



BRUNA HIGINO DE SOUZA SILVA

**UTILIZAÇÃO DE GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE
CABRAS EM LACTAÇÃO: CONCENTRAÇÃO DE METAIS
ESSENCIAIS E TÓXICOS EM SORO SANGUÍNEO, URINA, LEITE
E QUEIJO TIPO COALHO**

RECIFE – PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

BRUNA HIGINO DE SOUZA SILVA

**UTILIZAÇÃO DE GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE
CABRAS EM LACTAÇÃO: CONCENTRAÇÃO DE METAIS
ESSENCIAIS E TÓXICOS EM SORO SANGUÍNEO, URINA, LEITE
E QUEIJO TIPO COALHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Castro Soares

Co-Orientação: Prof. Dr. Francisco Fernando Ramos de Carvalho

RECIFE – PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586u

Silva, Bruna Higino de Souza

UTILIZAÇÃO DE GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE CABRAS EM LACTAÇÃO: CONCENTRAÇÃO DE METAIS ESSENCIAIS E TÓXICOS EM SORO SANGUÍNEO, URINA, LEITE E QUEIJO TIPO COALHO / Bruna Higino de Souza Silva. - 2020.

82 f. : il.

Orientador: Prof Dr Pierre Castro Soares.

Coorientador: Prof Dr Francisco Fernando Ramos de .

Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2020.

1. biodiesel. 2. minerais. 3. metais pesados. 4. ICP-OES. 5. queijo. I. Soares, Prof Dr Pierre Castro, orient. II. , Prof Dr Francisco Fernando Ramos de, coorient. III. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DE GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE
CABRAS EM LACTAÇÃO: CONCENTRAÇÃO DE METAIS
ESSENCIAIS E TÓXICOS EM SORO SANGUÍNEO, URINA, LEITE
E QUEIJO TIPO COALHO**

Dissertação de Mestrado elaborada por:

BRUNA HIGINO DE SOUZA SILVA

Aprovada em: 27/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Castro Soares

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dra. Carolina Akiko Sato Cabrial de Araújo
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Alexandre Tadeu Mota Macedo
Colegiado de Medicina Veterinária da UNIVASF

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai, Bueno Higino da Silva (*in memoriam*), por ter me ensinado a emitir energia boa pelo mundo. Com todo meu amor, saudade e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade a mim dada, por todos os obstáculos que me fizeram uma mulher mais forte, pela perseverança e pelo auxílio enviado de diversas maneiras.

A minha mãe Norma Suelly Florentino de Souza, e meu pai Bueno Higino da Silva (*in memorian*) por não medirem esforços relacionados a minha educação e me apoiarem em qualquer decisão, obrigada! A toda minha família.

Ao meu sobrinho Bueno Higino da Silva Neto e minha cunhada Stefany Higino, que me trouxeram entendimento, suavidade e bondade em muitos momentos. Aos meus amigos pelos pensamentos positivos transmitidos mesmo diante da minha ausência.

Ao meu companheiro Diogo Brêda por não ter desistido de mim ao longo desses longos anos, por ter reaparecido repentinamente para me fazer apenas bem!

Ao meu orientador Prof. Dr. Pierre Castro Soares pela confiança, chance, por esse trabalho realizado, orientações e ensinamentos tanto de âmbito profissional quanto pessoal. Pela paciência e grande sabedoria. Ao Prof. Dr. Francisco Fernando Ramos de Carvalho pelo apoio, consentimento e elaboração desse estudo.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por me mostrar um ensino de qualidade e com oportunidades reais para qualquer pessoa! Ao Restaurante Universitário, que através de pouco investimento meu me trouxe uma comida maravilhosa ao longo desses dois anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado, o que me permitiu a possibilidade de chegar ao fim dessa missão. A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

A equipe do Laboratório de Doenças Metabólicas e Nutricionais do Centro de Estudos Avançados em Caprinos e Ovinos do Departamento de Medicina Veterinária e agregados, Cristina Fonseca, Rebeqa Menezes, Ayna Arramis, Felipe Rosendo, Esdras Lima, Bruna Menezes, Daniel Praia, Midiã, Rodolpho Rebouças e Alexandre Mota, pelas risadas garantidas, pelo acolhimento e ajuda na realização desse trabalho.

Ao químico Iago Silva pelo auxílio e disponibilidade, por ser um braço direito! Ao Júlio e toda a equipe do Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ), por toda a facilitação e ajuda.

Em nome dos funcionários Maria Joaquina e Severino Marinho agradecer a todos os funcionários por cuidarem da universidade e fazer dela nosso lar.

Agradecer ao amigo Rodrigo Andrade pela dedicação e luta no cuidado dos nossos animais, por fazer esse projeto acontecer e como bonificação ser uma ótima pessoa pronta a ajudar!

Em nome do incrível Seu Pedro nosso não somente ordenhador, agradecer a todos os alunos de graduação, pós-graduação e funcionários do Departamento de Zootecnia (DZ), que são uma verdadeira família!

A minha cachorrinha/filha/irmã Fumaça, que me trouxe companhia e parceria em absolutamente toda a hora. Pelo amor a mim transmitido!

A todos muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Utilização de glicerina bruta na alimentação de cabras em lactação: concentração de metais essenciais e tóxicos em soro sanguíneo, urina, leite e queijo tipo coalho

Concentrada em regiões semiáridas e tropicais no Brasil a caprinocultura ganha destaque. Em 2006 a 2017 o efetivo de caprinos comercializados no país atingiu um aumento de 65,7%. Os produtos lácteos desses animais possuem uma maior digestibilidade, grande teor de vitamina A e B, hipoalergenicidade e menor quantidade de lactose se comparado ao de vaca, além do maior valor de venda. Uma vez que o farelo de milho e soja geram um gasto ao manejo alimentar, estuda-se a glicerina bruta, originada da fabricação do biodiesel, como substituto energético, porém contém metais pesados, o que pode retratar riscos à saúde animal e humana. São escassos dados referentes aos oligoelementos em amostras biológicas e produtos derivados do leite em cabras com introdução alimentar de glicerina na dieta. Objetivou-se quantificar metais no soro sanguíneo, urina, leite e queijo tipo coalho em cabras leiteiras alimentadas com variados níveis de glicerina bruta no manejo alimentar. Foram selecionados 16 caprinos da raça Saanen, fêmeas em lactação que foram distribuídos em quatro quadrados latinos e aleatoriamente nos tratamentos com diferentes níveis de glicerina bruta 0, 5, 10 e 15%. Após a finalização de cada ciclo do experimento, nos quatro momentos foram colhidas amostras de sangue, urina, leite e queijo de coalho. As amostras foram submetidas à digestão por radiação micro-ondas. A análise multielementar realizou-se por intermédio da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Não houve influência dos níveis de glicerina bruta, em substituição ao milho no soro, leite, urina e queijo tipo coalho. A concentração sérica dos metais Cu, Fe, Zn e Mn; urinária de Cu, Zn, Mn, Mo e Cr; láctea e do queijo coalho referente a Cu, Zn e Mn, mantiveram-se dentro dos padrões encontrados na literatura. A inclusão de 5 até 15% de glicerina bruta, derivada do óleo de algodão nas dietas de cabras leiteiras em substituição parcial ao milho, não altera a concentração de metais essenciais e tóxicos em soro sanguíneo, urina, leite e queijo tipo coalho, não estabelecendo, portanto, fator de risco para quadros de intoxicação.

Palavras-chave: biodiesel, minerais, metais pesados, ICP-OES, queijo.

ABSTRACT

Use of crude glycerin in the feeding of lactation goats: concentration of essential and toxic metals in blood serum, urine, milk and cured cheese

Goat farming is concentrated in semi-arid and tropical regions in Brazil. In 2006 to 2017 the number of goats sold in the country increased by 65.7%. The dairy products of these animals have a higher digestibility, high content of vitamin A and B, hypoallergenicity and less lactose compared to cow, in addition to the higher sales value. Since corn and soy meal generate an expense for food handling, crude glycerin, which originates from the manufacture of biodiesel, is studied as an energy substitute, but contains heavy metals, which can portray risks to animal and human health. There are few data regarding trace elements in biological samples and products derived from milk in goats with a dietary introduction of glycerin. The objective was to quantify metals in blood serum, urine, milk and rennet cheese in dairy goats fed with varying levels of crude glycerin in food handling. 16 Saanen goats were selected, lactating females that were distributed in four Latin squares and randomly treated with different levels of crude glycerin 0, 5, 10 and 15%. After the completion of each cycle of the experiment, blood, urine, milk and rennet cheese samples were collected at the four moments. The samples were submitted to digestion by microwave radiation. The multielemental analysis was carried out by means of optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). There was no influence of the levels of crude glycerin, replacing corn in whey, milk, urine and rennet cheese. The serum concentration of the metals Cu, Fe, Zn and Mn; Cu, Zn, Mn, Mo and Cr urine; milk and rennet cheese referring to Cu, Zn and Mn, remained within the standards found in the literature. The inclusion of 5 to 15% of crude glycerin, derived from cotton oil in the diets of dairy goats in partial replacement to corn, does not alter the concentration of essential and toxic metals in blood serum, urine, milk and rennet cheese, not establishing therefore, a risk factor for intoxication.

