C$ por 10 min, em seguida, as amostras foram colocadas em cubetas para determinar a absorbância do branco, do padrão e do teste. Para isso, ligou-se o aparelho, o qual foi zerado com a leitura do branco, em seguida foi feita a leitura do padrão, e finalmente das amostras com 510 nm de absorbância. Os valores foram devidamente anotados para serem usados em cálculos posteriores.

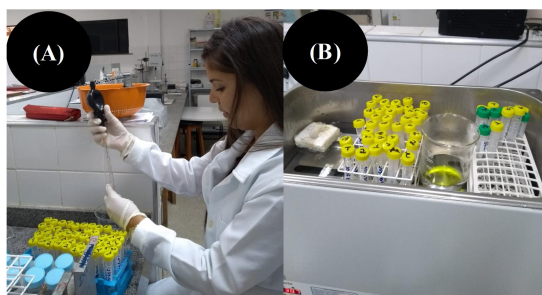


Figura 13. (A) adição de água destilada nas amostras de urina e, (B) banho maria das amostras e do reagente Fonte: (RIBEIRO, 2018).

Tabela 1. Reagentes do branco, teste e padrão usados na análise de creatinina de urina de cabras

	Branco	Teste	Padrão
Tampão (n° 2)	-----	2,0 mL	2,0 MI
Amostra	-----	0,2 ml	-----
Água destilada ou deionizada	0,25 MI	-----	-----
Padrão (n° 3)	-----	-----	0,25 MI
Ácido pícrico (n° 1)	0,5 MI	0,5 mL	0,5 MI

3.5. NITROGÊNIO DE URINA

A urina foi coletada de um animal em decúbito, por drenagem da uretra com uma sonda uretral n° 08. A urina foi armazenada em tubos de plásticos, adicionando-se ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 0,036 N). Posteriormente, as amostras foram identificadas e congeladas a $-20^{\circ}C$. Depois, a urina foi colocada em suportes de tubos e descongelada em temperatura ambiente. 2 ml de urina foram colocados em tubos de vidros já no suporte e acrescentou-se 2 g de mistura catalisadora e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram inseridos em bloco digestor, ajustando o termostato a $100^{\circ}C$, aumentando a temperatura a cada 30 min até atingir a temperatura em $350^{\circ}C$, durante 3,5 h. Após isso, o bloco digestor foi desligado e o material foi mantido durante 30 min no calor remanescente para completar o processo. A destilação e a titulação (Figura 14) também foram feitas com este material, obedecendo às mesmas etapas já descritas neste relatório.



Figura 14. (A) inserção de água destilada nas amostras; (B) medição do hidróxido de sódio para inserção no destilador; (C) destilação; e, (D) titulação da amostra. Fonte: (SANTOS, 2018).

3.6. NITROGÊNIO AMONICAL

Amostras de 25 g de silagens de guandu, milho e milheto, e de suas associações, foram coletadas na estação experimental da Embrapa Semiárido, adicionou-se 200 ml de solução de ácido sulfúrico H_2SO_4 a 0,2 N e foram deixadas por 48 h em potes de plástico. Após esse período, o material foi filtrado usando papel filtro e o líquido foi utilizado para a análise de N-amoniacal, utilizando 2 ml do líquido filtrado, o qual foi destilado (Figura 15). Posteriormente foi feita titulação e os valores foram anotados.

3.7. EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE

Nesta atividade foi feita a extração de DNA de bactérias presentes em silagem de guandu, milho, milheto e de suas associações. As amostras foram coletadas em área experimental da Embrapa. Pegou-se 1 ml de conteúdo de bactérias, que foi preparado previamente para o crescimento em meio Dygs de 12 amostras. Realizou-se a centrifugação e depois foi descartado o excedente, sendo no precipitado adicionado 100 ml de NaOH (0,5 N), deixando agir por 10 min para ocorrer a quebra completa das células (Figura 15). Foi retirada uma amostra do material lisado e, posteriormente, diluída em 20 ml de solução tampão tris PH = 8,0 (40 v1) a qual se refere a ácidos nucleicos (hidroximetil aminometano) para então, armazenadas em frízer a $-20^{\circ}C$.

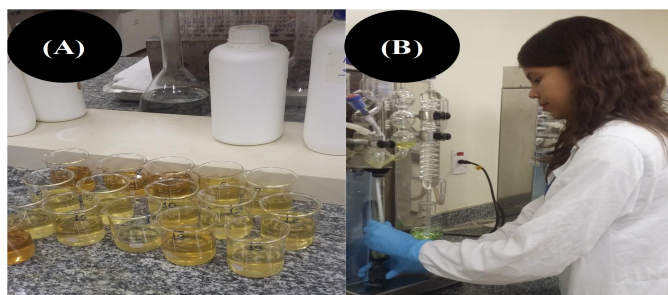


Figura 15. (A) liquido filtrado; e, (B) destilação do N-amoniacal. Fonte: (SANTOS, 2018).

