

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

ESTIMATIVAS DE CONSUMO DE BOVINOS A PASTO
UTILIZANDO CAULIM COMO INDICADOR FECAL

Luana Silva Caramalac

CAMPO GRANDE, MS

2021

Lombada

2021	Estimativas de consumo de bovinos a pasto utilizando caulim como indicador fecal	Luana Silva Caramalac
------	---	-----------------------

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

ESTIMATIVAS DE CONSUMO DE BOVINOS A PASTO
UTILIZANDO CAULIM COMO INDICADOR FECAL

Feed intake estimates of grazing cattle using kaolin as a fecal marker

Luana Silva Caramalac

Orientador: Prof. Dr. Gumercindo Loriano Franco

Co-orientador: Dr. Luiz Orcirio Fialho de Oliveira

Tese apresentada à Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção
do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal

CAMPO GRANDE, MS 2021

*Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele, **JESUS CRISTO**, seja dada toda a glória, Amém! Rm 11.36*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu amado Deus, **JESUS CRISTO**, por estar e se manifestar presente comigo em toda a caminhada.

À minha família, Silva e Caramalac, por serem meu braço forte.

À minha orientadora Dra. Maria da Graça Moraes. Obrigada pelos ensinamentos, apoio e orientação. Uma mente brilhante, excelente profissional, me sinto honrada de ter sido uma das últimas orientadas em sua carreira.

Ao meu QUERIDO co-orientador, Dr. Luiz Orcirio Fialho de Oliveira. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, conselhos e grande amizade. Exemplo de líder, orientador, mestre, ser humano e profissional. Me sinto privilegiada por trabalhar junto. O maior incentivador que tive. Obrigada por acreditar em mim.

Ao Prof. Gumercindo Franco por todo suporte na pesquisa e amizade. Um grande professor. Mas, sou suspeita de falar do sr., neh?! Muito obrigada por aceitar com tanta alegria me orientar.

Ao Dr. Rodrigo Gomes pelos auxílios na estatística. Obrigada pela paciência, você é sensacional. Ao Dr. Henrique Fernandes, muito obrigada.

Aos demais membros da banca examinadora, Dr. Urbano Gomes Pinto de Abreu e Dr. Sergio Raposo de Medeiros.

Aos funcionários da Fazenda Tarumã, Embrapa Gado de Corte, Embrapa Pantanal e colaboradores pela dedicação e auxílio durante todo o período de coleta de dados no campo e análises laboratoriais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e a Embrapa Gado de Corte por proporcionarem oportunidades para realizar mais esse sonho.

À ASBRAM e FUNDECT pelo apoio e auxílio financeiro neste estudo, permitindo a melhor realização dos dados obtidos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo na modalidade de doutorado.

Por fim, não menos importante, aos meus grandes amigos por fazerem dos meus dias mais agradáveis, tornando essa fase mais leve. Em especial, amado **Espírito Santo**.

“CALMA, vamos dar um jeito. Dará tudo certo”.

Luiz Orcirio Fialho de Oliveira (2017, 2018, 2019, 2020 e 2021)

CARAMALAC, L.S. Estimativas de consumo de bovinos a pasto utilizando caulim como indicador fecal, 2021. 78 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

Resumo: Artigo 1: Muitos marcadores apresentam certas limitações de uso, e nesse contexto o caulim é um possível marcador com aplicabilidade, pois apresenta características aceitáveis. Sua quantificação é realizada indiretamente através do alumínio presente no composto, e o teor do mesmo, determinado pelo método analítico colorimétrico com aluminon. Atualmente, pesquisas em nutrição animal tem apresentado informações interessantes, porém, falhas na metodologia analítica do composto tem apresentado resultados não satisfatórios. Uma alternativa eficaz, é o método de digestão ácida com mistura nitroperclórica associado ao ácido fluorídrico. Assim, a busca por novas metodologias acessíveis, práticas, de baixo custo que promove resultados acurados, precisos e robustos para a quantificação do teor de Al no caulim, se faz necessário diante desse cenário. Artigo 2: Nós testamos um novo procedimento analítico quantitativo de extração de Al em caulim e comparamos os resultados com amostras analisadas pelo método colorimétrico aluminona e leitura por espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. Por meio do novo procedimento, amostras puras de caulim e fezes, e/ou misturadas foram digeridas em mistura ácida nitroperclórica, após, acrescentado ácido fluorídrico e quantificadas por espectrofotometria de absorção atômica. Conclui-se que o procedimento analítico proposto pelo estudo foi acurado e robusto quanto a extração de Al de amostras de fezes bovina com caulim. Artigo 3: No *Exp. 1*, buscou-se substituir o dióxido de titânio pelo caulim, fornecidos via oral, como marcadores fecais, enquanto se utilizou o óxido crômico como marcador do consumo de suplemento. Foram realizados três ensaios sequenciais, sendo que em cada ensaio utilizou-se quatro garrotes Nelore inteiros, que receberam individualmente e simultaneamente 20 g de TiO_2 e 80 g de caulim/animal via oral, 2,0 kg de suplemento contendo 1% de óxido crômico. Afim de avaliar a diferença das avaliações nutricionais entre diferentes horários de coleta de fezes foram coletadas fezes em dois horários (08h00min e 16h00min), após realizada uma amostra composta destes. Não foram verificadas diferenças significativas ($P=0,7976$) na determinação da excreção fecal quando determinados pelos marcadores externos dióxido de titânio e caulim, e comparados entre eles. Quando foram comparados os resultados finais por meio de coletas de fezes em diferentes horários, não foi verificado efeito significativo entre os valores estimados. Conclui-se que o caulim foi capaz de estimar a excreção fecal de bovinos de corte a pasto, e o manejo de coleta de fezes realizada uma vez ao dia é suficiente para estimar as avaliações nutricionais dos mesmos. No *Exp. 2*, avaliou-se a possibilidade de substituir o dióxido de titânio pelo caulim, fornecidos via suplemento, como marcadores de excreção fecal em bovinos de corte a pasto (4 garrotes/estudo; 360 dias de idade). Observou-se que o caulim apresentou resultados superiores ($P \leq 0,0002$) ao estimado pelo TiO_2 (2,70 e 5,25 kg/d, respectivamente; EPM = 0,357). Conclui-se que o fornecimento via suplemento do marcador externo caulim, não permitiu a estimativa de excreção fecal de garrotes. Artigo 4: Foram realizados dois experimentos simultâneos para avaliar a substituição do LIPE[®] como estimador da excreção fecal, e do óxido crômico como estimador do consumo de suplemento por Caulim (*Exp. 1*) e dióxido de titânio (*Exp. 2*). Foram utilizados doze garrotes Nelore (4 garrotes/tratamento; $233 \pm 6,2$ kg de PC). Os animais foram distribuídos em um delineamento de quatro quadrados latinos 3 x 3 simultâneos. Concluiu-se que os marcadores externos caulim e TiO_2 foram capazes de estimarem a excreção fecal e os consumos de matéria seca de bovinos de corte a pasto.

Palavras-chave: alumínio, ingestão diária, excreção fecal

CARAMALAC, L.S. Intake estimates of cattle grazing using kaolin as a fecal marker, 2021. 78 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

Abstract: Manuscript 1: Many markers have limitations, kaolin is a possible intake marker with applicability, because it has acceptable physical and chemical characteristics. The quantification is performed indirectly by aluminum present in the substance, and determined by colorimetric method with aluminon. Currently, research in animal nutrition has presented interesting information, however, flaws in the analytical methodology of kaolin have shown unsatisfactory results. An effective alternative is nitroperchloric acid digestion associated with hydrofluoric acid. So, research for new practical and low-cost methodologies that present accurate and robust results is still necessary. Manuscript 2: We tested a new Al extraction analytical procedure in kaolin samples and compared the results with samples analyzed by the aluminon colorimetric method and reading by optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma. The samples were digested in a nitroperchloric acid mixture associated with hydrofluoric acid, and quantified by atomic absorption spectrophotometry. Therefore, the analytical procedure proposed by the study was accurate and robust regarding Al extraction from samples of cattle feces with kaolin. Manuscript 3: *Exp. 1* The objective was to replaced titanium dioxide with kaolin, supplied orally, as fecal markers, while chromic oxide was used as a marker of supplement intake. Three sequential trials were conducted, and in each trial used four Nelore steers, which received individually and simultaneously 20 g TiO₂ and 80 g kaolin/animal orally and 2.0 kg of supplement containing 1% chromic oxide. To evaluate the difference between different times of collection of feces were collected feces at two times (08:00 am and 16:00 pm), after performing a composite sample of these. There were no significant differences ($P=0.7976$) in the determination of fecal excretion when determined by the external markers titanium dioxide and kaolin. When the final results were compared by collecting feces at different times, there was no significant effect between the estimated values. It was concluded that kaolin was able to estimate the fecal excretion of beef cattle on pasture, and the management of collecting feces once a day is sufficient to estimate the nutritional evaluations of them. In *Exp. 2*, we evaluated the possibility of replacing titanium dioxide with kaolin, supplied via supplement, as markers of fecal excretion in beef cattle grazing (4 steers/study; 360 days of age). It was observed that kaolin showed superior results ($P \leq 0.0002$) to that estimated by TiO₂ (2.70 and 5.25 kg/d, respectively). Concluded that the supply via supplement of the external marker kaolin, did not allow the estimation of fecal excretion of calves. Manuscript 4. Two simultaneous experiments were performed to evaluate the substitution of LIPE® as an estimator of fecal excretion, and of chromic oxide as an estimator of supplement intake by kaolin (*Exp. 1*) and titanium dioxide (*Exp. 2*). Twelve Nelore steers were used (4 steers/treatment; 233 ± 6.2 kg of BW). Thus, the external markers kaolin and TiO₂, were able to estimate the fecal excretion and dry matter consumption of beef cattle to pasture.

Keywords: aluminium, daily intake, fecal output

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução.....	01
Referências bibliográficas.....	02
Capítulo 2. Artigo 1: Caulim como marcador de consumo de suplemento e excreção fecal de bovinos a pasto.....	03
Determinação do consumo de matéria seca de animais a pasto.....	05
Marcadores de consumo.....	05
Técnica do triplo marcador	09
Caulim.....	10
Busca por nova metodologia analítica.....	11
Bibliografia.....	12
Capítulo 3. Artigo 2: Nota técnica: Procedimento analítico e avaliação de alumínio no caulim como um marcador fecal de bovinos a pasto.....	17
Introdução.....	17
Materiais e métodos.....	19
Resultados.....	22
Discussão.....	23
Literatura citada.....	29
Capítulo 4. Artigo 3: Caulim e dióxido de titânio como marcadores externos de excreção fecal de garrotes a pasto.....	31
Introdução.....	32
Materiais e métodos.....	33
Resultados.....	38
Discussão.....	38
Referências	41
Capítulo 5. Artigo 4: Caulim como marcador de consumo de suplemento de bovinos a pasto.....	47
Introdução.....	48
Materiais e métodos.....	49
Resultados.....	54
Discussão.....	56
Referências	59

INTRODUÇÃO

Considera-se a avaliação de consumo de matéria seca (CMS) o papel de maior relevância na nutrição animal, porém em sistemas de produção a pasto a determinação do CMS torna-se complexa, pois existem diversos fatores que o influenciam, como aqueles relacionados com a pastagem (morfologia da forragem, a estrutura do dossel forrageiro), e aqueles relacionados ao animal (estado fisiológico, sanitário e desempenho) (Jardsted et al. 2018; Davis et al. 2014).

Existem diversos métodos para a avaliação do CMS de animais a pasto (Van Soest 1994), mas a medida por meio da estimativa de excreção fecal e digestibilidade de matéria seca são as mais utilizadas, e tem sido feita com a utilização de marcadores externos e/ou internos.

Os marcadores são substâncias indigestíveis, utilizadas como monitores químicos e físicos em processos digestivos e metabólicos (Owens & Hanson 1992). No entanto, como todos os marcadores em uso ainda apresentam limitações (Wang et al. 2017; Rodrigues et al. 2010), a busca por novas substâncias se justifica.

Como alternativa destaca-se o caulim, possível marcador externo que apresenta propriedades favoráveis para estimar o consumo e excreção fecal diária dos animais, pois se trata de um mineral cujas características evidenciam possibilidade de uso. Este composto mineral é inerte em ampla faixa de pH (3 a 9), fácil dispersão, baixa condutividade térmica e elétrica, pouca abrasividade, apresentar baixo custo e sua determinação é realizada de forma indireta por meio de elementos não absorvidos pelo organismo animal, como o alumínio (Trckova et al., 2009).

O teste colorimétrico da aluminona associado a quantificação por meio do Plasma por Acoplamento Indutivo – Espectrofotometria de Emissão Ótica (ICP-OES), tem sido o principal método utilizado para quantificar o teor de Al (Korn et al., 2007; Brauner et al., 1966). No entanto, a técnica exposta é considerada inviável, pois além da demanda de grandes quantidades e diversidades de reagentes para as análises, são requeridos equipamentos específicos e onerosos. Recentemente, resultados apresentados por Oliveira et al. (2018) evidenciam que o problema do uso do caulim ainda reside na metodologia analítica de extração e quantificação deste marcador. Objetivou-se com essa tese propor um procedimento analítico de extração do Al em amostras de fezes de garrotes nelore a pasto, que receberam caulim como marcador externo de excreção fecal e consumo de suplemento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BRAUNER, J. L., CATANI, R. A., BITTENCOURT, W.C. Extração e determinação do alumínio trocável do solo. *Anais da E.S.A.* (1966). Luiz de Queiroz, p.53-73.
- DAVIS M.P., FREETLY H.C., KUEHN L.A., WELLS J.E. Influence of dry matter intake, dry matter digestibility, and feeding behavior on body weight gain of beef steers. *J Anim SCI*, v. 92, p. 3018-3025, 2014.
- JARDSTEDT, M., HESSLE, A., NORGAARD, P., FRENDBERG, L., NADEAU, E. Intake and feed utilization in two breeds of pregnant beef cows fed forages with high-fiber concentrations. *Journal of animal science*, v. 96, p. 3398-3411, 2018.
- KORN, M. G. A., N. OLESZEZUK, J. T. CASTRO, M. M. SILVA. Method development for the determination of manganese, cobalt and copper in green coffee comparing direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*. (Oxford), v.73, p.862-869, 2007.
- OLIVEIRA, L. O. F., C. RIBEIRO, M G. M. MORAIS, L. S. CARAMALAC, R. C. GOMES, U. G. P. ABREU, J. SILVA. 2018. Técnicas de análise para estimativas da concentração de caulim nas fezes bovinas. *Embrapa Gado de Corte-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* (INFOTECA-E).
- OWENS, F.N. & HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal Dairy Science*, v. 75, p. 2605-2617, 1992.
- TRCKOVA M., VONDRUSKOVA H., ZRALY Z., ALEXA P., HAMRIK J., KUMMER V., MASKOVA J., MRLIK V., KRIZOVA K., SLANA I., LEVA L., PAVLIK I. The effect of kaolin feeding on efficiency, health status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in weaned piglets. *Veterinarni Medicina*, v. 54, p. 47-63, 2009.
- VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- WANG, Y, SU, H, GU, Y, SONG, X, ZHAO, J. Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update. *OncoTargets and therapy*, v. 10, p. 4065, 2017.

Capítulo 2. Capítulo redigido conforme as normas da revista Archivos de Zootecnia.

Caulim como marcador de consumo de suplemento e excreção fecal de bovinos a pasto

Kaolin as supplement intake marker and fecal excretion of the cattle grazing

Palavras chave

Alumínio.

Consumo de matéria seca.

Digestibilidade.

Keywords

Aluminum.

Dry matter intake.

Digestibility.

Luana Caramalac:

Tomamos una decisión sobre su envío a Archivos de Zootecnia, "Caulim como marcador de consumo de suplemento e excreção fecal de bovinos a pasto".

Nuestra decisión es: **Aceptar**

Dr Francisco Javier Navas González (EDITOR-IN-CHIEF). *Aceito em: 15/09/2020*

81 **Resumo**

82 Esta revisão de literatura teve como objetivo abordar de forma sucinta o uso de caulim como
 83 marcador externo na estimativa de consumo de matéria seca de suplemento e excreção fecal
 84 bovinos a pasto. Muitos marcadores apresentam certas limitações de uso, e nesse contexto o caulim
 85 é um possível marcador com aplicabilidade, pois apresenta características aceitáveis. Sua
 86 quantificação é realizada indiretamente através do alumínio presente no composto, e o teor do
 87 mesmo, determinado pelo método analítico colorimétrico com aluminon. Atualmente, pesquisas
 88 em nutrição animal tem apresentado informações interessantes, porém, falhas na metodologia
 89 analítica do composto tem apresentado resultados não satisfatórios. Uma alternativa eficaz, é o
 90 método de digestão ácida com mistura nitroperclórica associado ao ácido fluorídrico. Assim, a
 91 busca por novas metodologias acessíveis, práticas, de baixo custo que promove resultados
 92 acurados, precisos e robustos para a quantificação do teor de Al no caulim, se faz necessário diante
 93 desse cenário.

94 **Summary**

95 The objective was describing the use of kaolin as an extern marker in the dry matter supplement
 96 intake and fecal output of cattle grazing. Many markers have limitations, kaolin is a possible intake
 97 marker with applicability, because it has acceptable physical and chemical characteristics. The
 98 quantification is performed indirectly by aluminum present in the substance, and determined by
 99 colorimetric method with aluminon. Currently, research in animal nutrition has presented
 100 interesting information, however, flaws in the analytical methodology of kaolin have shown
 101 unsatisfactory results. An effective alternative is nitro perchloric acid digestion associated with
 102 hydrofluoric acid. So, research for new practical and low-cost methodologies that present accurate
 103 and robust results is still necessary.

104 **Introdução**

105 Considera-se a avaliação de consumo de matéria seca (CMS) o papel de maior relevância na
 106 nutrição animal (Berchielli et al. 2011) e determinar de forma precisa e acurada essa estimativa
 107 pode apontar o nível de nutrientes ingeridos, consequentemente melhorar o desempenho animal
 108 (Jardsted et al. 2018; Davis et al. 2014; Souza et al. 2015) e minimizar o impacto ambiental (NRC
 109 2001).