Keywords: biodiesel, minerals, heavy metals, ICP-OES, cheese.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de biodiesel derivado do óleo de soja	31
Tabela 2. Concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de glicerina derivada do óleo de soja	32
Tabela 3. Concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de glicerina derivada de óleos vegetais de mamona, soja, algodão e girassol	32
Tabela 4. Valores médios das concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de glicerina derivada do óleo de soja	33
Tabela 5. Proporção dos ingredientes e composição químico-bromatológica estimada das dietas experimentais, com base em dados tabelados	38
Tabela 6. Concentrações e limites de detecção dos metais essenciais e tóxicos da glicerina bruta, derivada do óleo de algodão, obtida e utilizada nas dietas dos animais	46
Tabela 7. Parâmetros utilizados na análise ICP-OES	47
Tabela 8. Valores médios das concentrações de metais essenciais e tóxicos no soro sanguíneo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta	49
Tabela 9. Valores médios das concentrações de metais essenciais e tóxicos na urina de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta	50
Tabela 10. Valores médios das concentrações de metais essenciais e tóxicos no leite de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta	51
Tabela 11. Valores médios das concentrações de metais essenciais e tóxicos em queijo tipo coalho de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das fases de produção do biodiesel	24
Figura 2. Panorama produtivo brasileiro de biodiesel relativo ao ano de 2009 a 2018	54
Figura 3. Metabolismo do glicerol no organismo animal	29
Figura 4. Baias individuais suspensas identificadas no Departamento de Zootecnia – UFRPE	37
Figura 5. Momentos das coletas de sangue, urina, leite e queijo de coalho	41
Figura 6.A. Micro-ondas Multiwave 3000 Anton Paar®. B. Micro-ondas Provecto Analítica DGT 100 Plus®. C. Espectrômetro ICP-OES Agilent 5100® ...	42
Figura 7. Acondicionamento da glicerina bruta nos recipientes plásticos prontos para consumo animal	45
Figura 8. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações séricas de Cu com Cu urinário e Cr lácteo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson ® e nível de significância	53
Figura 9. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações séricas de Zn com Zn urinário e Zn lácteo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson ® e nível de significância	53
Figura 10. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações séricas de Mn com Mn urinário e Mn lácteo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson ® e nível de significância	54
Figura 11. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações de Cu com Zn em queijo tipo coalho das cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson ® e nível de significância	54
Figura 12. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações de Cu com Mn em queijo tipo coalho das cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson ® e nível de significância	55

Figura 13. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações de Mn com Zn em queijo tipo coalho das cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson r e nível de significância **55**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGV – Ácidos graxos voláteis
Al – Alumínio
ADP – Adenosina difosfato
Ar – Argônio
As – Arsênico
ATP – Adenosina trifosfato
B – Boro
BEN – Balanço Energético Negativo
Ca – Cálcio
Cd – Cádmiio
CF – Carboidratos Fibrosos
CHO – Carboidratos totais
Cl – Cloro
CNF – Carboidratos Não-fibrosos
Co – Cobalto
Cr – Cromo
Cu – Cobre
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
EE – Extrato Etéreo
EEB – Encefalopatia espongiforme bovina
F – Flúor
Fe – Ferro
FDA – Fibra em Detergente Ácido
FDN – Fibra em Detergente Neutro
g – Grama
GLM – General Linear Models
HCL – Ácido clorídico
H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
Hg – Mercúrio
HNO₃ – Ácido Nítrico

I – Iodo
K – Potássio
K₂Cr₂O₇ – Dicromato de potássio
KOH – Hidróxido de potássio
LD – Limite de Detecção
Li – Lítio
LQ – Limite de quantificação
Mg – Magnésio
MJ – Megajoule
MM – Matéria Mineral
Mn – Manganês
Mo – Molibdênio
MS – Matéria Seca
N – Nitrogênio
Na – Sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
Ni – Níquel
nm – Nanômetro
NRC – National Research Council (USA)
O² – Oxigênio
P – Fósforo
Pb – Chumbo
PB – Proteína bruta
PFA – Perfluoroalcoxi
ppm – Partes por milhão
RCC – Residual Carbon Content
S – Enxofre
Se – Selênio
Si – Silício
Sn – Estanho
TFM – Politetrafluoretileno
UHT – Ultra High Temperature
V – Vanádio
Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. HIPÓTESES	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 Caprinocultura leiteira no Nordeste brasileiro	22
4.2. Biodiesel	23
4.3. Glicerina bruta	25
4.4. Glicerina na alimentação de ruminantes	26
4.5. Limitações do uso da glicerina	28
4.6. Metabolismo do glicerol	28
4.7. Minerais	30
4.7.1. Metais encontrados na glicerina bruta	31
4.8. Decomposição de amostras biológicas por intermédio de radiação micro-ondas	33
4.9. Determinação de metais por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1. Local do experimento, animais, tratamentos e delineamento experimental	36
5.2. Manejo	37
5.2.1. Manejo alimentar	37
5.2.2. Manejo de ordenha	39

5.3. Colheita de amostras	39
5.3.1. Coleta de sangue	39
5.3.2. Coleta de urina	40
5.3.3. Coleta de leite	40
5.3.4. Coleta de queijo tipo coalho	40
5.4. Eficiência da digestão	41
5.5. Digestão assistida por radiação micro-ondas	42
5.5.1. Amostras de soro sanguíneo	43
5.5.2. Amostras de urina e leite	43
5.5.3. Amostras de queijo tipo coalho	44
5.5.4. Amostra de glicerina bruta	45
5.6. Determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)	46
5.7. Determinação de metais	46
5.8. Análise estatística	48
6. RESULTADOS	49
7. DISCUSSÃO	56
7.1. Soro sanguíneo	56
7.2. Urina	57
7.3. Leite de cabra	59
7.4 Queijo de coalho	61
8. CONCLUSÃO	65
9. REFERÊNCIAS	66
10. ANEXOS	80
10.1. Licença do Comitê de Uso nos Animais – Universidade Federal Rural de Pernambuco.....	80

1. INTRODUÇÃO

Agrupada em regiões semiáridas e tropicais (BATISTA e SOUZA, 2015), no Brasil a caprinocultura ganha destaque. Do ano de 2006 a 2017, a quantidade de caprinos comercializados no Brasil teve um aumento de 65,7%, enquanto o número populacional cresceu o equivalente a 16,1%, sendo o Nordeste (NE) responsável por 92,8% do efetivo rebanho nacional, o que demonstra a elevada importância social e econômica para a região (IBGE, 2017; EMBRAPA, 2018).

Diversas são as finalidades dessa atividade as quais variam por localidade, porém o intuito de produção leiteira, adquire sucesso de equivalência comercial no seu desenvolvimento devido ao diferencial e qualidade nutritiva (LIMA et al., 2017). Nacionalmente, os agricultores familiares são responsáveis por 67% do leite de cabra e no NE essa proporção chega a 73% (VESCHI et al., 2016).

No geral, os produtos lácteos desses animais possuem uma maior digestibilidade, grande teor de vitamina A e B, hipoalergenicidade resultante dos reduzidos glóbulos de gordura e menor quantidade de lactose se comparado ao de vaca, além do maior valor de venda que sofreu variação positiva de 79,81% na região Nordeste entre os anos de 2006 e 2017 (CHYE et al., 2012; EMBRAPA, 2018). É recomendado para grupos de pessoas pertencentes a crianças, idosos e alérgicos, sua composição pode sofrer variação por condições genéticas, raciais, estágio de lactação, sistema de produção e manejo nutricional (PEIXOTO et al., 2016).

Os derivados do leite caprino possuem um nicho promissor industrial e agregam valor pelo particular aroma e propriedade gustativa, trazendo diversificação. Podem-se citar como exemplos o queijo tipo de coalho e ricota, leite em pó, iogurte, doce, picolé, sorvete, pão de leite, fazendo até parte da indústria de cosméticos (SAMPAIO et al., 2009; CATUNDA et al., 2016).

O âmbito agropecuário entra em conflito entre a alta demanda de matéria-prima alimentar e os impactos ambientais provocados por essa busca (TEIXEIRA et al., 2013). Os alimentos alternativos com a finalidade de reduzir esses danos ao meio ambiente ponderando uma oferta de alimentos equilibrada e de caráter eficientemente produtivo vêm sendo observado de forma notória na nutrição de ruminantes (RODRIGUES e RONDINA, 2013), principalmente no que se refere a melhoria econômica por aproveitamento de coprodutos industriais (SILVA et al., 2015).

O farelo de milho e soja são responsáveis por um alto gasto ao manejo nutritivo passando a ser os principais componentes sob o foco de remanejamento. A agroindústria estuda a proposta de atender a essa substituição com derivados do biodiesel (RODRIGUES e RONDINA, 2013; LAGE et al., 2014), ao qual define-se como combustível originado através de meios renováveis, podendo ser formado pela utilização de óleos de origem vegetal, microemulsões, craqueamento térmico ou transesterificação (FELICIANO FILHO e PEREIRA JÚNIOR, 2007; RODRIGUES e RONDINA, 2013).

O método de obtenção de biocombustível quando por meio de farelos e tortas de oleaginosas se torna também de uso praticável na alimentação (ABDALLA et al., 2008; LAGE et al., 2014). A glicerina é aceita facilmente pelos ruminantes devido a característica gustativa adocicada (CLASEN et al., 2014).

O glicerol, principal componente da glicerina bruta, possui grande quantidade de energia e vem a tornar um excelente adicional na alimentação de ruminantes (LAGE et al., 2010). Esse coproduto, para maior aplicabilidade na indústria, deve ser purificado, procedimento de difícil disponibilidade e que gera um alto custo, seu uso inteligente ainda na forma bruta na dieta de animais traz uma possibilidade de aproveitamento do que muitas vezes é descartado (MACH, 2009; RODRIGUES e RONDINA, 2013).

Essas alternativas aplicadas ao manejo nutricional auxiliam na sintetização de ácidos graxos de cadeia curta, os quais são absorvidos no rúmen para produzir energia (MACH et al., 2009), porém as impurezas encontradas no produto podem possuir metais pesados, metanol e grande quantidade de lipídeos (RODRIGUES e RONDINA, 2013).