3.8. LEITURA DE METANO (CH_4)

A leitura de CH_4 foi realizada a partir de amostras de gases que foram coletadas por meio de seringas e, em seguida, as análises foram procedidas no laboratório de cromatografia. Foram realizadas leitura de metano de 24 amostras de material vegetal. O técnico do laboratório é quem realiza as análises. O cromatógrafo e computador foram ligados e, comandos executados em programa computacional. A inclusão da amostra foi feita e, a leitura realizada automaticamente. Alguns detalhes da análise são observados na Figura 16.

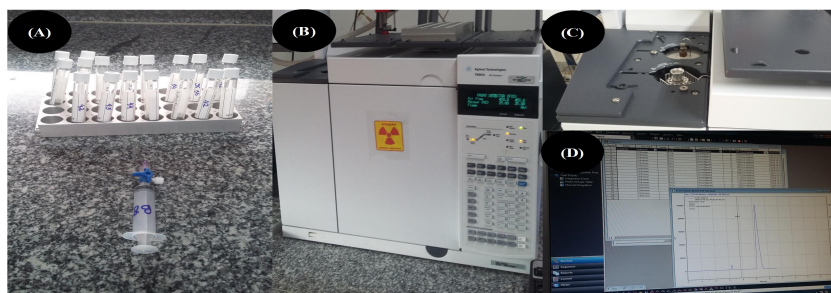


Figura 16. (A) amostras de metano; (B) cromatógrafo; (C) inserção da seringa contendo a amostra; e, (D) sistema do cromatógrafo no computador. Fonte: (SANTOS, 2018).

4. DIFICULDADES ENCONTRADAS

A exaustiva rotina de atividades dificultou a elaboração do relatório, simultaneamente.

Houve dificuldade de entendimento do objetivo de algumas atividades, às vezes por causa da complexidade da pesquisa vinculada a dissertações de mestrado ou devido a pouca clareza dos responsáveis imediatos dos trabalhos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das atuais discussões sobre o aquecimento global e a alta vulnerabilidade do Nordeste brasileiro, em especial do Semiárido, há uma grande demanda de informações sobre sistemas de produção de ruminantes neste tipo de ambiente. Levando em consideração que para cada tipo de ambiente, os diversos sistemas de produção se comportam de distintas maneiras, por causa das características climáticas, tipo solo e manejo, a avaliação contínua destes por meio de técnicas de acompanhamento do desempenho da vegetação e do animal é de extrema importância para a tomada de decisão de qual sistema deve ser adotado. Durante o estágio supervisionado obrigatório (ESO) realizado na Embrapa Semiárido, o uso de técnicas laboratoriais de avaliação do desempenho de distintos sistemas de produção foi essencial na fixação dos assuntos abordados em sala de aula durante a graduação. Métodos e equipamentos foram continuamente recorridos para a preparação de soluções, realização de análises bromatológicas de plantas forrageiras, medição de dióxido de titânio como indicador do consumo e da digestibilidade de nutrientes pelos animais, quantificação de creatinina e o nitrogênio amoniacal na urina, extração de DNA de bactérias e determinação de nitrogênio em silagem, e, emissão de metano na ensilagem de plantas forrageiras. Houve sempre a necessidade da digitalização de leituras em planilhas eletrônicas para mensuração dos resultados finais das análises. Estes métodos foram usados na avaliação dos sistemas de produção adaptados pela Embrapa para a criação de ruminantes nas condições do Semiárido brasileiro. Esta experiência foi decisiva na minha qualificação e no direcionamento para o meu aperfeiçoamento profissional em nível de pós-graduação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, S. M. S. de. A região semiárida do nordeste do Brasil: questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Revista Rios Eletrônica - Revista Científica da FASETE**, v. 5, n. 5, p. 89–98, 2011.
- BERALDO, A. A.; ARAÚJO, S. L. de. Análise bromatológica dos alimentos consumidos pelo rebanho leiteiro do planalto norte catarinense – região de Canoinhas – SC. **ÁGORA : revista de divulgação científica**, v. 16, n. 2, p. 302–317, 2017.
- BUMBIERIS JUNIOR, V. H. et al. Forragens conservadas como estratégia no planejamento forrageiro. **Pubvet**, v. 2, n. 40, p. 1–21, 2008.
- CEZAR, I. M. et al. **Sistemas de Produção de Gado de Corte no Brasil: Uma Descrição com Ênfase no Regime Alimentar e no Abate**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Leite, 2005.
- COAN, R. M. et al. Dinâmica fermentativa e microbiológica de silagens dos capins tanzânia e marandu acrescidas de polpa cítrica peletizada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5 SUPPL., 2007.
- CORDEIRO, J. C. **Desempenho de caprinos saanen, na recria, alimentados com dietas contendo bandinha de feijão**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- COSTA, F. DE S. Métodos para avaliação das emissões de gases do efeito estufa no sistema solo-atmosfera. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 693–700, 2006.
- DIAS, D. L. S. et al. Recria de novilhos em pastagem com e sem suplementação proteico/energética nas águas: consumo, digestibilidade dos nutrientes e desempenho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 985–998, 2015.
- FERNANDES, W. R.; LARSSON, M. H. M. A. Alterações nas concentrações séricas de glicose, sódio, potássio, uréia e creatinina, em eqüinos submetidos a provas de enduro de 30km com velocidade controlada. **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 393–398, 2000.
- FIGUEIREDO, Z. N.; OLIVEIRA, T. C. de. Produção e manejo de silagens. In: FILHO, A. DE O. (Ed.). **Produção e Manejo de Bovinos de Corte**. Cuiabá: KCM Editora & Distribuidora Ltda, 2015. p. 25–41.
- GOES, R. H. de T. E B. **Técnicas laboratoriais na análise de alimentos**. 1. ed. Dourados: UFGD, 2010.
- MACEDO JÚNIOR, G. de L. et al. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. **Ciência**