110 Porém, em sistemas de produção a pasto a determinação do CMS torna-se complexa, pois
 111 existem diversos fatores que o influenciam, como aqueles relacionados com a pastagem
 112 (morfologia da forragem, a estrutura do dossel forrageiro), e aqueles relacionados ao animal
 113 (estado fisiológico, sanitário e desempenho) (Jardsted et al. 2018; Davis et al. 2014; Souza et al.
 114 2015 Reis & Silva 2006).

115 Com o objetivo de reduzir esses efeitos, é necessário estabelecer determinados critérios na escolha
 116 da metodologia a ser aplicada em situações específicas para obtenção de resultados válidos.

117 Existem métodos para a avaliação do CMS de animais a pasto (Valadares & Marcondes
 118 2009; Kozloski et al. 2006; Van Soest 1994; Horn et al. 1979), porém a medida por meio da
 119 estimativa de excreção fecal e digestibilidade de matéria seca são as mais utilizadas, e tem sido
 120 feita com a utilização de marcadores externos e/ou internos.

Os marcadores são substâncias indigestíveis, utilizadas como monitores químicos e físicos em processos digestivos e metabólicos (Owens & Hanson 1992). No entanto, como todos os marcadores em uso ainda apresentam limitações (Wang et al. 2017; Rodrigues et al. 2010; Glindemann et al. 2009), a busca por novas substâncias se justifica.

Como alternativa destaca-se o caulim, possível marcador externo que apresenta propriedades favoráveis para estimar o consumo e excreção fecal diária dos animais, pois se trata de um mineral cujas características evidenciam possibilidade de uso. Este composto mineral é inerte em ampla faixa de pH (3 a 9), fácil dispersão, baixa condutividade térmica e elétrica, pouca abrasividade, além de apresentar baixo custo (Silva et al. 2007).

Essa revisão propõe descrever de forma sucinta o uso de caulim como marcador na estimativa de excreção fecal e consumo de matéria seca de suplemento de bovinos a pasto.

Revisão de literatura

Determinação do consumo de matéria seca de animais a pasto

Existem métodos diretos e indiretos para a determinação do CMS de animais sob sistema de pastejo, tais como: método de diferença de peso dos animais e/ou da forragem, avaliação do comportamento ingestivo dos animais, além do uso de coleta de fezes para a determinação da digestibilidade da matéria seca (Valadares & Marcondes 2009; Berchielli et al. 2006; Kozloski et al. 2006; Van Soest 1994; Horn et al. 1979).

Entre estes, as medidas indiretas por meio das estimativas de excreção fecal (EF) e digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) são as mais utilizadas. E, segundo Cavalcanti et al. (2013) a junção dessas informações acuradas, permite estimar o CMS do animal. Podendo ser calculada pela Equação [1].

$$\text{CMS (kg/dia)} = [\text{EF} / (1 - \text{DMS})] \quad \text{Eq. [1]}$$

A estimativa de EF pode ser obtida por meio da coleta total de fezes, exigindo que os animais a pasto sejam munidos de bolsas coletoras presas ao corpo (Schneider & Flatt 1975). Porém, essa técnica pode causar desconforto ao animal e conseqüentemente, modificar o comportamento ingestivo, ou seja, alterar o consumo de alimento.

Como alternativa, a estimativa de EF tem sido feita com a utilização de substâncias oferecidas aos animais, chamadas marcadores (Van Soest 1994). Essas estimativas são obtidas a partir da relação entre a quantidade do marcador fornecido diariamente ao animal e sua concentração nas fezes (Sampaio et al. 2011).

Já a determinação da DMS é realizada pela diferença entre a quantidade de nutriente consumido e excretado nas fezes (Marais, 2000). No entanto, como em sistema de pastejo não é possível a coleta total de fezes, a estimativa da DMS pode ser obtida por meio de técnicas de desaparecimento da matéria seca *in vitro* e *in situ* (Cavalcanti et al. 2013; Berchielli et al. 2006; Van Soest et al. 1991; Orskov et al. 1980).

A técnica *in vitro* por outro lado, torna-se inviável em algumas situações, assim, o método *in situ*, por meio do uso de marcadores internos, possibilita a estimativa da DMS (Cavalcanti et al. 2013).

Marcadores de consumo

Os marcadores são substâncias indigestíveis, geralmente de fácil determinação, utilizadas como monitores químicos (hidrólise e síntese) e físicos (fluxo) em processos digestivos e metabólicos (Ownes & Hanson 1992). De acordo com os autores, essas substâncias são usadas rotineiramente para estimar o fluxo da digesta e a excreção fecal dos animais, e comparada com procedimentos invasivos (bolsas coletoras), minimizam a interferência nos padrões de comportamento dos animais, como o pastejo.

Existem marcadores externos (incluídos no alimento ou fornecido diretamente no trato digestivo) e/ou internos (presente naturalmente na dieta) (Van Soes 1994). No entanto, há limitações no uso dos marcadores separadamente, sendo os externos não se comportam como partículas da dieta, e quando aderidos a sua porção fibrosa podem alterar algumas características químicas e físicas (como a gravidade específica), e a utilização exclusiva de marcadores internos resulta em variabilidade nas estimativas de consumo (Rodriguez et al. 2006).

Uma alternativa que vem sendo utilizada é a associação desses marcadores, permitindo assim estimativas necessárias para o cálculo do CMS em animais a pasto (Kozloski et al. 2006; Van Soest 1994). Ou seja, a EF é comumente determinada a partir do marcador externo, enquanto o interno permite a obtenção da DMS (Oliveira et al. 2012; Berchielli et al. 2006; Cochran et al. 1986). Podendo ser estimadas pelas Equação [2] e [3].

$$EF \text{ (kg/dia)} = \{[OF_{\text{marcador}} * (\text{Conc}_{\text{marcador}}/1000)] / FZ_{\text{marcador}}\} \quad \text{Eq. [2]}$$

Onde, OF_{marcador} é a quantidade diária oferecida do marcador externo ao animal (g/d), $\text{Conc}_{\text{marcador}}$ é a concentração do marcador oferecido (g/kg), e FZ_{marcador} é a concentração do marcador externo nas fezes (g/kg).

$$DMS \text{ (\%)} = \{100 - [100 * (DT_{\text{marcador.interno}} / FZ_{\text{marcador.interno}})]\} \quad \text{Eq. [3]}$$

Onde, $DT_{\text{marcador.interno}}$ é a concentração do marcador interno na dieta total (g/kg), e $FZ_{\text{marcador.interno}}$ é a concentração do marcador interno nas fezes (g/kg).

Segundo Mayes et al. (1986) para ser considerado um marcador ideal, a substância deve apresentar algumas propriedades como não ser tóxico, não ter função fisiológica, não ser metabolizado, ser recuperado totalmente a partir do trato digestivo, não influenciar a motilidade e secreções intestinais, deve fluir de forma similar ao material marcado, além de ter um método de determinação fácil e preciso.

Dentre os **marcadores externos** mais utilizados na determinação do CMS de suplemento de ruminantes em pastejo, destaca-se o óxido crômico (Cr_2O_3) (Ferreira et al. 2009). Em geral, este composto natural está presente no ambiente e é utilizado em processos industriais, como também podem ser usados como micronutrientes e suplementos alimentares (Wang et al. 2017). As vantagens de sua utilização estão relacionadas à facilidade de incorporação à dieta, procedimentos analíticos simples, estimativas satisfatórias do CMS de bovinos a pasto, além de permitir a administração por meio da suplementação, facilitando o manejo e diminuindo o estresse causado nos animais (Ribeiro et al. 2018; Morenz et al. 2006; Oliveira et al. 2004).

Contudo, existem limitações ao se optar pelo Cr_2O_3 como irregularidade de excreção ao longo do dia, taxa de passagem mais rápida pelo rúmen que o material fibroso, além de grandes

quantidades desse marcador poder acarretar em contaminação ambiental por ser um metal pesado (Kozloski et al. 2006; Van Soest 1994; Mir et al. 1989).

Em estudos com monogástricos, mas especificamente em equinos, Lanzetta et al. (2009) observaram que o uso de Cr_2O_3 não apresentam estimativas de digestibilidade de nutrientes adequadas. De acordo com os autores, este fato ocorre devido à baixa taxa de recuperação fecal que o marcador apresenta, com isso, como os dados de EF são subestimados a DMS dos nutrientes são superestimadas, tornando-se o uso desse marcador limitado para algumas espécies de animais.

Dentre as limitações encontradas ao se usar o Cr_2O_3 como marcador de consumo, a mais séria e importante se dá por esse composto ser um metal pesado e tóxico, podendo causar danos à saúde humana (Wang et al. 2017). Mesmo ainda sendo incerto que o Cr_2O_3 é considerado um composto cancerígeno, o fato é que esta substância necessita ser encaminhada a um laboratório e, para que seja quantificada é preciso um processo de digestão ácida das amostras. Com isso, o Cr_2O_3 (verde) é oxidado e transformado em Cr_2O_6 (amarelo-laranja) (Souza et al. 2012; Silva & Queiroz 2002). Este composto formado após a digestão é considerado 100 vezes mais tóxico que o Cr (verde), assim a exposição ocupacional a altas concentrações de Cr (amarelo-laranja) podem gerar diversos problemas respiratórios, tornando-se um grande risco para câncer de pulmão (Wang et al. 2017).

Outro marcador usado com frequência nos estudos de nutrição animal capaz apresentar resultados semelhantes ao Cr_2O_3 quanto a estimativas de DMS, EF e CMS de animais a pasto é o dióxido de titânio (TiO_2).

O uso de TiO_2 apresenta grandes vantagens sobre o Cr_2O_3 , pois além do fato de que ele é permitido legalmente ser adicionado ao alimento, é um pó com coloração branca sem odor ou sabor, não influenciando o consumo do mesmo quando fornecido aos animais por meio da suplementação (Myers et al. 2004). Com isso, além desse composto destacar-se pela eficiência como marcador para estimar a DMS, CMS e EF semelhantes aos observados, a uniformidade da recuperação fecal tem sido observada de 90,0 a 108,8% (Marcondes et al. 2008; Myers et al. 2004; Titgemeyer et al. 2001).

Segundo Glindemann et al. (2009) o marcador TiO_2 apresenta alta acurácia e precisão no método analítico aplicado para detectar a quantidade do composto adicionado às fezes de ovinos e eficiente resultados para estimar a EF dos animais em pastejo.

No entanto, existem no meio ambiente algumas matérias orgânicas que apresentam valores médios aproximados a 0,03 % MS de TiO_2 (Myers et al. 2004; Glindemann et al. 2009). Assim, levanta-se a dúvida se esses valores encontrados, influenciam ou não os resultados finais das amostras com a adição da substância. Autores como Myers et al. (2004) sugerem que quando o TiO_2 for administrado aos animais em pastejo com o intuito de mensurar o conteúdo da digesta de ruminantes, faz-se necessário a quantificação da concentração da substância na mesma matéria orgânica (sem adição de TiO_2) fornecida aos animais, sendo os valores encontrados, usados para corrigir os resultados finais.

Por outro lado, Glindemann et al. (2009) indicam que esses dados (0,03% TiO_2 MS) não são significativos para que haja a necessidade de qualquer correção, em relação à recuperação analítica ou a um valor que representa as amostras sem adição do TiO_2 . Segundo os autores, a concentração encontrada é muito baixa, não proporcionando alteração nos resultados finais e a recuperação analítica do composto é próxima de 1 (99,5 %).

Limitações do marcador TiO_2 , como administração e coletas de fezes duas vezes ao dia, maior do tempo de manejo e o impacto das atividades sobre o comportamento dos animais, afeta negativamente o consumo de suplemento (< 150 g MS) dos mesmos (Glindemann et al. 2009).

Concluindo-se que além de apresentar erros nas estimativas o composto promove manejo estressante aos animais, fator esse a ser levado em consideração, quando se pretende avaliar o consumo de bovinos de corte.

Como alternativa, o método LIPE[®] (lignina de madeira moída extraída do *Eucalyptusgrandis*) tem se apresentado como um marcador externo promissor a partir dos resultados apresentados nos estudos com bovinos, mediante manejo mais prático, ou seja, administração e coleta de fezes para a mensuração uma vez ao dia (Lima et al. 2008; Souza et al. 2005).

Essa metodologia desenvolvida apresenta ampla resposta linear, tornando-a acurada e eficiente nos cálculos dos coeficientes de digestibilidade não apenas em diferentes espécies de animais ruminantes, como também possibilita a determinação em monogástricos (Saliba et al. 2015; Vasconcellos et al. 2007).

Outras vantagens ao optar pelo marcador LIPE[®], de acordo com Ferreira et al. (2009) inclui a capacidade de estimar a EF em experimentos com animais alimentados em grupo e/ou recebendo diferentes dietas alimentares, bom como possui característica inerte e natural, assim a substância não prejudica a saúde humana e animal.

Por se tratar de uma técnica recente, economicamente inviável e sua coleta de dados exigir metodologia específica, dificultando a obtenção de repetição de análises e necessitando de confiabilidade dos resultados feito por terceiros, seu uso torna-se limitado as condições experimentais e de pesquisa. Outro fato se dá, que a taxa de recuperação do marcador varia de 95,5 a 106,9 % em diferentes espécies animal, apresentando variabilidade nos resultados (Saliba et al. 2015).

Entre outros marcadores, existem substâncias capazes de estimarem as taxas de passagens, o tempo médio de retenção das fases sólida e líquida dos alimentos pelo rúmen-retículo e o volume do trato gastrointestinal. Dentre esses destacam-se as fibras mordentadas com cromo ou itérbio (FDN-Cr ou FDN-Yr), polietileno glicol e o EDTA com cromo ou cobalto (NRC, 2001; Berchielli et al., 1996; Pond et al., 1989). Segundo Pond et al. (1989) avaliando vários tipos de associação da fibra com “terras raras” (Yb, Tb, Cr, Sm, La e Lu), os dados apresentaram confiáveis e similares entre os elementos nas primeiras 24 horas, permitindo assim a utilização de dois marcadores. Outros autores também observaram resultados satisfatórios ao avaliarem o fluxo alimentar de bovinos recebendo quantidades variáveis de suplemento proteicos utilizando amostras compostas de forragens mordentadas com dicromato de sódio com 12% de cromo MS de fibra em detergente neutro (FDN).

Os **marcadores internos** apresentam a vantagem sobre os externos por estarem naturalmente presentes nos alimentos e permanecerem uniformemente distribuídos na digesta (Piaggio et al. 1991), contudo para que possam ser determinados, devem ser submetidos à digestão por períodos de no mínimo 144 horas de incubação in situ (Berchielli et al. 2000).

Dentre eles, os mais utilizados, a fibra em detergente ácido insolúvel (FDAi), fibra em detergente neutro insolúvel (FDNi), cinza insolúvel em ácido (CIA) e em detergente ácido (CIDA), se destacam. Esses componentes presentes nas paredes celulares da dieta têm mostrado bons resultados na determinação da DMS da forragem (Salman et al., 2010; Carvalho et al., 2007; Berchielli et al., 2000; Van Soest, 1994; Johnson, 1983).

Diversas pesquisas têm apresentado resultados satisfatórios com o uso dos marcadores FDNi e FDAi no auxílio da estimativa de CMS de volumosos em ruminantes, sendo ambos apresentando eficácia na mensuração (Fernandes et al. 2012; Ferreira et al. 2009). No entanto, segundo Zeoula

et al. (2002) o uso do FDNi tem mostrado inconstâncias nos resultados finais obtidos, a exemplo tem-se dados de digestibilidade subestimados e recuperação fecal da FDNi inferior a 100%.

Em estudos com ovinos Rodrigues et al. (2010) observaram que a FDAi proporcionou estimativa de digestibilidade aparente da matéria seca superior ao FDNi e óxido crômico, resultado de recuperação desses marcadores de 93,7, 90,9 e 86,1 %, respectivamente. De acordo com os autores, recuperações menores apontam que a concentração fecal do marcador pode levar a superestimava da excreção das frações dietéticas de interesse e, logo, valores de DMS subestimados.

Menor erro de predição da DMS apresentado por Rodrigues et al. (2010) foi obtido pelo FDAi, indicando que as estimativas obtidas pelo uso desse marcador foram mais acuradas, apresentando valores mais próximos ao valor real da DMS, observada pela coleta total de fezes. Semelhantemente, Berchielli et al. (2000) observaram resultados de avaliações nutricionais de bovinos estimativos a partir da FDAi, apresentaram estatisticamente iguais aos obtidos por coleta total de fezes.

O uso das cinzas insolúveis (CIA e CIDA) ainda que estudos comprovam a eficiência dos marcadores (Sein e Todd, 1988), porém, valores inconstantes estimados e inferiores aos reais foi observado, e de acordo com Zeoula et al. (2002) esses resultados podem ser devido a consequência das concentrações dessas nas dietas, concluindo que as CIA estimam mais corretamente a excreção fecal do que a CIDA.

O marcador *n-alcanos* apresenta a vantagem da associação de marcadores (externo e interno) em um mesmo procedimento (Mayes et al. 1986). Segundo Dove e Mayes (1996) valores de consumo em bovinos e ovinos em diversos tipos de dietas, foi apresentado com eficiência ao estimarem por meio do uso da técnica dos alcanos. Esta técnica permite estimar o consumo da dieta em animais sob pastejo a partir do perfil específico de *n-alcanos* de cada planta, porém mostra-se a desvantagens ao se utilizar este marcador, o alto custo (Carvalho et al. 2007).

Técnica do triplo marcador

Os animais em regime de pastejo podem ter avaliações nutricionais estimadas separadamente mediante a técnica de associação de diferentes marcadores (Titgemeyer et al. 1997; Cochran et al. 1986). Algumas pesquisas de nutrição a pasto (Fernandes et al. 2012; Ferreira et al. 2009) vem desfrutando dessa ferramenta afim de avaliar os consumos isoladamente dos animais.