Além dos elementos necessários para sobrevivência animal, denominados como metais essenciais; têm-se os que são tóxicos por suas consequências negativas e/ou efeito acumulativo, porém ambos podem ser nocivos aos ruminantes a depender da sua concentração e por sua vez aos humanos através da ingestão de seus derivados (VALLS e LORENZO, 2002; GONÇALVES et al., 2008).

A longo prazo, os efeitos negativos desses metais apresentam importantes danos à saúde pública consequentemente a utilização de substâncias complementares na dieta precisa ser meticulosa devido ao trajeto dos metais pesados (CASELANI, 2015). Como via de destino, pode-se obter uma alta concentração no organismo do animal ou a liberação de urina e fezes contaminadas no meio ambiente, gerando um ciclo de propagador de substâncias tóxicas (GOMES et al., 2013). A existência de metais pesados na glicerina bruta pode retratar riscos quando adicionado no manejo alimentar.

Contudo, pesquisas com finalidade de alcançar uma redução de custos de produção sem consequência prejudicial ao rebanho cresce e o monitoramento da quantificação de metais diante dessa proposta não se faz menos importante. Segundo Gomes et al. (2013), os elementos traço constituem uma classe na qual muitos são tóxicos para os seres vivos como o mercúrio (Hg), o chumbo (Pb), o cádmio (Cd) e o arsênio (As) e que apresentam riscos ambientais devido ao seu uso intenso, disseminação e toxicidade. Outros elementos traço como manganês (Mn), zinco (Zn), cromo (Cr) e cobalto (Co), que são essenciais em algumas rotas metabólicas, produzem efeitos tóxicos em concentrações mais elevadas.

No Brasil, tem-se realizado alguns estudos sobre o tema, porém, as pesquisas envolvendo a contaminação no leite animal ou humano por elementos traço tóxicos representam apenas 0,95 % na base ISI considerando as palavras-chave “milk and metals”, porcentagem aproximada encontrada também na base Scopus. Na base Scielo apenas quatro artigos foram identificados com o tema. Portanto, maiores pesquisas contribuirão com estes estudos.

Perduram dúvidas a respeito da composição mineral em leite de cabras leiteiras, particularmente quanto aos oligoelementos essenciais e os metais tóxicos que são referenciados por agências reguladoras de controle de qualidade de alimentos no Brasil. Em se tratando de aditivos em dietas para animais de interesse pecuário, são escassos dados referentes aos oligoelementos essenciais e os metais tóxicos presentes em amostras biológicas e produtos derivados do leite em cabras recebendo dietas suplementadas com diferentes níveis de glicerina bruta. Mediante o exposto, objetivou-se quantificar e analisar metais pesados no soro sanguíneo, urina, leite e queijo tipo coalho em cabras leiteiras alimentadas sob variados níveis de glicerina bruta inclusa na dieta alimentar.

2. HIPÓTESES

H0 – O uso de glicerina bruta derivada do óleo de algodão na alimentação de cabras, em níveis de até 15%, em substituição parcial ao milho, não influencia na concentração de metais no soro, urina, no leite e no queijo tipo coalho, ao ponto de serem considerados fatores de risco para intoxicação.

H1 – O uso de glicerina bruta derivada do óleo de algodão na alimentação de cabras, em níveis de até 15%, em substituição parcial ao milho, influencia na concentração de metais no soro, urina, no leite e no queijo tipo coalho, ao ponto de serem considerados fatores de risco para intoxicação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Objetiva-se avaliar o uso de glicerina bruta derivada do óleo de algodão na alimentação de cabras, em níveis de até 15% em substituição parcial ao milho, sobre as concentrações de metais no soro, urina, leite e no queijo tipo coalho.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Verificar o efeito de dietas contendo glicerina bruta nas concentrações séricas de cobre (Cu), ferro (Fe), Zn, Co, Mn, molibdênio (Mo), Cr, alumínio (Al), Cd, níquel (Ni) e Pb em cabras leiteiras recebendo com glicerina bruta derivada do óleo de algodão em nível de até 15% em substituição ao milho;
- 3.2.2. Verificar o efeito de dietas contendo glicerina bruta nas concentrações urinárias de Cu, Fe, Zn, Co, Mn, Mo, Cr, Al, Cd, Ni e Pb em cabras leiteiras recebendo com glicerina bruta derivada do óleo de algodão em nível de até 15% em substituição ao milho;
- 3.2.3. Verificar o efeito de dietas contendo glicerina bruta nas concentrações lácteas de Cu, Fe, Zn, Co, Mn, Mo, Cr, Al, Cd, Ni e Pb em cabras leiteiras recebendo com glicerina bruta derivada do óleo de algodão em nível de até 15% em substituição ao milho;
- 3.2.4. Verificar o efeito de dietas contendo glicerina bruta nas concentrações de Cu, Fe, Zn, Co, Mn, Mo, Cr, Al, Cd, Ni e Pb em queijos tipo coalho em cabras leiteiras recebendo com glicerina bruta derivada do óleo de algodão em nível de até 15% em substituição ao milho;
- 3.2.5. Verificar qual o grau de correlação da concentração dos metais presentes no soro sanguíneo, urina e leite de cabras leiteiras recebendo com glicerina bruta derivada do óleo de algodão em nível de até 15% em substituição ao milho.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Caprinocultura leiteira no Nordeste brasileiro

A adaptação climática satisfatória, a facilidade de manejo dos caprinos e geração de fonte de renda incentivam o pequeno produtor na região Nordeste do país (BATISTA e SOUZA, 2015; CATUNDA et al., 2016) e como representação desse perfil socioeconômico regional têm-se criadores com áreas de produção abaixo de 10 ha, o qual apresenta 65% da realidade nordestina e serve de possibilidade alimentar e financeira praticável que dispõe de um baixo investimento monetário e de manutenção (EMBRAPA, 2018).

Os três primeiros estados que lideram com maior rebanho nacional de caprinos pertencem a região Nordeste, em primeiro lugar o estado da Bahia seguido do Piauí e Pernambuco (EMBRAPA, 2018). Apesar de toda a expectativa em relação a caprinocultura leiteira, a produção láctea sofreu diminuição de 34% na região Nordeste assim como a redução de cabras ordenhadas. A forte seca nos últimos anos, a dependência comercial e de incentivo governamental são razões influenciadoras dessa queda (EMBRAPA, 2018). A nível mundial, a produção leiteira caprina participa com o equivalente a 2,2 % (ROHENKOHL et al., 2011).

No Nordeste brasileiro entra em evidência na exploração caprino leiteira o Cariri Paraibano, Agreste Central/Meridional e Sertões de Pajeú/Moxotó Pernambucanos, onde se estabelece a maior bacia leiteira caprina nordestina e brasileira, por volta de 2.000 famílias são vinculadas de forma direta à atividade (EMBRAPA, 2018).

Além do leite caprino possuir capacidade de suprir a necessidade de grupos sensíveis ao leite de vaca, o investimento no segmento de derivados se aperfeiçoa com produção de queijos e doces finos e se inova com os probióticos que compõem lácteos funcionais (EMBRAPA, 2018). Dentre os queijos, o queijo tipo coalho e ricota se destacam devido a preferência do consumidor brasileiro (OLIVEIRA et al., 2018).

A Instrução Normativa nº 30, de 26 de julho de 2001 define queijo coalho aquele produto obtido pela coagulação do leite através da adição de coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, o qual pode ser comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (BRASIL, 2001; OLIVEIRA et al., 2018).

4.2 Biodiesel

Define-se o biodiesel como um tipo de combustível degradável ao meio ambiente e originado de meios naturalmente reabastecidos, pela alcoólise de gorduras animais, óleos vegetais ou pela esterificação de ácidos graxos (RAMOS et al., 2011; VAN CLEEF, 2012). O óleo de soja é o principal envolvido no biodiesel e apresentou um aumento de 20,5% na comparação dos anos de 2017 e 2018, seu uso representa 69,8% dos insumos (ANP, 2019). Como fontes de matéria-prima a gordura animal encontra-se em segundo lugar seguido do óleo de algodão (MAPA, 2019).

O mecanismo de produção ocorre por intermédio da reação química dessas matérias-primas com álcool puro/anidro sob a intervenção de um catalisador (hidróxido de potássio – KOH ou hidróxido de sódio – NaOH), o que também gera glicerina como coproduto após o processo de decantação (Figura 1) (RODRIGUES e RONDINA, 2013; PAIVA et al., 2015). Durante essa sintetização são gerados também outros produtos agregando e favorecendo lucros aos produtores, como por exemplo farelos e tortas decorrentes da ação de prensagem de sementes oleaginosas (VAN CLEEF, 2012).

Capacitado para atender territórios nacionais e internacionais, o Brasil se evidencia na fabricação de biocombustíveis devido as favoráveis condições climáticas e topográficas (MAPA, 2019). A produção do biodiesel acrescentou em 24,7% do ano de 2017 para 2018 (Figura 2) e a região Nordeste possui participação produtiva equivalente a 29,4% (ANP, 2019), supõe-se que ocorra um acréscimo nacional de 4,6 bilhões de litros por ano até 2023 (MAPA, 2019).

Em 2018 o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) acatou a aprovação para adição de 5% da participação na mistura de biodiesel nos combustíveis, passando de um percentual de 10% para 15% progressivamente até o ano de 2023, o que acarretará em um aquecimento econômico nesse setor industrial (MAPA, 2019), por conseguinte uma maior disponibilidade de glicerina incentivando seu uso.