Animal, v. 17, n. 1, p. 7–17, 2007.

MACHADO, L. A. Z.; BALBINO, L. C.; CECCON, G. Integração Lavoura-Pecuária-Floresta. 1. Estruturação dos Sistemas de Integração Lavoura-Pecuária. **Embrapa Agropecuária Oeste**, v. 46, p. 46, 2011.

MEDEIROS, S. R. de; GOMES, R. da C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte Fundamentos e aplicações**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

MEDEIROS, S. R. de; MARINO, C. T. Sérgio Raposo de Medeiros Carolina Tobias Marino. In: MEDEIROS, S. R. de; GOMES, R. da C.; BUNGENSTAB, D. J. (Eds.). . [s.l: s.n.]. p. 15.

MOURA, A. M. et al. Métodos para medir a emissão individual de metano por ruminantes. **Nutri Time**, v. 12, n. 6, p. 4435–4440, 2015.

MOURA, M. S. B. et al. Clima e água de chuva no Semi-Árido. In: **Potencialidades da água de chuva no Semi-Árido brasileiro**. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2007. p. 37–59.

NOBRE, C. A.; REID, J.; VEIGA, A. P. S. **Fundamentos Científicos das Mudanças Climáticas**. São José dos Campos, SP: Rede Clima/INPE, 2012.

OLIVEIRA, F. de S. et al. Efeito do estresse térmico sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de ovinos criados em clima tropical. **Pubvet**, v. 6, n. 16, p. 1–24, 2012.

PAZIANI, S. D. F. **Controle de perdas na ensilagem, desempenho e digestão de nutrientes em bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de capim Tanzânia**. Universidade de São Paulo, 2004.

PEDREIRA, M. D. S. et al. **Ruminal em bovinos alimentados com diferentes relações de volumoso : concentrado**. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...**Campo Grande, MS: SBZ, 2004

RODRIGUES, R. C. **Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2010.

SALES, A. et al. Carbono orgânico e atributos físicos do solo sob manejo agropecuário sustentável na Amazônia legal. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n. 1, p. 01-15, 2018.

SALMAN, A. K. D. et al. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos**. Porto Velho: Embrapa Rondonia, 2010.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002.

SILVEIRA, M. F. et al. Avaliação de métodos laboratoriais para estimar a digestibilidade e o valor energético de dietas para ruminantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, n. 2, p. 429–437,

2009.

TOSTO, M. S. L. et al. **Balço de nitrogênio em caprinos alimentados com dietas a base de palma forrageira, resíduo de vitivinícola e diferentes níveis de uréia.** IV Congresso

Nordestino de Produção Animal, 4, 2016, Petrolina, PE. **Anais...** Petrolina, PE, 2016

ZANELLA, M. E. Considerações sobre o clima e os recursos hídricos do semiárido nordestino. **Caderno Prudentino de Geografia**, v. Especial, n. 36, p. 126–142, 2014.

ZANONI, M. M. V et al. Emissão de metano por decomposição de resíduo florestal inundado

Methane emission by decomposition of flooded forest residues. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 173–179, 2015.