Essa técnica é realizada por meio do fornecimento de três marcadores diferentes ao animal. Ou seja, a administração de um marcador externo via sonda esofágica afim de estimar a EF, um segundo marcador externo adicionado ao suplemento para a estimativa do consumo de suplemento (CSUP), e por fim, um marcador interno para estimar diretamente o consumo de forragem (CFO). Podendo ser calculados pelas Equações [4] e [5].

$$\text{CSUP (kg/d)} = [(EF * FZ_{\text{marcador}}) / SP_{\text{marcador}}] \quad \text{Eq. [4]}$$

Onde, EF é a excreção fecal do animal (kg/dia), FZ_{marcador} é a concentração do marcador nas fezes (kg/dia), e SP_{marcador} é a concentração do marcador no suplemento (kg/kg).

$$\text{CFO (kg/d)} = [(EF * FZ_{\text{marcador.interno}}) - SP_{\text{marker.interno}}] / FO_{\text{marcador.interno}}. \quad \text{Eq. [5]}$$

Onde, EF é a excreção fecal do animal (kg/d), $FZ_{\text{marcador.interno}}$ é a concentração do marcador interno nas fezes (%), $SP_{\text{marcador.interno}}$ é a concentração do marcador interno no suplemento (g), $FO_{\text{marcador.interno}}$ é a concentração do marcador interno na forragem (%).

Por fim, é reconhecido que a escolha do marcador representa um passo importante quando se pretende estimar o consumo alimentar dos animais. Como todos os métodos utilizados para estimar o CMS de bovinos em pastejo possuem limitações (Berchielli et al. 2011; Ferreira et al. 2009; Detmann et al. 2004) e, segundo Carvalho et al. (2007) apesar dos avanços metodológicos, as estimativas ainda são deficientes em confiabilidade, a busca por novas substâncias (moléculas) que apresentem propriedades favoráveis se justifica.

Como alternativa destaca-se o caulim, possível marcador externo para estimar o consumo, pois se trata de um mineral cujas características evidenciam possibilidade de uso.

Caulim

O caulim é uma matéria-prima, contendo em grande parte o caulinita mineral argiloso. Na mineralogia sistemática, é classificada como argila de filossilicato (Silva 2007).

Devido às suas qualidades de adsorção e ausência de toxicidade primária, o uso de caulim é considerado um medicamento para prevenir uma série de materiais tóxicos, tóxicos, não apenas no meio ambiente, mas também nos organismos vivos. Pois, quando adicionado às dietas de animais, reduz a reabsorção de toxinas nocivas presentes na alimentação através da mucosa intestinal para o organismo, porque as liga firmemente e seletivamente e, assim, elimina seus efeitos tóxicos (Trkova et al., 2009).

Segundo Trkova et al. (2009) as características de adsorção e ausência de toxicidade primária do caulim possibilitam considerá-lo material efetivo na prevenção de efeitos tóxicos causados no ambiente e/ou em organismos vivos por diversos materiais.

Essa substância é formada por um grupo de silicatos hidratados de alumínio, classificado como um argilomineral, sendo representado principalmente pela caulinita e haloisita, presente em abundância na natureza (Luz et al. 2008; Silva 2001).

Mais especificamente, segundo Luz et al. (2008) é uma substância aluminossilicato hidratado, constituído principalmente de caulinita, e sua célula unitária é expressada por $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_8$. A caulinita é um filossilicato (argila mineral) com composição química teórica de 39,50 % de Al_2O_3 , 46,54 % de SiO_2 e 13,96 % de H_2O , e outros elementos em menor quantidade como ferro, manganês, magnésio, potássio e sódio.

Por fim, o caulim é inerte em ampla faixa de pH (3 a 9), apresenta fácil dispersão, possui baixa condutividade térmica e elétrica, possui pouca abrasividade (Silva 2007). E segundo o autor, o fato de o Brasil deter aproximadamente 28% das reservas mundiais de caulim, demonstra a facilidade de obtenção o que o torna candidato para servir de marcador coletivo de consumo, ou seja, apresenta baixo custo. Sendo assim, diante de todas as características apresentadas, torna-se favorável o uso da substância como marcador de consumo de animais.

Marcador externo Caulim

O fornecimento do caulim como marcador externo, por meio do suplemento de bovinos, segundo Ribeiro et al. (2018) resulta em estimativas semelhantes aos da administração via oral, por meio do aplicador de bólus. Concluindo-se que a substância além das características

apresentadas, possui grande potencial de ser fornecido por meio da alimentação, não havendo a necessidade de manejo rigoroso com consequências negativas sobre o comportamento ingestivo dos animais.

O caulim por ser um composto de mineral, torna-se instável em meio ácido. Pois, dissocia-se no trato gástrico intestinal reagindo com outras substâncias orgânicas ou minerais do meio. Com isso, quando utilizado se faz necessário sua quantificação de forma indireta, por meio de elementos não absorvidos pelo organismo animal, como o **alumínio** (Al) (Underwood 1977).

Ribeiro et al. (2018) observaram ausência de acurácia nos resultados obtidos nas estimativas de EF de bovinos, por meio do marcador caulim. De acordo com os autores, devido a perdas e vícios decorrentes dos processos de extração e quantificação do composto, observou-se incompleta extração do Al nas amostras, interferindo diretamente nas estimativas das avaliações. Uma vez que, utiliza-se o elemento para determinar a substância.

Avaliando os diferentes procedimentos analíticos para a determinação indireta do caulim, por meio da concentração de Al em fezes bovinas, Oliveira et al. (2018) observaram que a extração do elemento na substância por meio da digestão nitro sulfúrica sequencial (DNS) apresentou resultados semelhantes aos valores esperados pelo método de coleta total de fezes. Segundo os autores, o método sequencial permite estimar separadamente as concentrações de Al nas fases in natura (orgânica) e cinzas (mineral) em relação ao total encontrado, levando em consideração a resistência da solubilização do Al retido na fração orgânica ou na fração mineral.

Pois, de acordo com Oliveira et al. (2018) o Al contido no caulim é estritamente mineral, enquanto o retido no restante do material (fezes) pode ter origem orgânica (da forragem) ou mineral (do solo).

As concentrações de Al extraídas por meio da técnica DNS, são expressadas em diferentes proporções, ou seja, nas fezes puras 80 % do Al provém da primeira fase e os outros 20% da segunda fase, e no caulim puro ocorre o inverso. Assim, é possível presumir que o Al medido na segunda etapa seria principalmente originário do caulim (Oliveira et al. 2018).

Ainda que a separação das fases tende a auxiliar a identificação da origem do Al, o caulim apresenta altas concentrações do elemento (39,5 % de Al). Com isso, a digestão por meio dessa técnica necessita de maiores diluições do substrato, afim de se obter os resultados e que os mesmos permaneçam dentro do espectro de leitura do aparelho (Oliveira et al. 2018). Diante disso, erros acumulativos podem aparecer entre as etapas da metodologia analítica.

Então, embora o caulim apresente todas as características importante para um bom marcador de consumo de animais a pasto, os resultados superestimados apresentados por Ribeiro et al. (2018) evidenciam que o problema da substância ainda reside na metodologia analítica de extração e quantificação deste marcador. Tornando este processo alvo de maior atenção.

Busca por nova metodologia analítica

Como apresentado anteriormente, a quantificação do caulim tem sido determinada através do Al presente no composto. E, normalmente o teor de Al é quantificado por meio do método analítico de colorimetria com aluminon, descrita por Bauner et al. (1966). Segundo os autores, após a amostra ser exposta a uma digestão ácida, o Al_3^+ é tratado com aluminon, sua cor é lida em espectrofotômetro e comparada aos valores estabelecidos por uma curva padrão.

As leituras dos teores de Al podem ser feitas também por meio do Plasma por Acoplamento Indutivo – Espectrofotometria de Emissão Ótica (ICP-OES) e Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) (McDowell 1992). No entanto, ambas as técnicas aqui expostas são consideradas

inviáveis, pois além da demanda de grandes quantidades e diversidades de reagentes para as análises, equipamentos específicos são requeridos.

A busca por novas metodologias analíticas acessíveis, práticas, de baixo custo que promove resultados acurados, precisos e robustos para a quantificação do teor de Al no caulim, se faz necessário diante desse cenário.

De acordo com Chao & Sanzolene (1992) matérias orgânicas e inorgânicas exigem diversos ácidos fortes para o processo de digestão, como por exemplo o ácido perclórico (HClO_4) e ácido nítrico (HNO_3). No entanto, para completa decomposição de alguns minerais complexos, como por exemplo o silicato (SiO), faz se necessário o combinado dos ácidos com o ácido fluorídrico.

Nessa situação, o caulim por ser um alumino silicato hidratado, cuja composição aproxima-se de $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, as matrizes de silicato associadas ao Al apenas serão dissolvidas na presença HF. Pois, o flúor é o elemento mais eletronegativo existente, ou seja, possui a maior afinidade por elétrons.

Portanto, as ligações SiO em contato com o íon F^- são rompidas, formando SiF e a mesma é volatilizada em meio aquecido (Chao & Sanzolene 1992). Conclui-se que a partir desse processo, toda a associação do Al com SiO_2 no produto caulim, será rompida liberando o Al para a completa quantificação.

Partindo-se da premissa de que o Al seja completamente extraído do caulim e disponível para determinação, é necessário fazer uma correção dos valores finais obtidos da concentração do elemento.

O elemento Al está presente no meio ambiente associado ao oxigênio, silício e outros elementos, essa ligação torna-o insolúvel em condições ambientais, como também apresenta baixas concentrações em fontes de alimentos para animais (Miller et al. 1984).

De acordo com Underwood (1977) ainda que a absorção deste elemento no metabolismo é praticamente zero, quando fornecido aos animais, seja por ingestão adicional via solo e/ou forragem, o Al é totalmente excretado por meio das fezes dos animais. Estes teores provenientes da dieta, caso não identificados separadamente, influenciaram diretamente nos resultados finais das estimativas nutricionais.

Torna-se então primordial identificar o teor de Al presente nas fezes dos animais antes de serem expostos ao estudo de digestibilidade. Ou seja, uma fase de coleta de fezes dos animais, antes do fornecimento do marcador, se faz necessária para mensurar o teor Al provenientes de fontes externas (solo, forragem e água). A partir daí a concentração final de Al do caulim pode ser expressa pela diferença dos teores do elemento nas fezes durante as fases pré e pós administração do caulim.

Conclusão

Ainda que pouco se sabe sobre a eficácia do caulim como marcador de consumo, atualmente pesquisas vêm sendo aperfeiçoadas com o intuito de melhorar as metodologias analíticas propostas. Com isso, o caulim por ser uma substância inerte e com características semelhantes ao considerado um marcador externo ideal, torna-se uma possível escolha para uso em avaliações nutricionais de animais a pasto.

Bibliografia

Berchielli, TT, Rodriguez, NM, Gonçalves, LC 1996, 'Polietilenoglicol e colbato-EDTA como marcadores da fase líquida ruminal', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 38, no. 4, pp. 463-471.

- 487 Berchielli, TT, Andrade, P, Furlan, CL 2000, 'Avaliação de marcadores internos em ensaios de
488 digestibilidade', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 29, no. 3, pp. 830-833.
- 489 Berchielli, TT, Garcia, AV, Oliveira, SG 2006, 'Principais técnicas de avaliação aplicadas em
490 estudos de nutrição', in Berchielli, TT, Garcia, AV, Oliveira, S. G (eds.), *Nutrição de*
491 *ruminantes*, Funep, Jaboticabal, BRA., pp. 397-421.
- 492 Berchielli, TT, Garcia, AV, Oliveira, SG 2011, 'Principais técnicas de avaliação aplicadas em
493 estudo de nutrição', in Berchielli, TT, Garcia AV, Oliveira, SG (eds.), *Nutrição de ruminantes*,
494 2 ed. Funep, Jaboticabal, BRA., pp. 415-436
- 495 Brauner, JL, Catani, RA, Bittencourt, WC 1966, 'Extração e determinação do alumínio trocável
496 do solo', in Anais E.S.A.(eds), *Luiz de Queiroz*, vol.23, pp.53-73.
- 497 Carvalho, PCF, Kozloski, GV, Ribeiro Filho, HMN, Reffatti, MV, Genro, TCM, Euclides, VPB.
498 2007, 'Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo',
499 *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 36, pp. 51-170.
- 500 Cavalcanti, AC, Saliba, EOS, Rodriguez, NM, Silva, FAE 2013, 'Indicadores do metabolismo
501 animal' in Saliba, EOS (eds.), *Compêndio de utilização de indicadores do metabolismo animal*,
502 GIL, Belo Horizonte, pp. 8- 38.
- 503 Chao TT, Sanzalone, RF 1992, 'Decomposition techniques', *J Geochem Explor*, vol. 44, pp. 65–
504 106.
- 505 Cochran, RC, Adams, DC, Wallace, JD, Galyean, ML 1986, 'Predicting digestibility of different
506 diets with internal markers: evaluation of four potential markers', *Journal Animal Science*, vol.
507 63, no. 5, pp. 1476-1483.
- 508 Davis MP, Freetly HC, Kuehn LA and Wells JE 2014, 'Influence of dry matter intake, dry matter
509 digestibility, and feeding behavior on body weight gain of beef steers', *J Anim SCI*, vol. 92, pp.
510 3018-3025.
- 511 Detmann, E, Valadares Filho, SC, Paulino, MF 2004, 'Avaliação da técnica de marcadores na
512 estimação do consumo por ruminantes em pastejo', *Cad. Tec. Vet. Zootec*, vol.46, pp. 40-47.
- 513 Dove, H, Mayes, RW, 1996, 'Plant wax components: anew approach to estimating intake and
514 diet composition in herbivores', *The Journal of Nutrition*, vol. 126, no. 1, pp. 13-26.
- 515 Fernandes, HJ, Paulino, MF, Detmann, E 2012, 'Avaliação nutricional, durante a amamentação de
516 tourinhos em pastejo recebendo suplementação proteica da amamentação à terminação',
517 *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 41, no. 2, pp. 374-383.
- 518 Ferreira, MA, Filho, SDCV, Inácio, M, Marcondes, MLP, Paulino, MF & Valadares, RFD 2009,
519 'Avaliação de marcadores em estudos com ruminantes: digestibilidade', *Revista Brasileira de*
520 *Zootecnia*, vol. 38, no. 8, pp. 1568-1573.
- 521 Glindemann, T, Tas, BM, Wang, C, Alvers, S, Susenbeth, A 2009, 'Evaluation of titanium dioxide
522 as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep', *Anim. Feed Sci. Technol*,
523 vol. 152, pp. 186–197.
- 524 Horn, FP, Telford, JP, Mc Croskey, JE 1979, 'Relationship of animal performance and dry matter
525 intake, to chemical constituents of grazed forage', *Journal Animal Science*, vol. 49, no. 4, pp.
526 1051-1058.
- 527 Jardstedt, M, Hesse, A, Norgaard, P, Frendberg, L, & Nadeau, E 2018, 'Intake and feed utilization
528 in two breeds of pregnant beef cows fed forages with high-fiber concentrations', *Journal of*
529 *animal science*, vol. 96, no.8, pp. 3398-3411.
- 530 Johnson, RM 1983, 'Animal litter and method for deodorizing animal waste with dried citrus pulp',
531 U.S. Patent n. 4,386,580, 7 jun. 1983.

- 532 Kozloski, GV, Perez Neto, D, Oliveira, L, Maixner, AR, Leite, DT, Maccari, M, Brondani, IL,
 533 Asnchez, LMB, Quadros, FLF. 2006, 'Uso do óxido de cromo como marcador da excreção
 534 fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem',
 535 *Ciência Rural*, vol. 36, no. 2, pp. 599-603.
- 536 Lanzetta, VAS, Rezende, ASC, Saliba, EOS 2009, 'Validação do LIPE® como método para
 537 determinar a digestibilidade dos nutrientes em equinos', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.
 538 38, no. 1, pp. 69-74.
- 539 Lima, JBMP, Graça, DS, Borges, ALCC, Saliba, EOS, Simão, SMB 2008, 'Uso do óxido crômico
 540 e do LIPE® na estimativa do consumo de matéria seca por bezerros de corte', *Arquivo*
 541 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 60, no. 5, pp. 1197-1204.
- 542 Luz, AB, Campos, AR, Carvalho, EA, Bertolino, LC, Scorzelli, RB 2008, 'Argila – caulim', in
 543 *Rochas e Minerais Industriais no Brasil: usos e especificações*, 2ª ed., CETEM/MCTI, Rio de
 544 Janeiro, BRA., pp. 2559-294.
- 545 Marais, JP 2000, 'Use of markers', in D'Mello, JOF. (eds.) *Farm animal metabolism and*
 546 *nutrition: critical reviews*, The Scottish Agricultural College, pp.255-277.
- 547 Mayes, RW, Lamb, CS, Colgrove, PM 1986, 'The use of dosed and herbage n-alkanes as markers
 548 for the determination of herbage intake', *Journal Agriculture Science*, vol. 70, no. 1, pp. 161-
 549 170.
- 550 Miller, RG, Kopfler, FC, Kelty, KC, Stober, JA, Ulmer, NS. 1984, 'The occurrence of aluminum
 551 in drinking water', *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 76, pp. 84-91.
- 552 Mir, PS, Kalnin, CM, Garvey, SA 1989, 'Recovery of fecal chromium used as a digestibility
 553 marker in cattle', *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 2549-2553.
- 554 Morenz, MJF, Da Silva, JFC, Aroeira, LJM, Deresz, F, Vásquez, HM, Paciullo, SC, Lopes, FCF,
 555 Elyas, CW, Detmann, E. 2006, 'Óxido de cromo e alcanos na estimativa do consumo de
 556 forragem de vacas em lactação em condições de pastejo', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.
 557 35, no. 4, pp. 1535-1542.
- 558 Myers, WD, Ludden, PA, Nayigihugu, V, Hess, BW 2004, 'Technical Note: A procedure for the
 559 preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide', *Journal of Animal*
 560 *Science*, vol. 82, pp. 179-183.
- 561 Nutrient requirements of dairy cattle (NRC). 2001, 7ª ed., Washington: *National Academy of*
 562 *Sciences*, Washington, USA, pp. 381.
- 563 Oliveira, LOF, Saliba, EOS, Gonçalves, LC, Borges, I, Miranda, PAB, Fialho, MPF, 2010,
 564 'Digestibilidade *in situ* e cinética ruminal de bovinos de corte a pasto sob suplementação de
 565 proteinados' *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 39, no. 6, pp. 1328-1335.
- 566 Oliveira, LOF, Ribeiro, C, Morais, MDG, Caramalac, LS, Gomes, RDC, De Abreu, UGP, Silva, J
 567 2018, 'Técnicas de análise para estimativas da concentração de caulim nas fezes bovinas'.
 568 *Embrapa Gado de Corte-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* (INFOTECA-E).
- 569 Orskov, ER, Deb Hovell, FD, Mould, F 1980, 'The use of the nylon bag technique for the
 570 evaluation of feedstuffs', *Trop Anim Production*, vol. 5, pp. 195-213
- 571 Owens, FN & Hanson, CF 1992, 'External and internal markers for appraising site and extent of
 572 digestion in ruminants', *Journal Dairy Science*, vol. 75, no. 9, pp. 2605-2617.
- 573 Piaggio, LM, Prates, ER, Pires, FF, Ospina, H. 1991, 'Avaliação das cinzas insolúveis em ácido,
 574 fibra em detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como
 575 marcadores internos da digestibilidade', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 20, no. 3, pp.
 576 306-312.