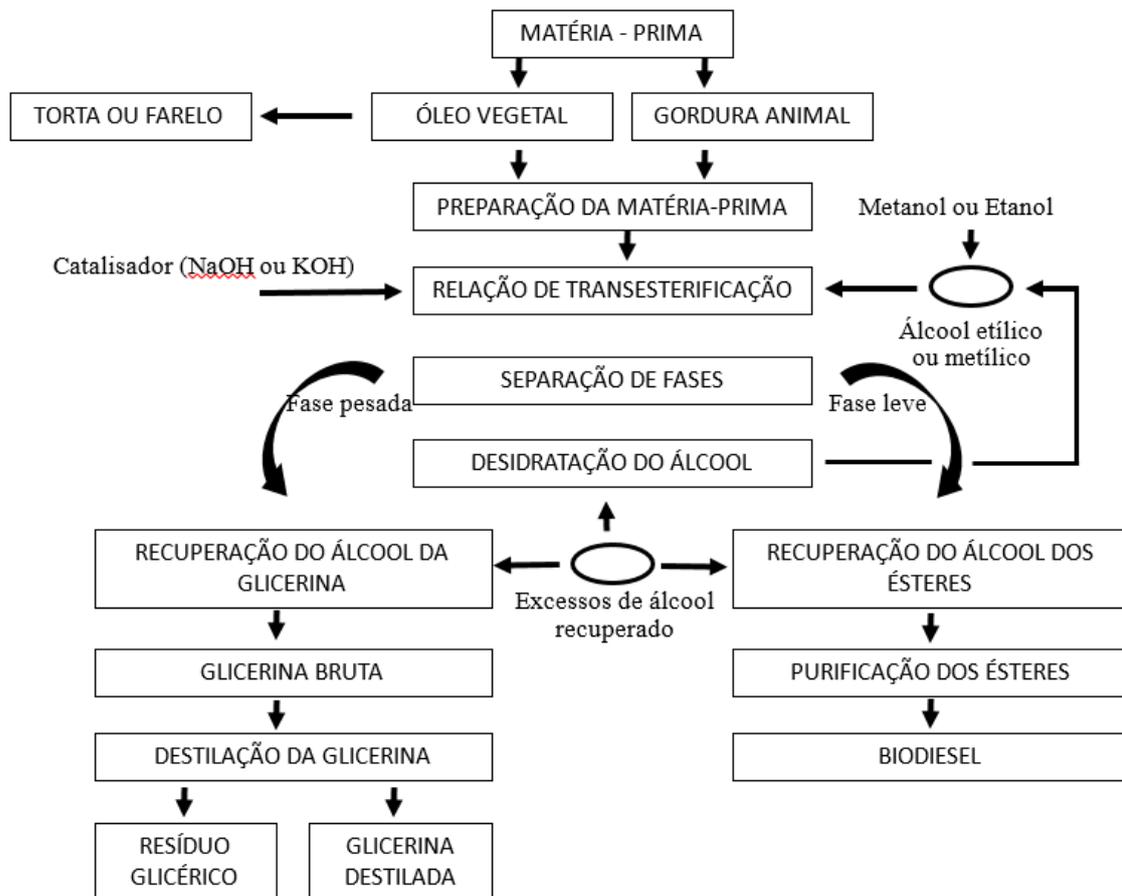


Figura 1. Representação esquemática das fases de produção do biodiesel. Fonte: Adaptado através de Rodrigues e Rondina, 2013.

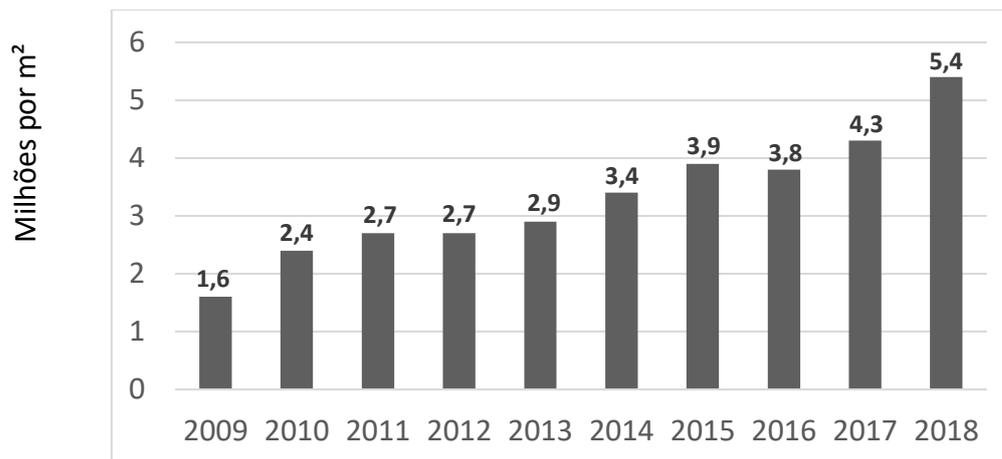


Figura 2. Panorama produtivo brasileiro de biodiesel relativo ao ano de 2009 a 2018.

Fonte: Adaptado através de ANP/SPC (2019).

4.3 Glicerina bruta

Define-se a glicerina como um composto orgânico, com característica gustativa adocicada, de textura líquida viscosa e coloração variável em tons de castanho amarelado a escuro a advir da purificação (RODRIGUES e RONDINA, 2013; DALMASO et al., 2014).

Como principal coproduto obtêm-se 10 m³ de glicerina a cada 90 m³ de biodiesel fabricado pelo meio de transesterificação (DASARI et al., 2005), o que pode variar de acordo com o material de origem. No ano de 2018 17% de glicerina foi gerada a mais que o ano decorrido, totalizando 440.600 m³ de litros de glicerina dos quais o Nordeste foi responsável por 7,7% (ANP, 2019).

Muitos são os tipos encontrados que se distinguem pela proporção de constituintes encontrados na sua composição, podendo ser glicerol, álcool, tipo de catalizador, ácidos graxos, sabões, odor e cor (MOTA et al., 2009). Devido a sua condição estável a indústria possui um aproveitamento diverso desse derivado, participando desde o ramo farmacêutico ao alimentar, têxtil e uso na tabacaria (PAIVA et al., 2015).

Existem no mercado quatro tipos disponíveis de glicerina que variam pela sua purificação, porém devem passar por etapas de alto custo e grande complexidade, o que desestimula a atividade quando em pequena produção (RODRIGUES e RONDINA, 2013). Em ordem de maior pureza têm-se a categoria alimentícia, farmacêutica, bruta “loira” e a bruta, sendo a “loira” a mais comum possuindo entre 75% e 90% de glicerol,

metanol, água e sais diluídos (DALMASO et al., 2014; PAIVA et al., 2015). O valor da glicerina bruta corresponde a três vezes menos o valor da bidestilada (CLASEN et al., 2014).

A capacidade energética, que se assemelha ao grão de milho, e o baixo valor econômico estabelecido a do tipo bruta estimulou a utilização alimentar em animais, especialmente ruminantes, e a diversificou produtivamente (VAN CLEEF, 2012; PAIVA et al., 2015).

4.4 Glicerina na alimentação de ruminantes

Pelo potencial energético alimentar, a partir de 2010 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamentou como componente da lista de aditivos isentos de registro o uso da glicerina na alimentação animal com função aglutinante, espessante e umectante através do Anexo V na Instrução Normativa de Nº 42 de 16 de dezembro 2010 e que foi fortalecida pela Instrução Normativa Nº 38 de 27 de outubro de 2015 (MAPA, 2010; MAPA, 2015), que tenha sido originado de matéria-prima vegetal, com no mínimo 80% de glicerol, máximo de 13% de umidade e 150 mg/kg de metanol (PAIVA et al., 2015).

Além do auxílio na sintetização de ácidos graxos de cadeia curta que são absorvidos a nível ruminal (RODRIGUES e RONDINA, 2013), a glicerina introduzida na dieta alimentar de ruminantes traz um diferencial benéfico devido a semelhança ao componente propilenoglicol, substância precursora exógena de glicose usada com êxito em vacas leiteiras (DUQUE et al., 2018). De acordo com Donkin (2009), ele também pode atuar de forma profilática em desordens metabólicas e propõe uma diminuição na emissão de gases efeito estufa pelos animais

Os constituintes que mais integram a dieta de ruminantes são a soja e o milho, equivalem ao maior custo do manejo alimentar (BESERRA et al., 2016). A glicerina como alternativa dietética propõe, a ponto de vista nutricional, ser um substituto dos concentrados energéticos da ração, principalmente do milho. De acordo com National Research Council – NRC (USA) (2011) citado por Duque (2018), o valor de energia líquida (energia bruta > energia metabolizável > energia líquida – incremento calórico) para lactação corresponde a 8,0 – 9,7 MJ/kg, que se assemelha aos 8,4 MJ/kg do milho.

Donkin et al. (2009) realizaram um estudo utilizando níveis de 0, 5, 10 e 15% de glicerina na matéria seca e silagem de milho como volumoso em vacas lactantes, concluíram que a adição do produto pode ser acatada em até 15% sem nenhuma consequência significativa negativa relacionada a produção e composição do leite gerado.

Almeida et al. (2017) realizaram um estudo com adição de glicerina em níveis de 0, 100, 200, 300 g/kg na matéria seca em dietas para cordeiros mestiços confinados. O consumo de ração, comportamento alimentar, desempenho em crescimento, as características da carcaça e da carne e os componentes comestíveis não-carcaça foram avaliados, os dias de alimentação para obtenção do peso de abate foram superiores nas dietas com maior composição de glicerina. Concluíram que adição de até 100 g/kg de glicerina na matéria seca parece ser uma melhor estratégia devido ao custo benefício encontrado no momento no experimento.

Chanjula et al. (2014) estudaram em cabras mestiças (nativas da Tailândia x Anglo-Nubiana, n=4) a inclusão de glicerina bruta na matéria seca na alimentação em até 20%. A ingestão de alimentos, a digestibilidade, os padrões de fermentação ruminal, os metabólitos sanguíneos (plasma, insulina e BHBA) e a utilização de nitrogênio não foram afetadas, portanto concluíram que o uso da glicerina poderia ser efetivamente utilizado como fonte de energia alternativa para substituir os cereais nas dietas.

Thoh et al. (2017) avaliaram o leite de doze cabras leiteiras quanto a sua composição, ácidos graxos, perfil de caseína, tamanho do glóbulo de gordura e cor, também foi verificado a estabilidade do leite quanto ao calor. Considerando essas análises, concluíram que o uso de glicerina na dieta até 5% possui potencial de implementação no manejo nutricional.

Andrade et al. (2018) utilizou glicerina bruta em níveis de até 18% na alimentação de 40 cordeiros mestiços não castrados da raça Santa Inês, a qual manteve eficiência da ingestão, digestibilidade e desempenho dos animais, e não promoveu distúrbios metabólicos no acabamento de cordeiros.

Duque et al. (2018) suplementaram a silagem de milho de vacas Holandês x Gir em terço inicial de lactação com níveis de glicerina equivalente a 8% e 12% substituindo o milho moído. Não houve efeito significativo em relação a digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite. Os autores concluíram que a dieta em ambos os níveis apresenta potencial para produção leiteira.

Logo, entende-se que a utilização da glicerina em dietas de animais com funcionalidade energética em substituição aos cereais pode ser incluída moderadamente,

não comprometendo o desempenho do animal (LAMMERS et al., 2008; MACH et al., 2009; KHATTAB e EL-NOR, 2019).

4.5 Limitações no uso da glicerina

O uso da glicerina de variadas formas vem ganhando espaço, todavia a presença de contaminantes como por exemplo o metanol, que atua na divisão da fase lipídica e aquosa, a sua utilização deve ser cautelosa (LEÃO et al., 2012). De acordo com a resolução 386/1999 através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para evitar possíveis intoxicações o teor de álcool metílico não deve superior a 150 ppm (DUQUE et al., 2018).

A intoxicação provocada por metanol a partir do acúmulo e metabolismo lento é capaz de provocar alteração motora, danos ao nervo óptico provocando cegueira, êmese, depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) e acidose metabólica (SKRZYDLEWSKA, 2003; BESERRA et al., 2016). São necessários estudos avaliativos referente a tolerância alimentar de metanol, pois ainda é desconhecida (DUQUE et al., 2018).

A Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos - Food and Drug Administration (FDA - EUA), reconhece e assegura o uso da glicerina na alimentação animal, denotando a inclusão de 15% do produto na matéria seca sem interferência produtiva (DUQUE et al., 2018).

No Brasil, a glicerina originada por matéria-prima provinda de subproduto animal não pode ser inserida na dieta de ruminantes devido a possibilidade de acometimento de doenças priônicas, como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), popularmente conhecida como a doença da Vaca Louca (BESERRA et al., 2016).

4.6 Metabolismo do glicerol

O glicerol, ingrediente de maior abundância encontrado na glicerina e também identificado em outros alimentos, como óleos vegetais e fosfolipídios das plantas (GIOTTO et al., 2015), e no metabolismo animal é considerado um substrato de capacidade fermentativa no rúmen, além de viabilizar por via hepática a gliconeogênese. Quando ingerido possui a possibilidade de ser absorvido pela mucosa do rúmen ou de ser absorvido pelo epitélio intestinal e fígado (BESERRA et al., 2016; MENESES, 2017).

No rúmen, há a absorção direta e ação fermentativa das bactérias ruminais que transformam o glicerol em AGCC, principalmente ácido propiônico, o qual seguirá pela corrente sanguínea para ser metabolizado no fígado a oxaloacetato mediante o ciclo de Krebs gerando também glicose. Dentre os gêneros das bactérias do rúmen as *Selenomonas* são as principais fermentadoras do glicerol (KREHBIEL, 2008).

A enzima glicerol quinase converterá por metabolismo hepático junto a adenosina trifosfato (ATP) em glicerol-3-fosfato e adenosina difosfato (ADP), iniciando a sintetização de glicose (KREHBIEL, 2008; RODRIGUES e RONDINA, 2013; CHANJULA et al., 2014) (Figura 3).

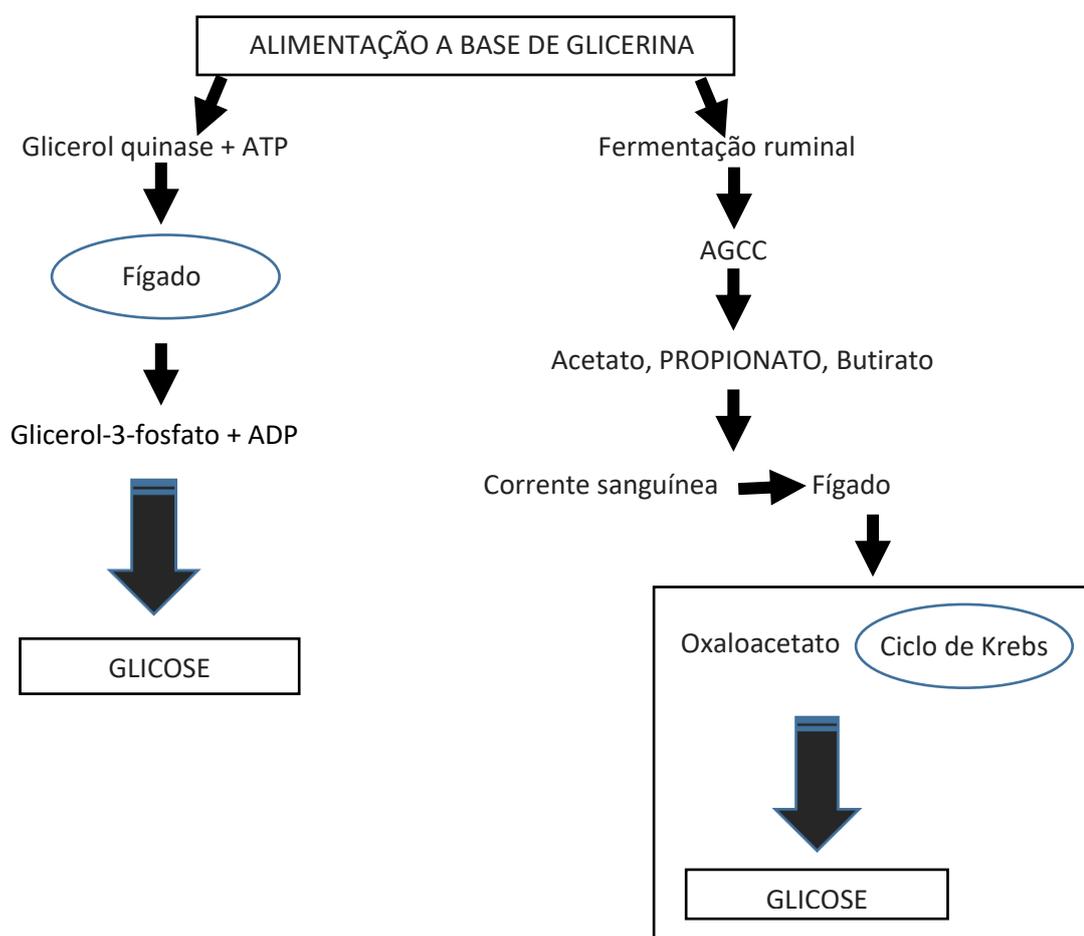


Figura 3. Metabolismo do glicerol no organismo animal. Fonte: Dados da pesquisa.

Após ingestão, cerca de 13% do glicerol destinado ao rúmen se dissipa através da passagem com a digesta, 44% destina-se para fermentação e 43% pela absorção ocorrida pela parede ruminal (KREHBIEL, 2008; SANTANA et al., 2015), o que serve de fonte energética facilmente acessível inclusive para animais em balanço energético negativo (BEN) (FEIJÓ, 2015).

Em um experimento utilizando a glicerina como substituta parcial ao milho na espécie bovina, Benedeti et al. (2015) concluíram que o coproduto do biodiesel se faz capaz de alterar a fermentação ruminal aumentando a concentração de ácidos graxos voláteis sem que a eficácia da microbiota ruminal fosse afetada. Nesse estudo, a inclusão de glicerina proporcionou um aumento dos precursores glicogênicos e efetivamente substituiu o milho em até 30% na dieta.

De acordo com Meneses (2017), o metabolismo do glicerol no organismo de animais ruminantes ainda não foi elucidado devido aos variados fatores intrínsecos capazes de interferir sua aplicabilidade.

4.7 Minerais

Os minerais são definidos como biomoléculas inorgânicas essenciais, que possuem funções estruturais, fisiológicas, catalíticas e regulatórias. São capazes de produzir componentes estruturais de tecidos e órgãos, suprir fluidos e tecidos, a fim de manter a estabilidade eletrolítica, catalisar os sistemas enzimáticos e endócrinos e atuar na regularização da replicação e diferenciação celular (SUTTLE, 2010; GONZÁLEZ e SILVA, 2019).

Eles são categorizados em macrominerais, mais abundante no organismo, e oligoelementos (intitulados também como minerais traço ou microminerais) que se apresentam em quantidades bem menores, constituindo apenas 0,3% da totalidade mineral. Fazem parte do grupo de macrominerais o cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), enxofre (S), cloro (Cl) e magnésio (Mg). Pertencente ao grupo dos microminerais têm-se Cu, Zn, iodo (I), selênio (Se), ferro (Fe), Co, Mn, Mo, flúor (F) e Cr, e ainda correspondente a uma minúscula fração, o As, boro (B), Pb, lítio (Li), Ni, silício (Si), estanho (Sn) e vanádio (V) (GONZÁLEZ e SILVA, 2019).