- 577 Pond, KR, Ellis, WC, Matis, JH, Desweysen, AG, 'Passage of chromium-mordanted and rare
578 earth-labeled fibre: time of dosing kinetics', *Journal of Animal Science*, vol.67, no.4, pp.
579 1020-1028.
- 580 Reis, RA & Silva, SC 2006, 'Consumo de forragens', in Berchielli, TT, Garcia, AV, Oliveira, SG
581 (eds.), *Nutrição de ruminantes*, Funep, Jaboticabal, BRA., pp. 79-109.
- 582 Reis, SF, Huntington, G, Hopkins, M, Whisnant, S, & Paulino, PVR 2015, 'Herbage selection,
583 intake and digestibility in grazing beef cattle', *Livestock Science*, vol. 174, pp. 39-45.
- 584 Ribeiro, CB, de Oliveira, LOF, da Graça Morais, M, Fernandes, HJ, Carneiro, MMY, Rocha,
585 RFAT, & Rocha, DT 2018, 'Kaolin and chromic oxide under different forms of administration
586 in a study of consumption and digestibility', *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 39, no.6, pp. 2607-
587 2620.
- 588 Rodrigues, PHM, Gomes, RDC, Siqueira, RFD, Meyer, PM, & Rodrigues, RR 2010, 'Acurácia,
589 precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada
590 com o uso de marcadores em ovinos', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 39, no.5, pp. 1118-
591 1126.
- 592 Saliba, EDOS, Faria, EP, Rodriguez, NM, Moreira, GR, Sampaio, IBM, Saliba, JS, & Borges,
593 ALCC 2015, 'Use of infrared spectroscopy to estimate fecal output with marker
594 Lipe', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 4, pp. 1-10.
- 595 Sampaio, CB, Detmann, E, Valente, TNP, Costa, VCV, Valadares Filho, SDC, Queiroz, ACD.
596 2011, 'Fecal excretion patterns and short term bias of internal and external markers in a
597 digestion assay with cattle', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 40, no. 3, pp. 657-665.
- 598 Schneider, BH & Flatt, WP 1975, *The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments*,
599 *University of Georgia Press*, Athens, USA.
- 600 Sein, T, Todd, JR, 1988, 'Investigations into the use of indicator methods of estimating the
601 digestibilities of foods by ruminant animals', *Journal of Agricultural Science*, vol. 110, no. 2,
602 pp. 315-320.
- 603 Silva, SP 2001, *Caulim - Balanço Mineral Brasileiro*, *Departamento Nacional de Produção*
604 *Mineral (DNPM)*, acesso em: 10/08/2019.
605 <<http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/caulim.pdf>>.
- 606 Silva & Queiroz 2002, *Livro Métodos para Análises de Alimento*. Univers, cidade, estado, Brasil.
- 607 Souza, JDS, Ferreira, WM, Saliba, EOS, Asad, CEP, Machado, LC, Monteiro, JR. 2005,
608 'Digestibilidade aparente da dieta suplementada com concentrado de leveduras vivas para
609 avestruzes em crescimento', *Rev. Acad., Curitiba*, vol. 3, no. 3, pp. 59-66.
- 610 Smith, AM, Reid, JT 1955, 'Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose
611 of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows', *Journal of Dairy Science*,
612 vol. 38, pp. 515-524.
- 613 Souza, N. K. P., D. S. Pina, E. Detmann. 2012. Avaliação de Cr em amostras fecais. Detmann, E.,
614 M. D Souza, S. D. C. Valadares Filho, A. D. Queiroz, T. T. Berchielli, E. D. O. Saliba, J. A.
615 G. Azevedo. In: Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco: Suprema, 214p.
- 616 Souza, J, Batistel, F, Welter, KC, Silva, MM, Costa, DF, & Santos, FAP 2015, 'Evaluation of
617 external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows', *Tropical*
618 *animal health and production*, vol. 47, no. 1, pp. 265-268.
- 619 Titgemeyer, EC, Armendariz, CK, Bindel, DJ 2001, 'Evaluation of titanium dioxide as a
620 digestibility marker for cattle', *Journal of Animal Science*, vol. 79, no. 4, pp. 1059-1063.
- 621 Titgemeyer, EC, 1997, 'Design and interpretation of nutrient digestion studies', *Journal of Animal*
622 *Science*, vol. 75, pp. 2235-2247.

- 623 Trckova M, Vondruskova H, Zraly Z, Alexa P, Hamrik J, Kummer V, Maskova J, Mrlik V,
 624 Krizova K, Slana I, Leva L, Pavlik I 2009, 'The effect of kaolin feeding on efficiency, health
 625 status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in
 626 weaned piglets', *Veterinarni Medicina*, vol. 54, no. 2, pp. 47-63.
- 627 Underwood, EJ 1977, Trace Elements in Human and Animal Nutrition 4., *Academic Press*, New
 628 York, USA, pp. 430-432.
- 629 Van Soest, PJ 1994, Nutritional ecology of the ruminant, 2^a ed., Ithaca: *Cornell University*, New
 630 York, USA, pp. 476.
- 631 Van Soest, PJ, Robertson, JB, Lewis, BA 1991, 'Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber,
 632 and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition', *Journal Dairy Science*, vol. 74,
 633 pp. 3583-3597.
- 634 Vasconcellos, CHF, Veloso, JAF, Saliba, EOS, Baião, NC, Lara, LJC 2007, 'Uso da LIPE® como
 635 marcador externo na determinação da energia metabolizável de alimentos em frangos de corte',
 636 *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol. 59, pp. 459-465.
- 637 Zeoula, LM, Prado, IN, Dian, PHM, Geron, LJV, Caldas Neto, SF, Maeda, EM, Dal Pra Peron, P,
 638 Marques, JA, Falcão, AJS 2002, 'Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em
 639 ruminantes', *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, vol. 31, pp.1856-1874.
- 640 Wang, Y, Su, H, Gu, Y, Song, X, & Zhao, J 2017, 'Carcinogenicity of chromium and
 641 chemoprevention: a brief update', *Oncotargets and therapy*, vol. 10, pp. 4065.

Capítulo 3. Capítulo redigido conforme as normas da Revista Brasileira de Zootecnia

Nota Técnica: Procedimento analítico de extração de alumínio em amostras de caulim e fezes bovinas

Resumo: Nós testamos um novo procedimento analítico quantitativo de extração de Al em caulim e comparamos os resultados com amostras analisadas pelo método padrão colorimétrico aluminona e leitura por espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. Por meio do novo procedimento, amostras puras de caulim e fezes, e/ou misturadas foram digeridas em mistura ácida nitroperclórica, após, acrescentado ácido fluorídrico e quantificadas por espectrofotometria de absorção atômica. Devem ser tomadas precauções para evitar fumaças tóxicas de SiF_4 geradas durante a digestão das amostras. A acurácia foi avaliada pela comparação do viés médio (predito – observado) entre os procedimentos analíticos; e a robustez, pelo estudo da regressão entre o viés e a porcentagem de caulim presente nas amostras de fezes. Não foi observada diferença ($P \geq 0,05$) entre os resultados encontrados de concentração de Al em amostras de caulim puro, quando comparado os dois procedimentos analíticos avaliados. Todos os valores obtidos apresentaram resultados próximos ao valor esperado, e o processo analítico se mostrou acurado ($P = 0,9436$) e robusto ($R^2 = 0,0002$ e $P = 0,9634$) para extração de Al em amostras de fezes bovinas com caulim. Conclui-se que o procedimento analítico proposto pelo estudo foi eficaz, acurado e robusto quanto a extração de Al de amostras de fezes bovina com caulim.

Palavras-chave: excreção fecal, marcador externo, digestão nitroperclórica

Introdução

O caulim trata-se de uma substância indigestível, cuja as características físicas e químicas (Trckova et al., 2009; Luz et al., 2009), evidenciam o seu uso como potencial marcador externo de bovinos a pasto. Por ser um composto minério, da qual a composição

670 aproxima-se de $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, o caulim torna-se instável em meio ácido, fazendo-se
671 necessário sua determinação de forma indireta por meio de elementos não absorvidos pelo
672 organismo animal, como o alumínio.

673 A digestão nitroperclórica ($\text{HNO} + \text{HClO}_4$) (Malavolta et al., 1997), associada ao método
674 colorimétrico aluminona (ácido aurintricarboxílico) (Brauner et al., 1966), e leitura por meio
675 do aparelho de Espectrofotometria de Emissão Ótica (ICP-OES) (Korn et al., 2007), tem sido
676 o principal procedimento analítico utilizado para obtenção de extratos e determinação do
677 teor de alumínio em matérias orgânicas e inorgânicas. No entanto, esse método é
678 considerado inviável, pois além da demanda de grandes quantidades e diversidades de
679 reagentes, é requerido aparelho específico para a leitura do elemento, considerado oneroso,
680 dificultando sua realização em muitos laboratórios de pesquisas.

681 Outra técnica aplicada na determinação do teor de Al é por meio do aparelho de
682 Espectrofotometria de Absorção atômica em chamas (EAA) (McDoweel, 1992). No entanto,
683 apesar do procedimento sugerido por Malavolta et al. (1997) e Brauner et al. (1966)
684 conseguirem recuperar o alumínio na forma de íon (Al^3) em matérias orgânicas, pelo fato do
685 caulim ser matéria inorgânica e contar com um alumínio silicatado, existe a preocupação de
686 que as ligações de silicato de alumínio não sejam rompidas após o procedimento de extração
687 (Chao & Sanzolene, 1992). E, este óxido refratário formado, impossibilitaria a completa
688 exposição do Al para a sua determinação por meio do aparelho EAA.

689 Diante disso, a busca por procedimentos analíticos simples e acurados que auxiliem na
690 extração de Al em amostras de caulim puro e/ou misturado em fezes bovinas, se faz
691 necessária. Objetivou-se propor um eficiente procedimento analítico capaz de extrair Al de
692 amostras de fezes bovina com caulim.

Posteriormente, todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico apresentado na Tabela 1. De modo geral, a metodologia analítica incluiu a digestão nitroperclórica da amostra como descrito por Malavolta et al. (1997), seguida pela adição de ácido fluorídrico para completo rompimento da sílica ligada ao Al (Chao & Sanzolene, 1992). Uma curva padrão com 0, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/L de Al foi montada por meio da solução padrão de 1000 mg/L de Al (Merck KGaA; Darmstadt, Alemanha). Para a determinação do teor de Al, o extrato foi diluído em solução de óxido de lantânio (0,2 %) e medido no Espectrofotômetro de Absorção Atômica (McDowell, 1992), modelo AAnalyst 400 (Perkin Elmer; Waltham, MA, EUA). Utilizou-se uma lâmpada de cátodo oco de Al como fonte de radiação primária, operada a um comprimento de onda de 309 nm. Aplicou-se o valor encontrado da leitura dos extratos (LTAL, mg/kg) na equação de regressão dos padrões ($R^2 = 0,9996$) para estimar a concentração do Al (mg/kg).

Para o cálculo de concentração de Al em cada amostra, utilizou-se a Equação [1].

$$[Al] \text{ mg/kg} = (LTAL * \text{fator de diluição do extrato}) / \text{peso da amostra, mg} \quad \text{Eq. [1]}$$

Para se conhecer a quantificação de Al proveniente do caulim em amostras compostas (Fezes + caulim), foi determinada através da diferença entre a concentração de Al presente nas fezes com caulim e nas fezes puras, pois as mesmas podem conter algum teor do elemento (Al derivado da dieta). Este foi calculado pela Equação [2].

$$[Al] \text{ no caulim, mg/kg} = \text{Total de Al nas fezes com caulim adicionado} - \text{Al presente nas fezes puras} \quad \text{Eq. [2]}$$

Os resultados encontrados foram comparados com os valores observados de Al obtidos por meio do procedimento analítico padrão para análise de Al, descrito por Malavolta et al. (1997) e Brauner et al. (1966) e, o teor do elemento quantificado pelo aparelho de Espectrofotometria de Emissão Ótica, modelo ICPE série 9800 (Schimadzu Corporation; Quioto, Quioto, Japão).

Análises estatísticas:

Os dados de concentração de Al presente nas amostras de caulim puro foram submetidos a análise de variância pelo teste f, por meio do programa SAS v.9.3 (Sas Institute Inc., Cary, Ca, EUA).

O procedimento analítico de extração de Al em amostras de fezes com caulim foi avaliado quanto à acurácia e à robustez. A acurácia foi avaliada pelo estudo do viés médio, que é a diferença entre o valor predito (procedimento proposto) e o valor observado (procedimento padrão), sendo a metodologia analítica mais acurada à medida que esta possui um viés médio mais próximo de zero (Kohn et al., 1998). A raiz quadrada da média do erro de predição (RQMEP) é a variabilidade média da distância entre o valor predito e o observado ou ainda, a variabilidade dos vieses. Os cálculos foram feitos como descrito por Rodrigues et al. (2010), sendo utilizado o teste t para média igual a zero (PROC UNIVARIATE do SAS) para avaliar a significância do viés médio.

Além da significância do viés médio, os vieses foram ainda avaliados quanto a seu comportamento em função da variação dos valores de concentração de Al na amostra conhecida, de acordo com Kohn et al. (1998). Para isso, foi estimada a regressão entre os vieses e os valores de Al, obtendo-se, desta forma, o viés linear (coeficiente angular), o

coeficiente de determinação do modelo (R^2) e a significância do viés, pelo procedimento GLM do SAS v.9.3 (Sas Institute Inc., Cary, CA, EUA).

Por sua vez, a avaliação da robustez da metodologia analítica proposta foi feita em relação ao nível de caulim presente nas fezes. Foi realizada uma análise de regressão entre os valores de viés das estimativas de Al e as concentrações de caulim nas amostras de fezes. Para isso, foi utilizado o procedimento GLM do SAS v.9.3 (Sas Institute Inc., Cary, CA, EUA).

Em todas as análises foi utilizado um nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Amostras de caulim puro foram processadas e analisadas por meio dos dois procedimentos analíticos avaliados, observou-se que não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os resultados encontrados de concentração de Al entre ambos, apresentando valor médio de 8,65 % (Figura 1).

A fim de se conhecer o teor do Al derivado de fontes externas (dieta), amostras de fezes puras e forragem fornecida ao animal, foram analisadas por meio do procedimento proposto, e foi observada teor médio de 600 mg Al/kg e 800 mg Al/kg, respectivamente.

O procedimento analítico proposto neste estudo apresentou um viés médio estatisticamente ($P \geq 0,05$) igual a zero (Tabela 2), mostrando-se acurado para a extração de Al em amostras de fezes bovinas com caulim. Além disso, considerando-se o estudo do viés linear, a ausência de sua significância ($P = 0,9636$) deste coeficiente e o baixo valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,0002$) da regressão, pode-se dizer que o viés do método analítico se manteve o mesmo ao longo de toda amplitude de concentração de Al presente das amostras.

Quando avaliado o comportamento do viés em relação à porcentagem de caulim nas fezes, verificou-se que o modelo de regressão obtido não foi significativo ($P = 0,9634$), assim como o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,0002$) foi bastante baixo (Tabela 2). Tal fato indica que o método analítico empregado é robusto quanto a variações na concentração de caulim nas fezes, na faixa analisada neste estudo.

Discussão

A determinação de alumínio, de acordo com Malavolta et al. (1997); Brauner et al. (1966) e Korn et al. (2007) por meio do procedimento padrão, apresenta boa sensibilidade, alta precisão e rapidez. Seguindo esses princípios, a partir da semelhança de resultados da extração de Al no composto mineral (caulim puro) pelo procedimento analítico aqui proposto, concluiu-se que este método foi eficiente em realizar a extração do Al em matéria inorgânica (Figura 1).

O processo analítico baseou-se na teoria de que a ação da digestão nitroperclórica sobre matérias inorgânicas apresenta alta eficácia. Porém, para que haja completa decomposição de alguns minerais complexos, como por exemplo o silicato (SiO), faz-se necessário combinar soluções ácidas com o ácido fluorídrico (HF) (Malavolta et al., 1997; Chao & Sanzolene, 1992).

Sendo assim, no caso de o caulim ser um alumino silicato hidratado ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$), as matrizes de SiO associadas ao Al, apenas são dissolvidas com a presença do HF. Este processo ocorre devido ao flúor (F) ser um elemento mais eletronegativo, ou seja, possui a maior afinidade por elétrons. Assim, de acordo com Chao & Sanzolene (1992) as ligações silicatadas em contato com o íon F^- são rompidas, formando SiF , que é volatilizado em meio aquecido.