Suttle (2010) determina que para o organismo animal os minerais que cumprem funções essenciais são o Ca, P, Mg, K, Na, Cl, S, I, Fe, Cu, Co, Mn, Zn e Se. Alguns minerais são classificados como ocasionalmente benéficos por serem essenciais, mas em concentração baixas, como o B, Cr, Li, Mo, Ni, rubídio (Rb), Si, V.

Os metais potencialmente tóxicos, também nominados como “pesados”, participam do ecossistema e de itens que fazem parte do cotidiano, sua propagação ocorre por sedimentação atmosférica, resíduos industriais e agropecuários, dentre outras inúmeras possibilidades, afetando o solo, água e conseguinte a sanidade humana e animal

(SOUZA et al., 2009). Esse termo expande-se para metais, semi-metais e até não metais, elementos poluentes os quais possuam uma densidade maior que 6 g/c^3 (MARCOLINO, 2014). O Ar, Cd, Pb, F e o mercúrio (Hg) são considerados tóxicos, porém podem exercer também funções importantes ao organismo com exceção do Hg (SUTTLE, 2010).

4.7.1 Metais encontrados na glicerina bruta

Os compostos inorgânicos constituem todo o processo produtivo de biodiesel, predominantemente através dos catalisadores como forma residual. Na tabela de especificação do biodiesel fornecida pela Resolução Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP n° 4, de 02/02/2010 apenas alguns elementos químicos são citados junto ao seu limite máximo, a concentração máxima permitida para a soma de Ca + Mg deu-se o equivalente a 5 mg/kg, referente a adição de Na + K o valor de 5 mg/kg, para P de 10 mg/kg e para S denominou-se 50 mg/kg (ANP, 2018). A concentração desses metais e não metal sofrem influência de muitas variáveis, como por exemplo a qualidade do solo e modo de armazenamento do produto. A matéria-prima utilizada na formação do biocombustível é um importante fator na determinação desses elementos (CHAVES et al., 2010; CHAVES, 2012).

Em um trabalho realizado por Lisboa et al. (2014) foi realizado a determinação elementar por espectrometria de emissão óptica com plasma presentes no biodiesel, com a matéria-prima relativa a óleo de soja, a fim de apresentar procedimentos alternativos com amostra emulsionada (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de biodiesel derivado do óleo de soja

Elemento químico	Concentração (mg/kg)
Cu	< 0,008
Fe	< 0,006
Mn	< 0,001

Fonte: Adpatado através de Lisboa et al. (2014).

Em uma pesquisa realizada por Shin et al. (2012) com objetivo de determinar a eficiência na substituição parcial de glicerina bruta por ingredientes concentrados na

alimentação de vacas, verificou-se a composição química do coproduto incluindo os microminerais pertencentes (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de glicerina derivada do óleo de soja

Elemento químico	Concentração (mg/kg)
Cu	1
Fe	11
Mn	1
Zn	3

Fonte: Adaptado através de Shin et al. (2012).

Lage et al. (2014) trabalharam com glicerina bruta proveniente de óleos vegetais de mamona, soja, algodão e girassol produzida no estado da Bahia por via metálica em um estudo objetivando a inclusão na dieta alimentar de cordeiros em confinamento (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de glicerina derivada de óleos vegetais de mamona, soja, algodão e girassol

Elemento químico	Concentração (mg/kg)
Cu	5,6
Cr	1,2
Ni	5,9
Pb	0,3
Zn	5,2

Fonte: Adaptado através de Lage et al. (2014).

Em uma pesquisa realizada por Caixeta (2014), foram analisadas as características físicas e químicas da glicerina bruta obtida a partir da transesterificação homogênea de óleo residual com metanol e hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador, dentre elas os metais essenciais e tóxicos. O local de produção do biodiesel pertencia ao estado de Minas Gerais. Na Tabela 4 pode-se observar os valores dos metais encontrados na análise.

Tabela 4. Valores médios das concentrações de oligoelementos obtidas através de amostra de glicerina derivada do óleo de soja

Elemento químico	Concentração (mg/kg)
Cu	0,78 ± 0,21
Fe	33,25 ± 6,31
Mn	1,92 ± 0,12
Zn	1,60 ± 0,46
Cd	0,02 ± 0,02
Cr	0,51 ± 0,45
Pb	0,10 ± 0,10
Mo	0,14 ± 0,09
Ni	0,33 ± 0,02

Fonte: Adaptado através de Caixeta (2014).

4.8 Decomposição de amostras biológicas por intermédio de radiação micro-ondas

A aplicação da radiação micro-ondas abrange por completo as áreas da química analítica, desde os processos de digestão por vias úmida ou seca, extração e sistema de combustão, além disso possibilita uma decomposição mais veloz e com maior segurança. Os processos metabólicos podem ser esclarecidos através do seu uso por determinação de elementos químicos da tabela periódica em fluídos biológicos, o que auxilia na ampla pesquisa médica (KRUG e ROCHA, 2019).

Os equipamentos mais recentes atuam com mecanismo de temperatura e pressão elevadas, com o objetivo de decompor amostras, atingindo 300°C e 100 Bar, a aplicabilidade satisfatória provém das reações químicas em circunstâncias ideais envolvendo essas ferramentas. A termometria, termologia que estuda a temperatura e formas de medição, propicia a aferição desses fatores do sistema amostra-ácido, a fim de controlar as fases do processo de decomposição e determinar experimentalmente a duração e potência para cada momento do programa por micro-ondas para completa destruição do material a ser analisado. Esses sistemas de digestão de amostras são categorizados em mono-modos, multimodos e híbridos. O sistema multimodo dispersa

radiação em uma cavidade a qual possui numerosos frascos digestores (LEE, 2003; KRUG e ROCHA, 2019).

Soluções reagentes, como o ácido nítrico (HNO_3), são usadas na oxidação de amostras orgânicas, embora possuam relativamente um baixo potencial oxidante devido a necessidade de oxigênio (O_2) no interior do tubo digestor e do gradiente de temperatura por volta dos tubos. A atmosfera é o meio mais fácil de se obter o O_2 essencial para que ocorra a reação, mas há artifícios de intensificação para esse procedimento como a utilização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que também permite a redução do reagente HNO_3 através da sua diluição. Por fim, uma etapa de diluição faz-se necessária após a realização da ação de digerir para que se obtenha eficiência na quantificação dos analíticos (LEE, 2003; CASTRO, 2007; KRUG e ROCHA, 2019).

4.9 Determinação de metais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A utilização para quantificação de elementos químicos através da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) tem seu uso variavelmente direcionado, desde a mensuração da repercussão ambiental a avaliação da saúde humana e animal (BUTCHER, 2010). Atua através da estimulação da temperatura dos metais até que se atinja um estado de alta energia, à medida que retornam a estados de energia mais baixos liberam luz em comprimento de onda respectivo ao elemento químico (BOUTAKHRIT et al., 2005).

A fonte de energia responsável pela excitação dos átomos e íons regularmente usados na emissão óptica é o plasma acoplado indutivamente (ICP), o atingimento de temperaturas por radiação ou por descarga elétrica promove sua efetividade (SNEDDON e VICENT, 2008; HOLLER et al., 2009).

A formação do plasma ocorre por intermédio de um gás parcialmente ionizado, como exemplo têm-se o nitrogênio (N) e o argônio (Ar), que é utilizado mais comumente. O processo de formação do plasma acontece quando o Ar ultrapassa pela tocha de quartzo e proporciona uma descarga elétrica de uma fonte de Tesla iniciando a ionização do gás (TREVIZAN e NÓBREGA, 2007). Ocorre uma aceleração nos elétrons produzidos se transferem colidindo com os átomos e produz mais energia ao gás, dando início ao desenvolvimento (GUINÉ, 1998). Os elétrons absorvem energia para que a temperatura no plasma seja mantida (MONTASER e GOLIGHTLY, 1992; HARRIS, 2003).

Como benefícios dessa ferramenta têm-se a quantificação de variados elementos de modo ágil, técnica amplamente difundida para análise de elementos traço e também a praticidade de que apenas uma curva analítica seja capaz de cobrir uma extensa faixa de concentração para a análise de amostras distintas (LUKAS, 1993; CHAVES, 2012).

5. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de licença 059/2016, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

5.1 Local do experimento, animais, tratamentos e delineamento experimental

O experimento ocorreu no setor de caprinocultura do Departamento de Zootecnia (DZ) da UFRPE, localizada na região Metropolitana da cidade do Recife, localizada entre as coordenadas 08°01'15,1"S e 34°56'3,2"W, região Metropolitana da cidade do Recife, apresentando clima (tipo As' e Ams' classificação climática de Koppen) quente e úmido, com precipitação acima de 1000 mm e temperatura média do ar sempre superior a 18° C e umidade relativa do ar alta, com variação de 79,2 a 90,7 % nos meses com maior ocorrência de chuvas (abril a julho), podendo chegar até 100%.

Foram selecionados 16 caprinos da raça Saanen, fêmeas, em fase de lactação com peso corporal médio de 50 kg e produção média de 2,5 kg/leite/dia. Os animais foram distribuídos em quatro quadrados latinos e aleatoriamente nos tratamentos com diferentes níveis de glicerina bruta, sendo tratamento G0 - controle sem adição de glicerina, tratamento G5 - 5% de glicerina na matéria seca da dieta, tratamento G10 - 10% de glicerina na matéria seca da dieta e tratamento G15 - 15% de glicerina na matéria seca da dieta. A glicerina bruta, originada por transesterificação com óleo de algodão como matéria-prima, utilizada neste experimento foi doada pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Os animais foram identificados, pesados e tratados contra ectoparasitas e endoparasitas. Posteriormente, foram alojados em instalações higienizadas sob manejo uniforme em galpão coberto com telhas de barro, mantidos individualmente, confinados em baias de madeira, suspensas a 60 cm do solo, com piso ripado medindo 1,10 x 1,20 m, providas de comedouro e bebedouro. O galpão era higienizado duas vezes ao dia, utilizando água corrente e clorada (Figura 4).