807 Por meio disso, toda a associação do Al associado ao SiO presente no produto caulim foi
808 rompida, liberando o Al para a completa quantificação do elemento.

809 Como observado, o teor de Al encontrado nas matérias orgânicas (fezes puras; 600 mg
810 Al/kg) apresenta-se baixo. Considerando o fato de que as amostras não tiveram adição de
811 caulim, presume-se que a baixa concentração de Al encontrada seja causada por meio de
812 ingestão do elemento via solo e forragem (Underwood, 1977). Isto pôde ser confirmado na
813 concentração do elemento presente na forrageira fornecida aos animais no estudo.

814 Ainda que nestas baixas concentrações, o Al está presente nas forragens, e encontra-se
815 associado a outros elementos, como o oxigênio e/ou silício. Essa ligação o torna insolúvel em
816 condições ambientais e a absorção deste elemento no metabolismo do animal é mínima
817 (Miller et al., 1984; Underwood, 1977). De acordo com esses autores, quando consumido
818 pelos animais, seja por ingestão natural via forragens, solo, água, etc., ou fornecidos em
819 suplementos, praticamente todo o Al é eliminado via fezes.

820 Entanto, como existe esta interferência dietética, para se determinar a concentração de
821 Al proveniente somente do caulim faz-se necessária a correção dos valores correspondentes
822 presentes nas fezes, correspondentes a estas fontes (forragens, solo e água).
823 Semelhantemente, Myers et al. (2004) quando avaliaram o uso de dióxido de titânio como
824 marcador de excreção fecal de animais em pastejo, observaram a presença de valores do
825 composto (TiO_2) provenientes de fontes externas ao ensaio, sugerindo então ajuste dos
826 resultados finais.

827 A busca por métodos acessíveis que promove resultados acurados, precisos e robustos
828 para a quantificação do teor de Al no caulim se torna necessário. Neste sentido, comprova-
829 se os dados observados (Tabela 2), que o método preposto foi acurado e robusto para a

830 recuperação total do alumínio após a extração nas amostras de matéria orgânica (fezes
831 bovinas) associada a matérias inorgânicas (caulim).

832 O caulim apresenta-se como uma alternativa potencialmente viável como indicador de
833 baixo custo: é um composto inerte em uma ampla faixa de pH (3 a 9), tem fácil dispersão,
834 baixa condutividade térmica e elétrica e pouca abrasividade (Trckova et al., 2009; Luz et al.,
835 2009). Segundo Trckova et al. (2009) as características de adsorção e ausência de toxicidade
836 primária do caulim possibilitam considerá-lo isento de efeitos tóxicos no ambiente e/ou em
837 organismos vivos.

838 Por outro lado, o método analítico pode ser considerado economicamente mais viável
839 e metodologia simples e prática, facilitando seu processo em diversos meios de pesquisas,
840 quando se comparado a técnica padrão. Além do fato de o Brasil deter aproximadamente
841 28% das reservas mundiais de caulim (Luz et al., 2009), facilita a obtenção deste produto em
842 nosso país, a um baixo custo.

843

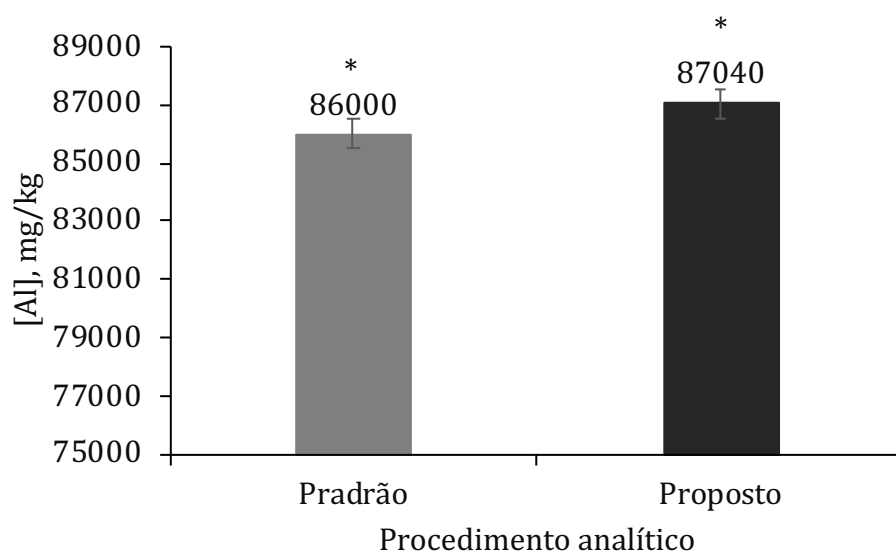
Tabelas

844 Tabela 1. Procedimento analítico para determinação indireta da concentração de caulim em
845 matéria orgânica

-
- 1º Pesar duplicado 0,2000 g de material seco e colocar em tubo de digestão de 250 mL.
Obs. Amostras de fezes puras são utilizados para correção.
 - 2º Adicionar 6 mL de mistura ácida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ na proporção 2:1 (v:v) em cada tubo.
 - 3º Digerir as amostras à 220°C em bloco digestor por 4 horas, ou até que as amostras estejam translúcidas. Remover os tubos de digestão do bloco digestor em seguida esperar esfriar por um período mínimo de 20 min.
 - 4º Adicionar 0,15 mL de ácido fluorídrico P.A. em cada tubo e aquecer no bloco digestor à 150°C por 10 min.
 - 5º Filtrar o extrato com papel filtro Whatman No. 541 para remover qualquer precipitado.
 - 6º Completar com água deionizada o volume final de 50 mL utilizando balão volumétrico.
 - 7º Para o procedimento da quantificação do Al, diluir o extrato com óxido de lantânio (0,2 %) na proporção de 1:2 (v/v).
 - 8º Mensurar a absorbância à 309 nm. Espectrofotômetro calibrado com a curva padrão preparada com 0, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/L de Al. Usa-se o padrão 0 mg/L para zerar o aparelho.
-

846

847



856 Figura 1. Concentração de alumínio presente em amostras de caulim puro observada em
857 diferentes procedimentos analíticos de extração do elemento. $*P \geq 0,05$

858 Tabela 2. Parâmetros de acurácia e robustez do procedimento analítico de extração de
 859 alumínio e a concentração de caulim no extrato de amostras de fezes bovina com a quantidade
 860 conhecida de caulim¹

	Valor predito	Valor observado	Viés médio ²	RQPEM ²	Regressão Linear ³		
					Viés linear	R ²	Valor – <i>P</i>
Concentração de Al, mg/kg	2790.2	2653.3	136.9 ^{ns}	673.7	-0.015	0.0002	0.961
Porcentagem de Caulim, %	3.24	3.08	136.9 ^{ns}	717.1	-12.63	0.0002	0.963

861 ¹Média dos resultados das concentrações das amostras conhecidas foram estimados por
 862 meio da metodologia ICP-OS no LAQAM (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

863 ²Probabilidade do teste t para média igual a 0.

864 ³Estimativa do coeficiente angular da equação linear de regressão entre os vieses e a
 865 respectiva variável independente (procedimento padrão).

866 ^{ns} não significativo;

Referências

- 867
- 868 Brauner, J. L.; R. A.; Catani, W.C. and Bittencourt, W. C. 1966. Extração e determinação do
- 869 alumínio trocável do solo. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 23:53-
- 870 73. <https://doi.org/10.1590/S0071-12761966000100006>
- 871 Chao, T. T. and Sanzolone, R. F. 1992. Decomposition techniques. Journal of Geochemical
- 872 Exploration. 44:65-106. [https://doi.org/10.1016/0375-6742\(92\)90048-D](https://doi.org/10.1016/0375-6742(92)90048-D)
- 873 Kohn, R. A.; Kalscheur, K. F. and Hanigan, M. 1998. Evaluation of models for balancing the
- 874 protein requirements of dairy cows. Journal of Dairy Science. 81:3401-3414.
- 875 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75904-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75904-1)
- 876 Korn, M. G. A.; Oleszezuk, N.; Castro, J. T. and Silva, M. M. 2007. Method development for the
- 877 determination of manganese, cobalt and copper in green coffee comparing direct solid
- 878 sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma
- 879 optical emission spectrometry. Talanta. (Oxford). 73:862-869.
- 880 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.005>
- 881 Luz, A. B.; Carvalho, E. A.; Bertolino, L. C. and Scorzelli, R. B. 2009. Caulim. p. 255-294. In:
- 882 Rochas & Minerais Industriais: usos e especificações. 2 ed. Rio de Janeiro - CETEM/MCT.
- 883 Malavolta, E.; Vitti, G. S. and Oliveira, S. A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas:
- 884 princípios e aplicações. 319p. 2.ed. Piracicaba, POTAFOS.
- 885 Mcdowell, L.R. 1992. Minerals in animal and human nutrition. p.352-365. Academic Press,
- 886 Inc, California.
- 887 Miller, R. G.; Kopfler, F. C.; Kelty, K. C.; Stober, J. A. and Ulmer, N. S. 1984. The occurrence of
- 888 aluminum in drinking water. J. Am. Water Works Assoc. 76:84-91.
- 889 <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1984.tb05267.x>

890 Myers, W. D.; Ludden, P. A.; Nayigihugu, V. and Hess, B. W. 2004. A procedure for the
891 preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal*
892 *Science*, 82:179-183. doi: 10.2527 / 2004.821179x.

893 Rodrigues, P. H. M.; Gomes, R. C.; Siqueira, R. F. D.; Meyer, P. M. and Rodrigues, R. R. 2010.
894 Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca
895 determinada com o uso de indicadores em ovinos. *R. Bras. Zootec.* 39:1118-1126.
896 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000500024>

897 Trckova, M.; Vondruskova, H.; Zrally, Z.; Alexa, P.; Hamrik, J.; Kummer, V.; Maskova, J.; Mrlik,
898 V.; Krizova, K.; Slana, I., Leva, L and Pavlik, I. 2009. The effect of kaolin feeding on efficiency,
899 health status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*
900 strains in weaned piglets. *Veterinarni Medicina*. 54:47–63. doi: 10.17221/5/2009-VETMED

901 Underwood, E. 1977. *J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition* 4. p 430–432.
902 Academic Press, New York.

903 Capítulo 4. Capítulo redigido conforme as normas da revista *Animal*

904 **Caulim e dióxido de titânio como marcadores externos de excreção fecal de**
 905 **garrotes em pastejo**

906 Título curto: Caulim como marcador fecal de bovinos
 907

908 **Resumo**

909 No *Exp. 1*, buscou-se substituir o dióxido de titânio pelo caulim, fornecidos via oral, como
 910 marcadores fecais, enquanto se utilizou o óxido crômico como marcador do consumo de
 911 suplemento. Foram realizados três ensaios sequenciais, sendo que em cada ensaio
 912 utilizou-se quatro garrotes Nelore inteiros ($223,4 \pm 5,4$ kg, $253,6 \pm 2,8$ kg e $312,0 \pm 15,8$
 913 kg de PC médio no 1º, 2º e 3º ensaio, respectivamente), que receberam individualmente
 914 e simultaneamente 20 g de TiO_2 e 80 g de caulim/animal via oral, 2,0 kg de suplemento
 915 contendo 1% de óxido crômico. Afim de avaliar a diferença das avaliações nutricionais
 916 entre diferentes horários de coleta de fezes foram coletadas fezes em dois horários
 917 (08h00min e 16h00min), após realizada uma amostra composta destes. Não foram
 918 verificadas diferenças significativas ($P=0,7976$) na determinação da excreção fecal
 919 quando determinados pelos marcadores externos dióxido de titânio e caulim, e
 920 comparados entre eles. Quando foram comparados os resultados finais por meio de
 921 coletas de fezes em diferentes horários, não foi verificado efeito significativo entre os
 922 valores estimados. Conclui-se que o caulim foi capaz de estimar a excreção fecal de
 923 bovinos de corte a pasto, e o manejo de coleta de fezes realizada uma vez ao dia é
 924 suficiente para estimar as avaliações nutricionais dos mesmos. No *Exp. 2*, avaliou-se a
 925 possibilidade de substituir o dióxido de titânio pelo caulim, fornecidos via suplemento,
 926 como marcadores de excreção fecal em bovinos de corte a pasto (4 garrotes/estudo; 360
 927 dias de idade). Observou-se que o caulim apresentou resultados superiores ($P \leq 0,0002$)
 928 ao estimado pelo TiO_2 (2,70 e 5,25 kg/d, respectivamente; EPM = 0,357). Conclui-se que
 929 o fornecimento via suplemento do marcador externo caulim, não permitiu a estimativa de
 930 excreção fecal de garrotes.

931

932 **Palavras-chave: bovinos de corte, consumo diário, digestibilidade**

933 **Introdução**

934 Existem diversos métodos para a avaliação do CMS de animais a pasto, mas a
935 medida por meio da estimativa de excreção fecal e digestibilidade de matéria seca são
936 as mais utilizadas, e tem sido feita com a utilização de marcadores externos e/ou
937 internos. Os marcadores são substâncias indigestíveis, utilizadas como monitores
938 químicos e físicos em processos digestivos e metabólicos (Owens & Hanson 1992).
939 Essas substâncias, ao se comparar com metodologias invasivas existentes, minimizam
940 a interferência com os padrões de comportamento animal e simplificam os
941 procedimentos, tendo em vista a não necessidade de utilização de cânulas permanentes
942 no trato digestivo, sacolas de coleta de fezes e até mesmo esvaziamento do trato
943 digestivo ou abate dos animais.

944 Dentre os marcadores mais utilizados mundialmente, destaca-se o dióxido de
945 titânio (TiO_2). O uso de TiO_2 apresenta grandes vantagens, pois além do fato de que ele
946 é permitido legalmente ser adicionado ao alimento, é um pó com coloração branca sem
947 odor ou sabor, não influenciando o consumo do mesmo quando fornecido aos animais
948 por meio da suplementação (Myers et al. 2004). Com isso, além desse composto
949 destacar-se pela eficiência como marcador para estimar a DMS, CMS e EF semelhantes
950 aos observados, a uniformidade da recuperação fecal tem sido observada de 90,0 a
951 108,8% (Souza et al., 2015; Marcondes et al. 2008; Myers et al. 2004; Titgemeyer et al.
952 2001).

953 Tem sido reconhecido que a escolha do marcador representa um passo importante
954 quando se pretende estimar o consumo alimentar dos animais. Como todos os métodos
955 utilizados para estimar o CMS de bovinos em pastejo possuem limitações (Berchielli et

al. 2011; Ferreira et al. 2009; Detmann et al. 2004) e, segundo Carvalho et al. (2007) apesar dos avanços metodológicos, as estimativas ainda são deficientes em confiabilidade, a busca por novas substâncias (moléculas) que apresentem propriedades favoráveis se justifica.

Como alternativa destaca-se o caulim, possível marcador externo para estimar o consumo, pois se trata de um mineral cujas características evidenciam possibilidade de uso. Além de ser um produto utilizado rotineiramente em fábricas de ração para “preencher” fórmulas, o que facilita já sua mensuração não necessitando de fornecimento aos animais. O objetivo deste estudo foi comparar o uso do caulim e do dióxido de titânio como marcadores externos, para estimação da excreção fecal e do consumo de matéria seca de garrotes Nelore em pastejo.

Material e métodos

Todos as análises químicas de laboratórios foram diligentemente realizadas conforme as normas de segurança do Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte. Manejo e cuidado dos animais para os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais Agrícolas em Pesquisa e Ensino (FASS, 2010). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS, Brasil, No. 15/2017.

Experimentos

Foram realizados dois experimentos. No primeiro, buscou-se substituir o dióxido de titânio pelo caulim, fornecidos via oral, como marcadores fecais, enquanto se utilizou o

óxido crômico como marcador do consumo de suplemento. No segundo experimento, avaliou-se a possibilidade de substituir o dióxido de titânio pelo caulim, fornecidos via suplemento, como marcadores de excreção fecal.

Experimento 1. Foram realizados três ensaios independentes, sendo cada um composto por quatro garrotes Nelore ($223,4 \pm 5,4$ kg, $253,6 \pm 2,8$ kg e $312,0 \pm 15,8$ kg de PC médio no 1º, 2º e 3º ensaio, respectivamente), que receberam 20 g de TiO_2 e 80 g de caulim/animal via oral, como marcadores externos de excreção fecal e, mais 2,0 kg de suplemento proteico energético (1,0 kg na parte da manhã e 1,0 kg na parte da tarde) contendo 1% de óxido crômico, como marcador de consumo de matéria seca de suplemento.

A fim de avaliar a diferença das estimativas entre diferentes horários de coleta de fezes, amostras fecais de cada animal foram coletadas em dois horários (08h00min e 16h00min), após o que, procedeu-se à elaboração de uma amostra composta destes.

Experimento 2. Foram realizados três ensaios independentes, sendo cada um composto por quatro garrotes Nelore ($279,1 \pm 16,7$ kg, $239,0 \pm 7,1$ kg e $271,0 \pm 2,5$ kg de PC médio no 1º, 2º e 3º ensaio, respectivamente) que receberam em grupo, 2,0 kg/animal de suplemento proteico energético (1,0 kg na parte da manhã e 1,0 kg na parte da tarde) com a adição de TiO_2 e caulim (proporção de 1 % e 4 %, respectivamente).

Em ambos os experimentos, cada ensaio independente teve duração de dezesseis dias cada. Sendo, nos três primeiros dias de cada ensaio ofereceu-se aos animais o

1002 pasto e o suplemento sem os marcadores, a fim de se conhecer a concentração de Al
1003 derivada da dieta (Al basal). O fornecimento dos marcados testados via sonda esofágica
1004 e/ou suplemento começou a partir do 4º dia e, para se alcançar o equilíbrio da excreção
1005 fecal, esperou-se até o 10º dia antes de iniciar-se as coletas. As coletas de fezes foram
1006 feitas entre o 11º e 16º dia.