As dietas foram calculadas de acordo com o NRC (2007) para satisfazer as exigências nutricionais de cabras em lactação, pesando em média 50 kg e média de produção de 2,5 kg de leite/dia (Tabela 5).



Figura 4. Baias individuais suspensas identificadas no Departamento de Zootecnia – UFRPE. Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Manejo

5.2.1 Manejo alimentar

O experimento teve início 30 dias após o parto das fêmeas, ao qual iniciaram pelo período de adaptação de 14 dias. Posteriormente foram distribuídas aleatoriamente nos tratamentos (Tabela 5). Os animais foram avaliados durante 76 dias, divididos em quatro períodos de 19 dias (14 dias de adaptação e cinco dias de coleta de dados e amostras). As pesagens dos animais foram realizadas no início e final de cada período experimental.

As sobras foram pesadas a cada manhã, sendo ajustada em função do consumo do dia anterior, permitindo-se sobras de 15%. Água limpa foi disponibilizada à vontade durante todo o período experimental. O consumo de matéria seca e demais nutrientes foi calculado pela diferença entre as quantidades ofertadas e as sobras.

Durante os períodos de coletas foram retiradas uma amostra correspondente a 10% do total das sobras por animal para o procedimento de pré-secagem em estufa de circulação forçada a $60\pm 5^{\circ}\text{C}$, por 72 horas. Em seguida, as amostras de sobras e ingredientes utilizados na confecção das rações foram moídos em moinho tipo Willey, com peneira de crivo 2 mm e posteriormente a 1mm, então formada uma amostra

composta, por animal e por período, para análises no laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFRPE.

Tabela 5. Proporção dos ingredientes e composição químico-bromatológica estimada das dietas experimentais, com base em dados tabelados.

Ingredientes (%)	Níveis de Glicerina Bruta (%)			
	0	5	10	15
Feno de Tifton	40,00	39,00	38,00	37,00
Milho Grão	44,00	39,00	34,00	29,00
Farelo de Soja	12,50	13,70	14,90	16,10
Glicerina Bruta	0,00	5,00	10,00	15,00
Suplemento Mineral ¹	2,50	2,50	2,50	2,50
Sal Comum	1,00	0,80	0,60	0,40
Total	100	100	100	100
Matéria Seca	87,53	86,88	86,23	85,58
Matéria Orgânica	91,42	91,08	90,74	90,41
Matéria Mineral	5,03	5,29	5,54	5,50
Proteína Bruta	15,34	15,37	15,43	15,51
Extrato Etéreo	2,12	3,19	4,27	5,34
Fibra em Detergente Neutro ²	49,20	47,49	46,75	45,83
Carboidratos Não Fibrosos	29,08	28,60	28,35	27,92

¹Níveis de garantia (nutrientes/kg): Cálcio-150g; Enxofre-12g; Fósforo-65g; Magnésio-6.000mg; Sódio-107g; Cobre- 100mg; Cobalto-175mg; Ferro-1000mg; Flúor máximo-650mg; Iodo-175mg; Manganês-1440mg; Selênio-27mg e Zinco- 6000mg. ²Fibra em Detergente Neutro foi corrigida para cinzas e proteínas.

O consumo de matéria seca e demais nutrientes foi calculado pela diferença entre as quantidades ofertadas e as sobras. As determinações de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) foram obtidos conforme metodologia de Detmann et al. (2012). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo metodologia descrita por Van Soest et. al. (1991), e adaptada por Mertens (2002).

Para determinação de carboidratos totais (CHO), conforme metodologia de Sniffen et al. (1992), as frações foram consideradas como: carboidratos fibrosos (CF), considerados como FDNcp; carboidratos não-fibrosos (CNF) obtidos pela subtração da

FDNcp por CHO; e a fração C, obtida pela FDN indigerível, após 240 horas de incubação *in situ*, conforme descrito por Casali et. al. (2008).

5.2.2 Manejo de ordenha

Todas as ordenhas foram realizadas diariamente duas vezes ao dia, as 6h e as 14h, de manualmente pelo mesmo ordenhador durante todo o experimento, as quais davam-se início após a higienização e desinfecção dos tetos com água corrente e sabão neutro seguido da solução pré-dipping e pós-dipping com iodo glicerinado a 2%.

O leite de cada cabra era retirado em um recipiente plástico individual e identificado, posteriormente peneirado e armazenado em leiteira plástica e encaminhado para refrigeração. Ao final da segunda ordenha diária, eram realizadas as compostas do produto individual colhido no período da manhã e da tarde, assim como a mistura do leite dos animais que equivaliam ao mesmo tratamento. Após a colheita de amostras o leite foi destinado a produção do queijo tipo coalho e o restante para consumo humano.

5.3 Colheita de amostras

Após a finalização de cada ciclo do experimento, nos quatro momentos (C1, C2, C3 e C4), foram colhidas amostras de sangue, urina e leite de todos os animais, respectivamente (Figura 5).

5.3.1 Colheita de sangue

Amostras de sangue foram realizadas por venopunção da jugular externa com a utilização de agulha hipodérmica em sistema à vácuo, utilizando-se tubos à vácuo siliconizados (Vacutainer®) sem anticoagulante para obtenção do soro sanguíneo. Os tubos foram posicionados em ângulo de 45 graus para retração do coágulo, quando, em seguida, foram submetidos à centrifugação a 3.500 rpm, por 15 minutos, para obtenção do soro sanguíneo. Imediatamente após, amostras de soro foram aliquotados em microtubos cônicos de polipropileno (Eppendorf®), com capacidade para 2,5 mL, e armazenadas a temperatura de -20°C até às os procedimentos analíticos.

5.3.2 Colheita de urina

Cinco horas após o fornecimento da dieta da manhã, a urina foi obtida por micção espontânea em coletores de urina de 50 mL e, posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos coletores cônicos de polietileno (Falcon®) de 15 mL, acondicionadas em ambiente isotérmico. No laboratório, as amostras foram distribuídas em microtubos cônicos de polipropileno (Eppendorf®), com capacidade para 2,5 mL, e armazenadas a temperatura de -20°C até o período dos processamentos.

5.3.3 Colheita de leite

Após as duas ordenhas diárias, o leite correspondente ao mesmo indivíduo foi obtido, homogeneizado, acondicionado em tubos coletores cônicos de polietileno (Falcon®) de 15 mL e acomodados em ambiente isotérmico. No laboratório as amostras foram distribuídas em microtubos cônicos de polipropileno (Eppendorf®), com capacidade para 2,5 mL, e armazenadas a temperatura de -20°C até o período dos processamentos.

5.3.4 Colheita de queijo tipo coalho

Os queijos tipo coalho foram preparados pelo Departamento de Zootecnia – UFRPE sete dias após cada colheita de leite. O processo de produção do queijo constituiu-se pelas etapas de filtração do leite, adição de coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, enformagem, prensagem e salga. Foram produzidos um queijo para cada tratamento (G0, G5, G10, G15) nos quatro momentos de coleta, totalizando 16 queijos.

Foram aferidos em balança analítica 20 g de queijo tipo coalho, de cada queijo produzido em tubos coletores cônicos de polietileno (Falcon®) com capacidade para 50 g. Os recipientes utilizados como forma de armazenamento foram identificados previamente e armazenados em freezer à temperatura de - 20°C.



Figura 5. Momentos das coletas de sangue, urina, leite e queijo de coalho. Fonte: Dados da pesquisa.

5.4 Eficiência da digestão

Antes da definição do método de digestão, realizam-se testes com uma amostra de cada origem para avaliar a eficiência do procedimento de decomposição. A eficiência da reação digestiva por micro-ondas foi ponderada mediante ao resultado do teor de carbono residual (RCC – Residual Carbon Content), que é determinado como a porcentagem de carbono remanescente na amostra posteriormente a ação de decomposição em relação ao teor original de carbono na amostra anterior a digestão (KRUSHEVSKA et al., 1992; GOUVEIA et al., 2001).

A utilização de espectrofotometria mensurou o carbono orgânico original e residual nas amostras. Foram realizadas alterações no método de digestão (massa de amostra, tempo e temperatura de digestão) até que valores adequados de RCC fossem obtidos.

A quantificação dos teores de carbono originais e remanescentes foi realizada com espectrofotômetro de absorção molecular UV-visível (DR/2010, Hach, EUA) com uma célula de 13,5 mm de caminho óptico, monitorando o comprimento de onda de 620 nm. Ocorreu-se por meio de uma adaptação do método empregado por Krushevská et al. (1992), onde uma alíquota de 1 mL (solução ou suspensão) ou 6 mg de amostra (sólida) foi transferida diretamente para tubos de ensaio com rosca (Hach, EUA).

Foram então adicionados 1,5 mL de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (50 g L⁻¹) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Os tubos foram fechados e homogeneizados em agitador de tubos (tipo vortex) (Q-220B2, Quimis, Brasil) e depois levados para um bloco digestor (Spectroquant TR 420, Merck, Alemanha) a 150°C por 2 h. Com a amostra em temperatura ambiente, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 620 nm usando o próprio tubo como uma cubeta.

A concentração de carbono foi estimada usando uma curva analítica previamente preparada. Quando o teor de carbono era muito alto, a amostra era diluída (solução ou suspensão) ou utilizada em massas inferiores a 6 mg (sólido).

Após vários testes com utilização de volume/peso de amostras e reagentes o protocolo foi escolhido de acordo com a eficiência na decomposição de cada origem amostral.

5.5 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

As amostras foram preparadas antes da quantificação dos minerais, passando por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (Figura 6). As soluções de branco analítico foram realizadas em triplicata e passaram por todas as etapas de preparo das amostras, porém na ausência amostra.