1007

1008 *Alojamento e Dieta*

1009 Durante os ensaios, os animais ficaram alocados em uma área de 25 hectares com
1010 *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com 2.542,5 kg MS/ha de massa forrageira (8,4 %
1011 proteína bruta; 56,5 % nutrientes digestíveis totais; 65,3 % fibra em detergente neutro;
1012 35,5 % fibra em detergente ácido; 89,6 % matéria orgânica; 0,08% de Al; com base na
1013 MS), sendo manejados pelo método de pastejo contínuo. O suplemento mineral proteico-
1014 energético® que era fornecido aos animais, incluiu 20 % de proteína bruta e 79 % de
1015 nutrientes digestíveis totais. Contendo em sua composição milho, farelo de soja,
1016 carbonato de cálcio, sal, fosfato bicálcio micro, melaço pó, ureia, enxofre pó, óxido de
1017 magnésio, óxido de zinco, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de cobalto,
1018 iodato de cálcio e selenito de sódio.

1019

1020 *Manejo*

1021 Ao início de cada ensaio, procedeu-se a pesagem com jejum de sólidos dos
1022 animais. Os animais eram levados ao curral duas vezes ao dia, às 08h00min e às
1023 16h00min, para serem feitas as coletas retais de fezes e o fornecimento dos marcadores
1024 por via oral e/ou via suplemento aos animais.

A cada ensaio foi feita uma avaliação quantitativa e qualitativa do pasto. Foi realizada uma avaliação da disponibilidade da forragem pelo o método do “rendimento comparativo” descrito por Haydock & Shaw (1975). A fim de se estimar o valor nutricional da pastagem consumida pelos animais, realizou-se a amostragem do pasto pelo método do pastejo simulado (Euclides et al., 1992).

Análises laboratoriais

O Caulim[®] (Silicate e Indústria e Comércio Ltda; Nova Campina, SP, Brasil), foi oriundo de extração e processamento de rocha do grupo sedimentar metamórfica, sendo o silicato de alumínio como principal ingrediente com 8,67 % de Al. O produto apresenta densidade de 0,8 g/cm³, pH de 6,5 com granulometria de $99,9 \leq 0,3\text{mm} < 0,1\%$ e $82\% \leq 0,075\text{mm} < 18\%$. Por ser um produto comercial e sua composição variar de acordo com a região, se faz necessário todas as avaliações físicas e químicas específicas de cada composto por estudo.

As amostras de fezes, pasto e suplemento, depois de pré-secas em estufa de ventilação forçada (55 °C/72 h) foram trituradas em moinho inox com peneira de 1 mm, e posteriormente analisadas para seu conteúdo de matéria seca (MS) (método 930.15), proteína bruta (PB) (método 976.05) (AOAC, 1990), fibra em detergente neutro e em detergente ácido (FDN e FDA) (Van Soest et al., 1991). O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) foi estimado segundo equação determinada por Cappelle et al. (2001).

A dosagem de cromo nas fezes foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, conforme método descrito por Silva & Queiroz (2002), e, o teor de titânio nas

1047 fezes foi mensurado por espectrofotometria colorimétrica conforme metodologia descrita
1048 por Myers et al., (2004).

1049 O teor do caulim foi quantificado indiretamente por meio da determinação do Al
1050 proveniente da substância e do teor deste elemento no caulim. No cálculo do Al oriundo
1051 do Caulim, subtraiu-se, do total de Al das fezes, o teor de Al das fezes puras antes do
1052 fornecimento do Caulim. A determinação do alumínio foi realizada por meio do
1053 procedimento analítico proposto no Artigo 2.

1054 As amostras de suplemento, forragem e fezes foram ainda quantificadas para o teor
1055 de FDNi (marcador interno, utilizado na estimativa do consumo de MS a partir da
1056 excreção fecal), segundo o método descrito por Van Soest et al., (1991). Porém, adotou-
1057 se incubação ruminal *in situ* por 240 horas, como sugerido por Orskov et al., (1980).

1058

1059 *Cálculos*

1060 A estimativa da excreção fecal (EF) foi estimada conforme descrito por Smith &
1061 Reid (1955) e o consumo de matéria seca de suplemento, de forragem e total de acordo
1062 com as equações descritas por Fernandes et al. (2012) e Ferreira et al. (2009).

1063

1064 *Análises estatísticas*

1065 Em ambos os experimentos os dados foram analisados segundo um modelo que
1066 considerou, além do efeito fixo de tratamento, os efeitos aleatórios de ensaio (3
1067 ensaios/experimento) e de animal dentro de ensaio.

1068 Para se avaliar o efeito dos horários de coletas de fezes sobre as estimativas, no
1069 experimento 1, as estimativas de excreção fecal, e consumos de MS total, da forragem

1070 e do suplemento foram comparadas a partir de um modelo que considerou, além dos
1071 efeitos fixos de hora da coleta e do marcador utilizado, os efeitos aleatórios de ensaio e
1072 de animal dentro de ensaio.

1073 Quando verificado efeito de tratamento de marcadores, os tratamentos foram
1074 comparados pelo teste de Dunnett. Utilizou-se o SAS University (SAS Institute Inc., Cary,
1075 CA, EUA) em todas as análises estatísticas. Adotou-se um nível de significância de 5%
1076 em todas as análises estatísticas.

1077

1078 **Resultados**

1079 *Experimento 1.* Não foram verificadas diferenças significativas ($P=0,798$) na
1080 determinação da excreção fecal utilizando-se os marcadores externos dióxido de titânio
1081 ou caulim (Tabela 1). Também não foi detectada diferença ($P>0,05$) entre os valores
1082 médios estimados de consumo de matéria seca de suplemento, forragem e total,
1083 utilizando-se os mesmos marcadores fecais.

1084 Quando as médias da excreção fecal ou do consumo baseadas nas coletas de
1085 fezes realizadas em diferentes horários (0800h, 1600h ou composta), foram comparadas,
1086 também não foi verificado efeito significativo ($P>0,05$) destes horários (Tabela 2).

1087

1088 *Experimento 2.* As estimadas de excreções fecais de matéria seca diferiram ($P = 0,002$)
1089 entre si, quando os marcadores caulim e dióxido de titânio foram comparados (2,70 e
1090 5,25 kg/d, respectivamente; EPM = 0,357) (Figura 1).

1091

1092 **Discussão**

1093 *Experimento 1.* O uso de dióxido de titânio apresenta grandes vantagens como marcador
1094 externo, pois além do fato de que ele é permitido legalmente ser adicionado ao alimento,
1095 é um pó com coloração branca sem odor ou sabor, não influenciando o consumo do
1096 suplemento quando fornecido aos animais (Myers et al. 2004). Souza et al. (2015),
1097 Ferreira et al. (2009), Marcondes et al. (2008), Myers et al. (2004) e Titgemeyer et al.
1098 (2001) também concluíram que este marcador é eficaz e sua estimativa de excreção
1099 fecal não apresenta diferença significativa, quando comparado à coleta total de fezes.
1100 Concluindo ser um marcador eficiente, que apresenta resultados consistentes, tornando
1101 válido os resultados obtidos para comparação (Tabela 1).

1102 Partindo dessa premissa, os resultados mostraram semelhança das estimativas de
1103 excreção fecal e consumos de matérias seca feitas a partir do uso do caulim (Tabela 1).
1104 Pode-se inferir que este marcador estudo é adequado para estimar avaliações
1105 nutricionais de bovinos em sistema de pastejo, se apresentando como uma nova
1106 alternativa como marcador fecal igualmente o dióxido de titânio.

1107 Por outro lado, os marcadores podem apresentar variações nas concentrações
1108 fecais devido a sua administração aos animais, devido a manejos rigorosos que exigem
1109 levar os animais ao curral duas ou mais vezes por dia. Assim, o estudo tem possibilitado
1110 ajustes nas coletas (uma vez ao dia) e análises (vício de amostragem e procedimentos
1111 laboratoriais), melhorando a precisão das técnicas para estimativas de consumo de
1112 matéria seca (Tabela 2).

1113 Diversos estudos (Oliveira et al., 2004; Detmann et al., 2001) corroboram o aqui
1114 observado (que uma única coleta de fezes por dia, apresenta resultados coerentes com
1115 os valores observados ao se trabalhar com amostras compostas de coletas em vários

1116 horários). Isto abre a possibilidade de se diminuir a mão de obra, facilitar o manejo e
1117 reduzir o estresse dos animais durante o período de experimento de digestibilidade.

1118 Diante desse cenário, o Caulim, além de apresentar resultados semelhantes ao
1119 marcador utilizado mundialmente, apresenta menor custo, tornando-o uma alternativa
1120 viável para os estudos de digestibilidade de animais a pasto.

1121 Outras vantagens do uso do Caulim como marcador se dão ao fato de ser inerte e
1122 composto natural, não sendo prejudicial ao animal e saúde humana (Trckova et al.,
1123 2009).

1124 *Experimento 2.* Segundo Owens & Hanson (1992), na administração de marcadores via
1125 suplemento existe grande variabilidade na sua concentração nas fezes. Isto pode ser
1126 devido às variações no consumo diário do suplemento. As variações no consumo de
1127 suplemento (devido a estresse, dominância hierárquica, etc...), afetam diretamente o
1128 consumo do marcador misturado a este suplemento, alterando assim a excreção fecal
1129 destes marcadores, e as estimativas de excreção e consumo daí derivadas. Podendo
1130 confirmar os dados observados por meio da diferença entre as estimativas de excreções
1131 fecais entre os marcadores avaliados (Figura 1).

1132 Diferente dos dados obtidos, Ribeiro et al. (2018) observaram que o fornecimento
1133 do caulim como marcador fecal, por meio do suplemento de bovinos, segundo resulta
1134 em estimativas semelhantes aos valores reais (coleta total). Concluindo-se que a
1135 substância além das características apresentadas, possui grande potencial de ser
1136 fornecido por meio da alimentação, não havendo a necessidade de manejo rigoroso com
1137 consequências negativas sobre o comportamento ingestivo dos animais.

Diante disso, o que se aplica nos resultados obtidos (Figura 1) que poderia explicar esta maior variação nas estimativas, segundo Rodrigues et al. (2010) seriam as perdas que podem ocorrer por adesão no cocho ou durante a mastigação, levando a uma ingestão dos marcadores menor que a esperada. O que pode ser explicado no presente estudo, pois observou-se a presença de resíduos brancos no cocho após o consumo de suplementos adicionados com dióxido de titânio e com caulim, no estudo. Neste caso, possivelmente uma recuperação incompleta do marcador caulim pode ter levado a estes resultados divergentes (Figura 1).

Referências

- AOAC 1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. The Association of official analytical chemists. 15 ed. Arlington, VA, USA.
- Berchielli TT, García AV, Oliveira SG 2011. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In Nutrição de ruminantes (2 ed. Berchielli TT, Garcia AV, Oliveira SG), pp. 415-436. Funep, Jaboticabal, BRA.
- Cappelle ER, Silva JFC, Cecon PR 2001. Estimativas do Valor Energético a partir de Características Químicas e Bromatológicas dos Alimentos. Rev. Bras. Zoot. V. 30, pp. 1837-1856.
- Carvalho PCF, Kozloski GV, Ribeiro Filho HMN, Reffatti MV, Genro TCM, Euclides VPB 2007. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. Revista Brasileira de Zootecnia. V. 36, pp. 51-170.
- Detmann E, Valadares Filho SC, Paulino MF 2004. Avaliação da técnica de marcadores na estimação do consumo por ruminantes em pastejo. Cad. Tec. Vet. Zootec. V.46, pp. 40-47.
- Detmann E, Cecon PR, Paulino MF, Zervoudakis JT, Valadares Filho SC, Araújo, CV 2001. Estimação de parâmetros da cinética de trânsito de partículas em bovinos sob pastejo por diferentes sequências amostrais. Revista Brasileira de Zootecnia. V. 30, p. 222-230,

- 1166 Euclides VPB, Macedo MCM, Oliveira MP 1992. Avaliação de diferentes métodos de
1167 amostragem para se estimar o valor nutritivo de forragens sob pastejo. Revista
1168 Brasileira de Zootecnia. V.21, pp.691-702.
- 1169 FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research
1170 and Teaching. (ed.3 Federation of Animal Science Societies). Savoy, IL, EUA.
- 1171 Fernandes HJ, Paulino MF, Detmann E 2012. Avaliação nutricional, durante a
1172 amamentação de tourinhos em pastejo recebendo suplementação proteica da
1173 amamentação à terminação. Revista Brasileira de Zootecnia. V. 41, pp. 374-383.
- 1174 Ferreira MA, Inácio M, Marcondes MLP, Paulino MF, Valadares RFD 2009. Avaliação de
1175 marcadores em estudos com ruminantes: digestibilidade', Revista Brasileira de
1176 Zootecnia. V. 38, pp. 1568-1573.
- 1177 Haydock KP, Shaw NH 1975. The comparative yield method for estimating dry matter
1178 yield of pasture. Aust. J. Agri. Anim. Husb. V.15, pp.663- 6670.
- 1179 Marcondes MI, Valadares Filho SC, Paulino PVR, Detmann E, Paulino MF, Diniz LL,
1180 Santos TR 2008. Consumo e desempenho de animais alimentados individualmente
1181 ou em grupo e características de carcaça de animais Nelore de três classes
1182 sexuais. Revista Brasileira de Zootecnia. V.37, pp. 2243-2250.
- 1183 Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu, V, Hess BW 2004. Technical Note: A procedure for
1184 the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. Journal of
1185 Animal Science. V. 82, pp. 179-183.
- 1186 Oliveira LOF, Saliba OS, Amaral TB, Oliveira A 2004. Avaliação de diferentes períodos
1187 de oferecimento de óxido crômico como marcador externo nas estimativas de
1188 consumo para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
1189 ZOOTEKNIA, V. 14., 2004. Campo Grande. Anais... Campo Grande: Sociedade
1190 Brasileira de Zootecnia. 1 CD-ROM.
- 1191 Orskov ER, Deb Hovell FD, Mould F 1980. The use of the nylon bag technique for the
1192 evaluation of feedstuffs. Trop Anim Prod. V.5, pp.195-213.
- 1193 Owens FN, Hanson CF 1992. External and internal markers for appraising site and extent
1194 of digestion in ruminants. Journal Dairy Science. v. 75, pp. 2605-2617.

- 1195 Smith AM, Reid JT 1955. Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the
 1196 purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. *Journal of*
 1197 *Dairy Science*. V. 38, pp. 515-524.
- 1198 Souza J, Batistel F, Welter KC, Silva MM, Costa DF, Santos, FAP 2015. Evaluation of
 1199 external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows.
 1200 *Tropical animal health and production*. V. 47, pp. 265-268.
- 1201 Titgemeyer EC, Armendariz CK, Bindel DJ 2001. Evaluation of titanium dioxide as a
 1202 digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*. V. 79, pp. 1059-1063.
- 1203 Titgemeyer EC 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of*
 1204 *Animal Science*. V. 75, pp. 2235-2247.
- 1205 Trckova M, Vondruskova H, Zraly Z, Alexa P, Hamrik J, Kummer V, Maskova J, Mrlik V,
 1206 Krizova K, Slana I, Leva L, Pavlik I 2009. The effect of kaolin feeding on efficiency,
 1207 health status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic
 1208 *Escherichia coli* strains in weaned piglets. *Veterinarni Medicina*. V. 54, pp. 47-63.
- 1209 Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral
 1210 detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.
 1211 *Journal Dairy Science*. V. 74, pp. 3583-3597.

1212

Tabelas

1213 Tabela 1. Utilização do caulim ou do dióxido de titânio para a estimativa de excreção
 1214 fecal e do consumo de matéria seca de garrotes nelore em pastejo

Item	Marcador externo			Valor – <i>p</i>
	TiO ₂	Caulim	EPM*	
Excreção fecal, kg/d	4,0188	4,1031	0,2322	0,7976
CFO, kg/d	6,6796	6,8775	0,4009	0,6930
CSUP, kg/d	0,6698	0,6741	0,0561	0,9258
CMS, kg/d	7,3494	7,5516	0,4346	0,7098

1215 *EPM: Erro padrão médio.

1216 CFO: Consumo de forragem utilizando FDNi como marcador interno;

1217 CSUP: Consumo de matéria seca de suplemento;

1218 CMS: Consumo de matéria seca total utilizando FDNi como marcador interno.

1219 Tabela 2. Utilização de amostras de fezes coletadas em diferentes horários ou da
 1220 amostra composta destas na estimativa da excreção fecal e do consumo de matéria seca
 1221 em garrotes Nelore em pastejo

Item	Horas de coleta de fezes			EPM*	Valor - <i>P</i>
	08h00min	16h00min	Composta		
Excreção fecal, kg/d	3,8322	4,0251	4,0610	0,2256	0,3930
CFO, kg/d	6,4077	6,7355	6,7786	0,4429	0,4012
CSUP, kg/d	0,6719	0,6640	0,6720	0,0483	0,9547
CMS, kg/d	7,0797	7,3995	7,4505	0,4796	0,4610

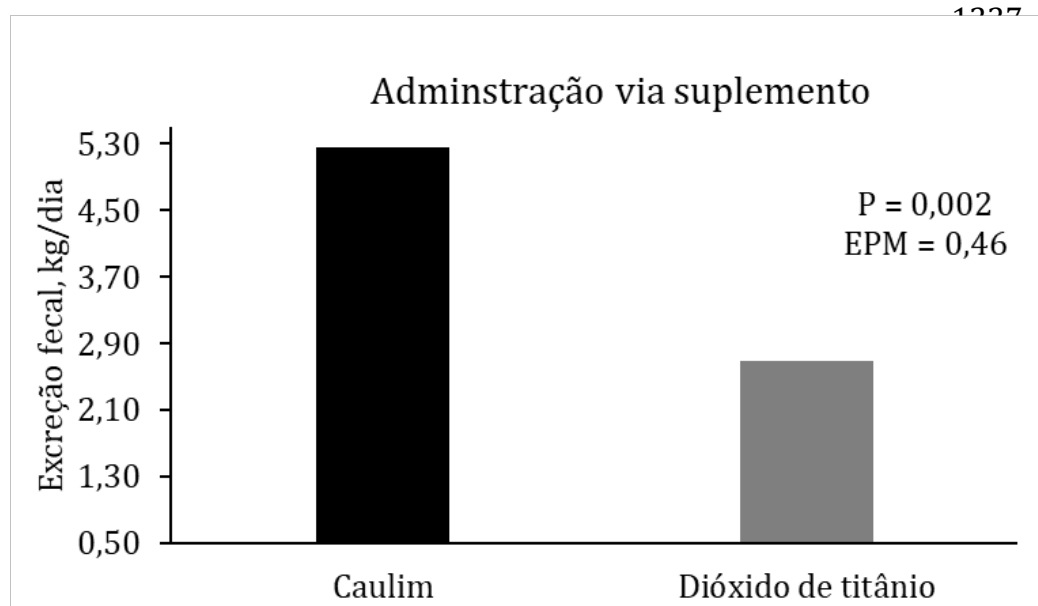
1222 *EPM: Erro padrão médio.

1223 CFO: Consumo de forragem utilizando FDNi como marcador interno;

1224 CSUP: Consumo de matéria seca de suplemento;

1225 CMS: Consumo de matéria seca total utilizando FDNi como marcador interno.

1226

Figura

1236 Figura 1. Médias dos quadrados mínimos da excreção fecal (kg/d) estimada a partir do
1237 dióxido de titânio e do caulim, administrados via suplemento de garrotes Nelore em
1238 pastejo.

1239 Capítulo 4. Capítulo redigido conforme as normas da revista *Animal*

1240 **Caulim como marcador de consumo de suplemento de bovinos em pastejo**

1241 Título curto: Caulim como marcador de digestão de bovinos

1242

1243 **Resumo**

1244 Foram realizados dois experimentos simultâneos para avaliar a substituição do LIPE®
1245 como estimador da excreção fecal, e do óxido crômico como estimador do consumo de
1246 suplemento por Caulim (Exp. 1) e dióxido de titânio (Exp. 2). Foram utilizados doze
1247 garrotes Nelore (4 garrotes/tratamento; $233 \pm 6,2$ kg de PC). Os animais foram
1248 distribuídos em um delineamento de quatro quadrados latinos 3 x 3 simultâneos. No
1249 modelo, considerou-se o efeito fixo de tratamento, e os efeitos aleatórios de animal
1250 (dentro de cada QL), período e de quadrado latino. Quando verificado efeito de
1251 tratamento, os tratamentos de substituição foram comparados com o tratamento controle
1252 pelo teste de Dunnett. Adotou-se um nível de significância de 5% em todas as análises.
1253 Foi estimada a regressão linear dos dados observados pelos dados preditos por cada
1254 tratamento e avaliados o coeficiente de determinação e o teste F simultâneo para
1255 identidade dos parâmetros. Outros critérios utilizados foram o coeficiente de correlação
1256 e concordância, a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição e a partição do
1257 quadrado médio do erro de predição em vício médio, vício sistemático e erro aleatório.
1258 Todos os cálculos das estatísticas de avaliação foram realizados utilizando-se o MES.
1259 Observou-se valores médios semelhantes de excreção fecal ($P \geq 0,05$) quando
1260 comparadas as médias entre as estimativas pela LIPE® vs. caulim e LIPE vs. TiO_2 . Não
1261 houve efeito ($P \geq 0,05$) no consumo de matéria seca de suplemento, forragem e total
1262 entre os marcadores (caulim vs. Cr_2O_3 e TiO_2 vs. Cr_2O_3). Observou-se que as estimativas
1263 por meio do TiO_2 apresentaram dados menos dispersos e maior CCC ($R^2 = 0,54$ e $0,32$;
1264 $\text{CCC} = 0,74$ e $0,62$, respectivamente), maior valor do quadrado médio do erro de predição
1265 observado na estimativa pelo caulim ($\text{RQMEP} = 40,5$) quando comparado ao TiO_2
1266 ($\text{RQMEP} = 30,4$). As estimativas pelo Caulim apresentam menor erro aleatório (82,5 %)
1267 comparado ao TiO_2 . (98,9 %), com maior possibilidade de correções aditivas e
1268 multiplicativas do modelo, respectivamente, possibilitando alcançar resultados de

1269 consumo de suplemento mais consistentes a partir das estimativas realizadas pelo
1270 marcador. Concluiu-se que os marcadores externos caulim e TiO_2 , foram capazes de
1271 estimarem a excreção fecal e os consumos de matéria seca de bovinos de corte a pasto.
1272

1273 **Palavras-chave:** Dióxido de titânio, Excreção fecal, Ingestão diária

1274

1275 **Introdução**

1276 Animais em regime de pastejo podem ter avaliações nutricionais estimadas
1277 separadamente mediante a técnica de associação de marcadores de consumo
1278 (Titgemeyer et al., 1997; Cochran et al., 1986). Essa técnica é realizada por meio do
1279 fornecimento de três marcadores diferentes ao animal, ou seja, a administração de um
1280 marcador externo via oral afim de estimar a excreção fecal, um segundo marcador
1281 externo via suplemento para a estimativa do consumo de suplemento, e por fim, um
1282 marcador interno para estimar diretamente o consumo de forragem.

1283 Por outro lado, como todos os marcadores em estudos ainda apresentam limitações
1284 (Wang et al., 2017; Saliba et al., 2015; Rodrigues et al., 2010), a busca por novas
1285 substâncias que apresentem propriedades favoráveis se justifica. Como alternativa
1286 destaca-se o caulim, possível marcador externo para estimar o consumo, pois trata-se
1287 de um elemento cujas características evidenciam possibilidade de uso, sendo um mineral
1288 inerte, de ampla faixa de pH (3 a 9), fácil dispersão, baixa condutividade térmica e
1289 elétrica, pouca abrasividade, baixo custo (Trkova et al., 2009; Luz et al. 2008).

1290 Outras características favoráveis ao uso dessa substância, se dá pelo fato de o
1291 Brasil deter aproximadamente 28% das reservas mundiais de caulim, demonstra a
1292 facilidade de obtenção o que o torna candidato para servir de marcador coletivo de

consumo, ou seja, apresenta baixo custo e, por ser utilizado como composto inerte por algumas empresas para “preencher” formulações de dietas para animais, requer assim, manejo de administração menos rigoroso. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de caulim e dióxido de titânio para estimativa de excreção fecal e consumo de matéria seca de suplemento de garrotes Nelore em pastejo.

Material e métodos

Todos as análises químicas de laboratórios foram diligentemente realizadas conforme as normas de segurança do Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte. Manejo e cuidado dos animais para os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais Agrícolas em Pesquisa e Ensino (FASS, 2010). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS, Brasil, No. 15/2017.

Animais, dieta e manejo

Realizou-se dois experimentos simultâneos afim de avaliar o uso do Caulim (*Exp. 1*) e dióxido de titânio (*Exp. 2*) como substitutos ao LIPE® para estimativa de excreção fecal e ao óxido crômico para estimativa do consumo de matéria seca (MS) do suplemento, na estimação da excreção fecal e do consumo de matéria seca total de garrotes Nelore em pastejo.

Para isso foram utilizados doze garrotes Nelore (4 garrotes/tratamento; 360 dias de idade; $233 \pm 6,2$ kg e $277 \pm 6,8$ kg de PC inicial e final, respectivamente), sendo distribuídos em um delineamento de quatro quadrados latinos (3x3) simultâneos.

1316 No tratamento 1, os animais receberam 500 mg/dia de LIPE® via oral, como
1317 marcador de excreção fecal e, mais 2,0 kg de suplemento concentrado (1,0 kg na parte
1318 da manhã e 1,0 kg na parte da tarde) contendo Caulim e dióxido de titânio, nas
1319 proporções de 4 e 1% respectivamente, como marcadores de consumo de matéria seca
1320 de suplemento. No tratamento 2, os animais receberam 500 mg/animal de LIPE®
1321 fornecida via oral, como marcador de excreção fecal e, mais 2,0 kg de suplemento
1322 concentrado (1,0 kg na parte da manhã e 1,0 kg na parte da tarde) contendo 1% de óxido
1323 crômico, como marcador de consumo de matéria seca de suplemento. Por fim, no
1324 tratamento 3, os animais receberam 80 g de Caulim e 20 g de dióxido de titânio via oral,
1325 como marcadores de excreção fecal e, mais 2,0 kg de suplemento concentrado (1,0 kg
1326 na parte da manhã e 1,0 kg na parte da tarde) contendo 1% de óxido crômico, como
1327 marcador de consumo de matéria seca de suplemento.

1328 Foram avaliados três períodos experimentais, com duração de dezesseis dias de
1329 coleta de dados, cada. Nos três primeiros dias de cada ensaio ofereceu-se aos animais
1330 o pasto e o suplemento sem os marcadores, a fim de se conhecer a concentração de Al
1331 derivada da dieta (Al basal). O fornecimento dos marcados testados via sonda esofágica
1332 e/ou suplemento começou a partir do 4º dia e, para se alcançar o equilíbrio da excreção
1333 fecal, esperou-se até o 10º dia antes de iniciar-se as coletas. As coletas de fezes foram
1334 feitas entre o 11º e 16º dia.

1335

1336 *Alojamento e Dieta*

1337 Durante os períodos, os animais ficaram alocados em uma área de 25 hectares
1338 com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com 2.542,5 kg MS/ha de massa forrageira (8,4

1339 % proteína bruta; 56,5 % nutrientes digestíveis totais; 65,3 % fibra em detergente neutro;
1340 35,5 % fibra em detergente ácido; 89,6 % matéria orgânica; 0,08% de Al; com base na
1341 MS), sendo manejados pelo método de pastejo contínuo. O suplemento mineral proteico-
1342 energético[®] que era fornecido aos animais, incluiu 20 % de proteína bruta e 79 % de
1343 nutrientes digestíveis totais. Contendo em sua composição milho, farelo de soja,
1344 carbonato de cálcio, sal, fosfato bicálcio micro, melaço pó, ureia, enxofre pó, óxido de
1345 magnésio, óxido de zinco, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de cobalto,
1346 iodato de cálcio e selenito de sódio.

1347

1348 *Manejo*

1349 Ao início de cada período, procedeu-se a pesagem com jejum de sólidos dos
1350 animais. Os animais eram levados ao curral duas vezes ao dia, às 08h00min e às
1351 16h00min, para serem feitas as coletas retais de fezes e o fornecimento dos marcadores
1352 por via oral e/ou via suplemento aos animais.

1353 A cada período foi feita uma avaliação quantitativa e qualitativa do pasto. Foi
1354 realizada uma avaliação da disponibilidade da forragem pelo o método do “rendimento
1355 comparativo” descrito por Haydock & Shaw (1975). A fim de se estimar o valor nutricional
1356 da pastagem consumida pelos animais, realizou-se a amostragem do pasto pelo método
1357 do pastejo simulado (Euclides et al., 1992).

1358

1359 *Análises laboratoriais*

1360 O Caulim[®] (Silicate e Indústria e Comércio Ltda; Nova Campina, SP, Brasil), foi
1361 oriundo de extração e processamento de rocha do grupo sedimentar metamórfica, sendo

o silicato de alumínio como principal ingrediente com 8,67 % de Al. O produto apresenta densidade de 0,8 g/cm³, pH de 6,5 com granulometria de 99,9 ≤ 0,3mm < 0,1% e 82% ≤ 0,075mm < 18%. Por ser um produto comercial e sua composição variar de acordo com a região, se faz necessário todas as avaliações físicas e químicas específicas de cada composto por estudo.

Amostras de fezes, pasto e suplemento, depois de pré-secas em estufa de ventilação forçada (55 °C/72 h) foram trituradas em moinho inox com peneira de 1 mm. A concentração da LIPE® nas fezes foi realizada por Espectrofotômetro Infravermelho FTIV pelo Laboratório de Nutrição Animal de Minas Gerais, de acordo com Saliba et al., (2015). A dosagem de cromo nas fezes foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, conforme método descrito por Silva & Queiroz (2002), e, o teor de titânio nas fezes foi mensurado por espectrofotometria colorimétrica conforme metodologia descrita por Myers et al., (2004).

O teor do caulim foi quantificado indiretamente por meio da determinação do Al proveniente da substância, corrigindo os resultados finais extraindo-se o Al da concentração das fezes puras (Al original da dieta). A determinação do alumínio foi realizada por meio do procedimento analítico proposto no artigo anterior (**Artigo 2**). Podendo ser calculado pela seguinte Equação [1].

$$\text{Al.caulim, mg/kg} = \text{Al.total} - \text{Al.basal} \quad \text{Eq. [1]}$$

Onde, Al.caulim é a concentração de Al proveniente do caulim, mg/kg; Al.total é a concentração de Al proveniente do caulim + Al presente nas fezes puras, mg/kg; Al.basal é a concentração de Al presente nas fezes puras, mg/kg.

1384 Quanto a determinação do marcador interno FDNi, as amostras de suplemento,
 1385 forragem e fezes foram quantificadas segundo o método descrito por Van Soest et al.,
 1386 (1991). Porém, adotou-se incubação ruminal *in situ* por 240 horas, como sugerido por
 1387 Orskov et al., (1980).

1388 Por fim, a estimativa da excreção fecal (EF) foi obtida conforme descrito por Smith
 1389 & Reid (1955), de acordo com Equação [2].

$$1390 \text{ EF (kg/d)} = \{[ME_{\text{oferta}} * (ME_{\text{conc}}/1000)] / ME_{\text{fezes}}\} \quad \text{Eq. [2]}$$

1391 Onde, ME_{oferta} é a quantidade diária de marcador externo oferecido ao animal (g/d),
 1392 ME_{conc} é a concentração do marcador externo oferecido (g/kg) e ME_{fezes} é a concentração
 1393 do marcador externo nas fezes (g/kg).

1394

1395 O consumo de matéria seca de suplemento (CSUP) foi estimado segundo a
 1396 Equação [3].

$$1397 \text{ CSUP (kg/d)} = [(EF * ME_{\text{fezes}}) / ME_{\text{supl}}] \quad \text{Eq. [3]}$$

1398 Onde, EF é a excreção fecal (kg/d), ME_{fezes} é a concentração do marcador externo
 1399 nas fezes (kg/d) e ME_{supl} é a concentração do marcador externo no suplemento (kg/kg).

1400

1401 As estimativas do consumo de matéria seca total (CMS) e de forragem (CFO) foram
 1402 obtidas de acordo com as Equações [4] e [5].

$$1403 \text{ CMS (kg/d)} = \{[(EF * MI_{\text{fezes}}) - (CSUP * MI_{\text{supl}})] / MI_{\text{forr}}\} + CSUP \quad \text{Eq. [4]}$$

$$1404 \text{ CFO (kg/d)} = [(CMS) - (CSUP)] \quad \text{Eq. [5]}$$

1405 Onde, EF é a excreção fecal (kg/d), MI_{fezes} é a concentração do marcador interno
 1406 nas fezes (kg/kg), CSUP é o consumo de matéria seca de suplemento (kg/d), MI_{supl} é a

1407 concentração do marcador interno no suplemento (kg/kg), MI_{forr} é a concentração do
1408 marcador interno na forragem (kg/kg).

1409

1410 *Análises estatísticas*

1411 No modelo, considerou-se o efeito fixo de tratamento, e os efeitos aleatórios de
1412 animal (dentro de cada QL), período e de quadrado latino. Quando verificado efeito de
1413 tratamento de marcadores, os tratamentos foram comparados pelo teste de Dunnett.
1414 Utilizou-se o SAS University (SAS Institute Inc., Cary, CA, EUA) em todas as análises
1415 estatísticas.

1416 A avaliação da adequação dos resultados de predição foi realizada como sugerido
1417 por Tedeschi (2006). Foi estimada a regressão linear dos dados observados (Dioxido de
1418 Titânio ou Caulim) pelos dados preditos (Oxido Cromico ou LiPE) por cada tratamento e
1419 avaliados o coeficiente de determinação (R^2) e o teste F simultâneo para identidade dos
1420 parâmetros ($\beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$). Outros critérios utilizados foram o coeficiente de correlação
1421 e concordância (CCC), a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (RQMEP)
1422 e a partição do quadrado médio do erro de predição em vício médio, vício sistemático e
1423 erro aleatório. Todos os cálculos das estatísticas de avaliação foram realizados
1424 utilizando-se o MES – Model Evaluation System
1425 (<http://nutritionmodels.tamu.edu/mes.htm>, College Station, TX, USA; Tedeschi, 2006).

1426 Adotou-se um nível de significância de 5% em todas as análises estatísticas.

1427

1428 **Resultados**

Os resultados comprovam disponibilidade média de massa forrageira oferecida aos animais do presente estudo (2454,0 kg MS/ha), suficiente para se manter um ótimo desempenho para bovinos de corte, não interferindo nos resultados obtidos das avaliações nutricionais dos animais (Tabela 1).

Observou-se valores médios semelhantes de excreção fecal ($P = 0,8992$), e consumos de MS quando comparadas as médias das estimativas pelo uso do LIPE® e do Caulim fornecidos via oral (Tabela 2).

Não houve também diferenças ($P \geq 0,05$) na estimativa do consumo de MS de suplemento, forragem e total quando o Caulim substituiu o Cr_2O_3 como marcador de consumo de suplemento.

Semelhantemente, o marcador externo dióxido de titânio não apresentou diferença significativa ($P = 0,9016$) na estimativa de excreção fecal, quando comparadas as médias com os valores observados pela LIPE®, sendo que a média foi de 4,02 kg de fezes diariamente (Tabela 3).

Não foi observado diferença ($P \geq 0,05$) no consumo de matéria seca total, suplemento e forragem entre os marcadores (TiO_2 vs. Cr_2O_3) (Tabela 3). Sendo o consumo médio de MS total representando cerca de 2,94 % do peso corporal médio dos animais sob suplementação durante o ensaio de avaliação nutricional.

A partir dos resultados de consumo de matéria seca de suplemento obtidos nos dois estudos (Caulim vs. Cr_2O_3 e TiO_2 vs. Cr_2O_3 , respectivamente), não foi observado diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). No entanto, observou-se que as estimativas por meio do TiO_2 apresentaram dados menos dispersos e maior CCC, indicando maior acurácia e precisão quando comparado ao Caulim.

1452 O maior valor do quadrado médio do erro de predição observado na estimativa pelo
1453 caulim (RQMEP = 40,5) quando comparado ao TiO_2 (RQMEP = 30,4), indica baixa
1454 precisão nos resultados (Tabela 4). Ao avaliar o erro de predição desses estudos,
1455 utilizando RQMEP dividido pelo consumo de suplemento médio observado dos
1456 respectivos estudos, verifica-se que o menor erro de predição (43,2 %) ocorreu com o
1457 uso do TiO_2 .

1458 A decomposição do RQMEP em vício médio, sistemático e erro aleatório permitem
1459 constatar que as estimativas pelo TiO_2 e Caulim apresentaram um somatório de 1,04 %
1460 e 17,5 %, respectivamente (Tabela 4). Por outro lado, as estimativas pelo Caulim
1461 apresentam menor erro aleatório comparado ao TiO_2 com maior possibilidade de
1462 correções aditivas e multiplicativas do modelo, respectivamente, possibilitando alcançar
1463 resultados de consumo de suplemento mais consistentes a partir das estimativas
1464 realizadas pelo marcador.

1465

1466 **Discussão**

1467 A lignina isolada purificada e enriquecida (LIPE®) e óxido crômico (Cr_2O_3) são
1468 utilizados como substâncias referências para marcação de excreção fecal e de consumo
1469 de suplemento para animais em pastejo (Ribeiro et al., 2018; Saliba et al., 2015;
1470 Fernandes et al., 2012; Rodrigues et al., 2010; Ferreira et al., 2009).

1471 Com isso, como os resultados obtidos pelo caulim não diferiram dos observados,
1472 comprova-se ser um bom marcador de excreção fecal, com a vantagem de apresentar
1473 baixo custo, fácil administração, podendo ser fornecido individualmente e/ou adicionado

1474 à dieta, além de fácil análise, possibilitando repetição de dados quando necessário
1475 (Tabela 2).

1476 Outro ponto importante, segundo Trckova et al. (2009) se dá que o uso de caulim é
1477 considerado um medicamento para prevenir uma série de materiais tóxicos, não apenas
1478 no meio ambiente, mas também nos organismos vivos. Pois, quando adicionado às
1479 dietas de animais, reduz a reabsorção de toxinas nocivas presentes na alimentação
1480 através da mucosa intestinal para o organismo, porque as liga firmemente e
1481 seletivamente e, assim, elimina seus efeitos tóxicos.

1482 Os resultados de estimativa do consumo de suplemento obtidos com o uso do
1483 marcador Cr_2O_3 (Tabela 2) confirmam os verificados por Ribeiro et al. (2018), Ferreira et
1484 al. (2009), Titgemeyer et al. (1997) e Smith & Reid (1955) ao demonstraram que esse
1485 marcador, pode ser utilizado em estudos de consumo de bovinos, comprovando ser um
1486 bom marcador, com a vantagem de ser de baixo custo, fácil administração e de fácil
1487 análise. Além disso, sua utilização está relacionada a facilidade de incorporação à dieta,
1488 procedimentos analíticos simples, estimativas satisfatórias do consumo de matéria seca
1489 de bovinos a pasto, além de permitir a administração por meio da suplementação,
1490 facilitando o manejo e diminuindo o estresse causado nos animais (Rodrigues et al.,
1491 2010; Morenz et al., 2006; Willians et al., 1962).

1492 No entanto, mesmo sendo incerto que o Cr_2O_3 é considerado um composto
1493 cancerígeno, o fato é que esta substância necessita ser encaminhada a um laboratório
1494 e, para que seja quantificado é preciso um processo de digestão ácida das amostras.
1495 Com isso, o Cr_2O_3 é oxidado e transformado em Cr_2O_6 (Souza et al., 2012; Silva &
1496 Queiroz, 2002). Este composto formado após a digestão é considerado 100 vezes mais

1497 tóxico que o Cr (III), assim a exposição ocupacional a altas gerar diversos problemas
1498 respiratórios, tornando-se um grande risco para causar câncer de pulmão (Wang et al.,
1499 2017).

1500 Sobre o consumo médio de matéria seca estimado para os animais (Tabela 2 e 3),
1501 esses resultados podem estar associados à disponibilidade de forrageira com alto valor
1502 nutritivo encontrados na dieta oferecida aos animais. Segundo Horn et al. (1979) o
1503 consumo é influenciado positivamente, quando está associado com alta digestibilidade
1504 de forragem, baixo teor de lignina, alto teor de proteína bruta e médio de FDN, na dieta
1505 total oferecida aos animais. Outros fatores importantes são os fatos desses animais
1506 estarem recebendo um suplemento múltiplo e terem sido amansados e adaptados ao
1507 manuseio um mês antes do início dos experimentos, reduzindo o efeito do estresse de
1508 manejo sobre o comportamento ingestivo do animal.

1509 O uso de TiO_2 apresenta grandes vantagens sobre o Cr_2O_3 , pois além do fato de
1510 que ele é permitido legalmente ser adicionado ao alimento, é um pó com coloração
1511 branca sem odor ou sabor, não influenciando o consumo do mesmo quando fornecido
1512 aos animais por meio da suplementação (Myers et al. 2004). Portanto, os resultados de
1513 excreção fecal e os consumos de matéria seca deste estudo mostra que,
1514 independentemente do tipo de marcador, todas as substâncias avaliadas possuem a
1515 capacidade para estimarem o consumo individual de matéria seca de forragem e
1516 suplemento e que a escolha dependerá da disponibilidade do marcador, valor, condições
1517 do laboratório para as análises (Tabela 3).

1518 O marcador externo TiO_2 é insolúvel em água, de coloração branca, sem odor ou
1519 sabor (Cavalcanti et al., 2013). Este pode ser utilizado como substituto do óxido crômico,

1520 não é afetado pelas diferentes condições de alimentação e não apresenta limitação
1521 quanto a sua inclusão na dieta animal (Sampaio et al., 2011). Apresenta como vantagem
1522 a inexistência de propriedades carcinogênicas (Cavalcanti et al., 2013).

1523 Em estudos com novilhos, Titgemeyer et al. (2001) também indicaram a
1524 possibilidade de uso desta substância para bovinos. Uma das principais limitações
1525 encontra-se na escolha da técnica para determinação do marcador que deve apresentar
1526 resultados quantitativos precisos e não apenas qualitativos (Cavalcanti et al., 2013).

1527 Semelhantemente ao dióxido de titânio, o caulim apresenta características que o
1528 evidenciam como potencial marcador externo em estudos de consumo e digestibilidade,
1529 como ser inerte em ampla faixa de pH, fácil dispersão, baixa condutividade térmica e
1530 elétrica, pouca abrasividade, baixo custo e boa resistência ao ataque químico por ácidos
1531 ou álcalis. Para a mensuração da substância via fezes, é preciso determinar a
1532 concentração de algum de seus elementos, ou seja, pelo fato do Al de estar presente
1533 nas forrageiras em concentração muito pequena, e metodologia analítica mais prática,
1534 leva a acreditar que este elemento é a escolha mais coerente.

1535

1536 **Referências**

- 1537 Cochran RC, Adams DC, Wallace JD, Galyean ML 1986. Predicting digestibility of
1538 different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. Journal
1539 Animal Science. V. 63, pp. 1476-1483.
- 1540 Euclides VPB, Macedo MCM, Oliveira MP 1992. Avaliação de diferentes métodos de
1541 amostragem para se estimar o valor nutritivo de forragens sob pastejo. Revista
1542 Brasileira de Zootecnia. V.21, pp.691-702.
- 1543 FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research
1544 and Teaching. (ed.3 Federation of Animal Science Societies). Savoy, IL, EUA.

- 1545 Fernandes HJ, Paulino MF, Detmann E 2012. Avaliação nutricional, durante a
1546 amamentação de tourinhos em pastejo recebendo suplementação proteica da
1547 amamentação à terminação. Revista Brasileira de Zootecnia. V. 41, pp. 374-383.
- 1548 Ferreira MA, Inácio M, Marcondes MLP, Paulino MF, Valadares RFD 2009. Avaliação de
1549 marcadores em estudos com ruminantes: digestibilidade', Revista Brasileira de
1550 Zootecnia. V. 38, pp. 1568-1573.
- 1551 Glindemann T, Tas BM Wang, C Alvers S, Susenbeth A 2009. Evaluation of titanium
1552 dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. Anim. Feed
1553 Sci. Technol. V. 152, pp. 186–197.
- 1554 Haydock KP, Shaw NH 1975. The comparative yield method for estimating dry matter
1555 yield of pasture. Aust. J. Agri. Anim. Husb. V.15, pp.663- 6670.
- 1556 Horn FP, Telford JP, Mc Croskey JE 1979. Relationship of animal performance and dry
1557 matter intake, to chemical constituents of grazed forage. Journal Animal Science. V.
1558 49, pp. 1051-1058.
- 1559 Kozloski GV, Perez Neto D, Oliveira L, Maixner AR, Leite DT, Maccari M, Brondani IL,
1560 Asnchez LMB, Quadros FLF 2006. Uso do óxido de cromo como marcador da
1561 excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário
1562 de amostragem. Ciência Rural. V. 36, pp. 599-603.
- 1563 Luz AB, Campos AR, Carvalho EA, Bertolino LC, Scorzelli RB 2008. Argila – caulim. In
1564 Rochas e Minerais Industriais no Brasil: usos e especificações. 2ª ed. CETEM/MCTI,
1565 Rio de Janeiro, BRA., pp. 2559-294.
- 1566 Marcondes MI, Valadares Filho SC, Paulino PVR, Detmann E, Paulino MF, Diniz LL,
1567 Santos TR 2008. Consumo e desempenho de animais alimentados individualmente
1568 ou em grupo e características de carcaça de animais Nelore de três classes
1569 sexuais. Revista Brasileira de Zootecnia. V.37, pp. 2243-2250.
- 1570 Morenz MJF, Silva JFC, Aroeira LJM, Deresz F, Vásquez HM, Paciullo SC, Lopes FCF,
1571 Elyas CW, Detmann E 2006. Óxido de cromo e alcanos na estimativa do consumo de
1572 forragem de vacas em lactação em condições de pastejo. Revista Brasileira de
1573 Zootecnia. V. 35, pp. 1535-1542.

- 1574 Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu, V, Hess BW 2004. Technical Note: A procedure for
1575 the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of*
1576 *Animal Science*. V. 82, pp. 179-183.
- 1577 Orskov ER, Deb Hovell FD, Mould F 1980. The use of the nylon bag technique for the
1578 evaluation of feedstuffs. *Trop Anim Prod*. V.5, pp.195-213.
- 1579 Ribeiro CB, Oliveira LOF, Graça Morais M, Fernandes HJ, Carneiro MMY, Rocha RFAT,
1580 Rocha DT 2018. Kaolin and chromic oxide under different forms of administration in a
1581 study of consumption and digestibility. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 39, pp. 2607-
1582 2620.
- 1583 Rodrigues PHM, Gomes RDC, Siqueira RFD, Meyer PM, Rodrigues RR 2010. Acurácia,
1584 precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca
1585 determinada com o uso de marcadores em ovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*.
1586 V. 39, pp. 1118-1126.
- 1587 Saliba EDOS, Faria EP, Rodriguez NM, Moreira GR, Sampaio IBM, Saliba JS, Borges
1588 ALCC 2015. Use of infrared spectroscopy to estimate fecal output with marker
1589 Lipe. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. V. 4, pp. 1-10.
- 1590 Silva, Queiroz 2002. *Livro Métodos para Análises de Alimento*. Univers, cidade, estado,
1591 Brasil.
- 1592 Smith AM, Reid JT 1955. Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the
1593 purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. *Journal of*
1594 *Dairy Science*. V. 38, pp. 515-524.
- 1595 Souza NKP, Pina DS, Detmann E 2012. Avaliação de Cr em amostras fecais. In: *Métodos*
1596 *para análise de alimentos*. (Detmann E, Souza MD, Valadares Filho, Queiroz AD,
1597 Berchielli TT, Saliba EO, Azevedo JAG). Visconde do Rio Branco: Suprema, 214p.
- 1598 Titgemeyer EC, Armendariz CK, Bindel DJ 2001. Evaluation of titanium dioxide as a
1599 digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*. V. 79, pp. 1059-1063.
- 1600 Titgemeyer EC 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of*
1601 *Animal Science*. V. 75, pp. 2235-2247.
- 1602 Trckova M, Vondruskova H, Zraly Z, Alexa P, Hamrik J, Kummer V, Maskova J, Mrlik V,
1603 Krizova K, Slana I, Leva L, Pavlik I 2009. The effect of kaolin feeding on efficiency,

- 1604 health status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic
1605 *Escherichia coli* strains in weaned piglets. *Veterinarni Medicina*. V. 54, pp. 47-63.
- 1606 Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent
1607 fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy*
1608 *Science*. V. 74, pp. 3583-3597.
- 1609 Wang Y, Su H, Gu Y, Song X, Zhao J 2017. Carcinogenicity of chromium and
1610 chemoprevention: a brief update. *OncoTargets and therapy*. V. 10, pp. 4065.

1611

Tabelas

1612 Tabela 1. Composição química e disponibilidade da pastagem *Brachiaria brizantha* cv.
 1613 Marandu nos meses do experimento e do suplemento proteico-energético fornecido aos
 1614 animais

Item	Pastagem				Suplemento
	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	
Matéria seca, g/kg MS	411,9	304,2	290,5	243,2	941,0
Proteína bruta, g/kg MS	74,7	80,5	88,1	91,3	200,4
Extrato etéreo, g/kg MS	16,8	20,1	23,8	22,2	45,5
Matéria orgânica, g/kg MS	879,8	890,4	902,1	913,6	814,0
FDN, g/kg MS	687,9	670,3	656,2	597,1	197,0
CIDN, g/kg MS	67,2	50,9	77,9	42,2	52,0
PIDN, g/kg MS	9,22	11,78	9,64	18,41	15,33
FDA, g/kg MS	406,5	359,7	337,3	318,0	51,3
CIDA, g/kg MS	43,1	36,5	38,3	29,8	0,1
PIDA, g/kg MS	6,85	5,78	9,17	12,5	8,20
NDT ¹ , g/kg MS	550,9	558,3	564,1	588,8	797,6
Massa de forragem, kg/ha	2052,6	2161,8	2225,0	3730,2	-

1615 FDN: Fibra em detergente neutro; CIDN: Cinza insolúvel em detergente neutro; PIDN:
 1616 Proteína insolúvel em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; CIDA: Cinza
 1617 insolúvel em detergente ácido; PIDA: Proteína insolúvel em detergente ácido; NDT:
 1618 Nutrientes digestíveis totais.

1619 ¹Dados estimados de acordo com Capelle et al. (2001) a partir da equação: NDT
 1620 (forragem) = (83,79 – 0,4171 * FDN) e NDT (suplemento) = (91,0246 – 0,571588*FDN).

1621 Tabela 2. Utilização do caulim como substituto ao LIPE® para estimativa de excreção
 1622 fecal e ao óxido crômico para estimar o consumo de suplemento, na estimação da
 1623 excreção fecal e do consumo de matéria seca de garrotes nelore em pastejo

Item	LIPE® Cr ₂ O ₃	Tratamento		EP*	Valor - p
		LIPE® substituindo	Caulim substituindo		
Excreção fecal, kg/d	4,044	4,103	3,995	0,210	0,8982
CSUP, kg/d	0,704	0,674	0,694	0,098	0,9547
CFO, kg/d	6,774	6,877	6,579	0,315	0,7052
CMS, kg/d	7,477	7,552	7,273	0,321	0,7851

1624 *EPM: Erro padrão médio;

1625 CSUP: Consumo de matéria seca de suplemento;

1626 CFO: Consumo de forragem, utilizando FDNi como indicador interno;

1627 CMS: Consumo de matéria seca total, utilizando FDNi como indicador interno.

1628 Tabela 3. Utilização do dióxido de titânio como substituto ao LIPE[®] para estimativa de
 1629 excreção fecal e ao óxido crômico para estimar o consumo de suplemento, na
 1630 estimação da excreção fecal e do consumo de matéria seca de garrotes nelore em
 1631 pastejo

Item	LIPE® e Cr ₂ O ₃	Tratamento		EP*	Valor – <i>p</i>
		TiO ₂	TiO ₂		
		substituindo LIPE®	substituindo Cr ₂ O ₃		
Excreção fecal, kg/d	4,044	4,018	3,995	0,1071	0,9016
CSUP, kg/d	0,704	0,670	0,691	0,104	0,8650
CFO, kg/d	6,774	6,680	6,580	0,159	0,6931
CMS, kg/d	7,477	7,349	7,270	0,167	0,6414

1632 *EPM: Erro padrão médio;

1633 CSUP: Consumo de matéria seca de suplemento;

1634 CFO: Consumo de forragem, utilizando FDNi como indicador interno;

1635 CMS: Consumo de matéria seca total, utilizando FDNi como indicador interno.

1636 Tabela 4. Avaliação dos modelos de predição da excreção fecal e consumo de
 1637 suplemento por diferentes marcadores externos

	Estatística de adequação ²						
	R ²	Teste F	CCC	RQMEP	Vício médio	Vício Sistemático	Erro aleatório
Cr ₂ O ₃ vs. Caulim	0,32	0,883	0,62	40,5	0,113	17,37	82,5
Cr ₂ O ₃ vs. TiO ₂	0,54	0,949	0,74	30,4	0,365	0,673	98,9

1638 ²RQMEP é o quadrado médio do erro da predição, %; R² é o coeficiente de
 1639 determinação da regressão linear dos dados observados pelos dados preditos; Teste
 1640 F é o valor *P* para o teste simultâneo para identidade dos parâmetros ($\beta_0 = 0$ e $\beta_1 =$
 1641 1) da regressão linear dos dados observados pelos dados preditos; CCC é o
 1642 coeficiente de correlação e concordância.