As amostras colhidas e armazenadas referentes a soro sanguíneo, urina, leite, queijo tipo coalho e glicerina foram transportadas para processamento ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ).



Figura 6. A. Microondas Multiwave 3000 Anton Paar®. B. Microondas Provecto Analítica DGT 100 Plus®. C. Espectrômetro ICP-OES Agilent 5100®.

5.5.1 Amostras de soro sanguíneo

As digestões das amostras de soro sanguíneo seguiram o padrão de processamento assistido por radiação micro-ondas realizado pelo equipamento Multiwave 3000 Anton Paar®, em frascos digestores de perfluoroalcoxi (PFA). O programa registrado apresentava quatro etapas com potência e pressão máxima respectivamente equivalente a 600 W e 0,5 bar, e variação de tempo e temperatura (etapa 1: dez minutos – 100° C, etapa 2: dois minutos – 140° C, etapa 3: dez minutos – 100° C, etapa 4: cinco minutos – 30° C), totalizando 27 minutos.

Foram pipetadas 2 mL de cada amostra de soro em um tubo individual. As soluções usadas para obtenção da reação digestiva foram 3 mL de ácido nítrico (HNO₃ a 65% PA), 2 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 35% PA) e 5 mL de água ultrapura, respectivamente nessa ordem, aos quais foram pipetadas respectivamente nessa ordem após a introdução da amostra.

Os frascos digestores permaneceram fechados por 30 minutos fora do digestor para seu total resfriamento. Seguido a abertura dos frascos, as soluções foram repassadas individualmente em tubos coletores cônicos de polietileno (Falcon®) com capacidade para 15 mL, diluídos com água ultrapura (Milli-Q®) até sua capacidade máxima e acondicionados em geladeira a temperatura de 6° C para conseguinte leitura.

As digestões das amostras de soro foram realizadas no Laboratório de Doenças Metabólicas e Nutricionais localizado no Centro de Estudos Avançados em Caprinos e Ovinos do Departamento de Medicina Veterinária (LDMN/DMV) da UFRPE.

5.5.2 Amostras de urina e leite

A decomposição das amostras de urina e leite seguiram o padrão de processamento assistido por radiação micro-ondas realizado pelo equipamento Provecto Analítica DGT 100 Plus®, utilizando tubos de politetrafluoretileno modificado (TFM), com o programa registrado em quatro etapas em potências diferentes, totalizando 21 minutos (etapa 1: cinco minutos – 330 W, etapa 2: cinco minutos – 660 W, etapa 3: quatro minutos – 900 W, etapa 4: sete minutos – 0 W).

Foram pipetadas 2 mL de cada amostra em um tubo individual. As soluções usadas para obtenção da reação digestiva foram 3 mL de ácido nítrico (HNO₃ a 65% PA), 2 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 35% PA) e 5 mL de água ultrapura, respectivamente

nessa ordem, aos quais foram pipetadas respectivamente nessa ordem após a introdução da amostra.

Os frascos digestores permaneceram fechados por 30 minutos fora do digestor para seu total resfriamento. Seguidamente a abertura foram armazenados individualmente em tubos coletores cônicos de polietileno (Falcon®) com capacidade para 15 ml, diluídos com água ultrapura (Milli-Q®) até sua capacidade máxima e acondicionados em geladeira a temperatura de 6° C para conseguinte leitura.

As digestões da urina foram realizadas no laboratório de Química Analítica do Centro de Apoios à Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

5.5.3 Amostras de queijo tipo coalho

A decomposição das amostras de queijo de coalho seguiram o padrão de processamento assistido por radiação micro-ondas realizado pelo equipamento Provecto Analítica DGT 100 Plus®, utilizando tubos de politetrafluoretileno modificado (TFM), com o programa registrado em quatro etapas em potências diferentes, totalizando 21 minutos (etapa 1: cinco minutos – 330 W, etapa 2: cinco minutos – 660 W, etapa 3: quatro minutos – 900 W, etapa 4: sete minutos – 0 W).

Em balança analítica, foram aferidos aproximadamente 0,5 g de cada amostra em um tubo individual. As soluções usadas para obtenção da reação digestiva foram 3 mL de ácido nítrico (HNO₃ a 65% PA), 2 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 35% PA) e 5 mL de água ultrapura, respectivamente nessa ordem, aos quais foram pipetadas respectivamente nessa ordem após a introdução da amostra.

Os frascos digestores permaneceram fechados por 30 minutos fora do digestor para seu total resfriamento. Seguidamente a abertura foram armazenados individualmente em tubos coletores cônicos de polietileno (Falcon®) com capacidade para 15 ml, diluídos com água ultrapura (Milli-Q®) até sua capacidade máxima e acondicionados em geladeira a temperatura de 6°C para conseguinte leitura.

As digestões do queijo tipo coalho foram realizadas no laboratório de Química Analítica do CENAPESQ – UFRPE.

5.5.4 Amostra de glicerina bruta

A decomposição das amostras de glicerina seguiram o padrão de processamento assistido por radiação micro-ondas realizado pelo equipamento Provecto Analítica DGT 100 Plus®, utilizando tubos de politetrafluoretileno modificado (TFM), com o programa registrado em quatro etapas em potências diferentes, totalizando 21 minutos (etapa 1: cinco minutos – 330 W, etapa 2: cinco minutos – 660 W, etapa 3: quatro minutos – 900 W, etapa 4: sete minutos – 0 W). As digestões da glicerina bruta foram realizadas no laboratório de Química Analítica do Centro de Apoios à Pesquisa do CENAPESQ – UFRPE (Figura 7).

Em balança analítica, foi aferida aproximadamente 0,5 g da amostra de glicerina bruta em um tubo individual. A solução usada para obtenção da reação digestiva foi 5 mL de ácido nítrico (HNO_3 a 65% PA), aos qual foi pipeta após a introdução da amostra.

O frasco digestor permaneceu fechado por 30 minutos fora do digestor para seu total resfriamento. Seguidamente a abertura foi armazenado individualmente em um tubo coletor cônico de polietileno (Falcon®) com capacidade para 15 ml, diluído com água ultrapura (Milli-Q®) para conseguinte leitura (Tabela 6).



Figura 7. Acondicionamento da glicerina bruta nos recipientes plásticos prontos para consumo animal.

Tabela 6. Concentração e limites de detecção dos metais essenciais e tóxicos da glicerina bruta, derivada do óleo de algodão, obtida e utilizada nas dietas dos animais

Elemento químico	Concentração (mg/Kg)	Limite de Detecção (mg/kg)
Al	1,50	1,20
Cd	0,03	0,015
Co	< 0,06	0,056
Cr	0,16	0,034
Cu	1,40	0,11
Fe	29,00	1,00
Mn	0,36	0,016
Mo	< 0,085	0,085
Ni	< 0,66	0,66
Pb	< 1,800	< 1,80
Zn	10,40	3,70

5.6 Determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Para a determinação dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) do método foram preparados 10 brancos analíticos seguindo o procedimento de digestão estabelecido para cada amostra. O limite de detecção é definido como $3 \times DP_{\text{Branco}}/a$ e o limite de quantificação como $10 \times DP_{\text{Branco}}/a$, sendo “ DP_{Branco} ” o desvio-padrão do sinal analítico do branco ($n = 10$) e “ a ” o coeficiente angular da curva analítica (Analytical Methods Committee, 1987). Apenas foram expressos e discutidos neste trabalho os valores de concentração que ficaram acima do limite de detecção.

5.7 Determinação de metais

As amostras a serem determinadas passaram por uma etapa de inspeção e filtração com uso de papel filtro quantitativo (25 mm x 0,45 μm x 170 μm). Os metais Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn foram quantificados a partir de um espectrômetro de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente ICP-OES Agilent 5100®.

Foram utilizadas as condições operacionais expressas na Tabela 7. As seguintes linhas de emissão (nm), em vista axial de plasma, foram monitoradas: Al I 396,152, Cd II 214,439, Co II 228,615, Cr II 267,716, Cu I 327,395, Fe II 238,204, Mn II 257,610, Mo II 202,032, Ni II 231,604, Pb II 220,353 e Zn I 213,857. O argônio com pureza mínima de 99,999% (Messer Gases, Brasil) foi utilizado nas determinações do ICP-OES para geração de plasma, nebulização e gás auxiliar.

Tabela 7. Parâmetros utilizados na análise ICP-OES

Parâmetros instrumentais	ICP-OES
Potência de radiofrequência (W)	1200
Vazão de gás de plasma (L min ⁻¹)	12
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,0
Vazão de gás nebulizador (L min ⁻¹)	0,7
Tempo de descarga (s)	10
Tempo de atraso (s)	15
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de pulverização	Ciclônica

Uma solução-mãe de ftalato ácido de potássio - KHP (Merck, Alemanha) contendo 10000 mg L⁻¹ de carbono foi preparada e, a partir dela, soluções padrão de calibração foram feitas na faixa de 50 - 3200 mg L⁻¹ de carbono. A curva analítica multielementar foi preparada a partir de soluções monoelementares dos analitos Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn (Specsol, Brasil), Co, Mo, (SCP Science, Canadá) e Ni (Inorganic Ventures, EUA) na concentração de 1000 mg L⁻¹.

As seguintes concentrações da solução de calibração padrão foram aplicadas no preparação das curvas analíticas: 0,5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹ (Al, Fe); 0,05, 1, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹ (Cu, Mn, Zn); 0,005, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg L⁻¹ (Cr, Ni, Pb); 0,001, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,1 mg L⁻¹ (Cd, Co, Mo). As soluções foram preparadas em meio de HNO₃ a 5% (v/v) para aumentar sua estabilidade, evitando a precipitação e adsorção dos analitos nos recipientes.

As quantificações dos metais foram realizadas no laboratório de Química Analítica do Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ/UFRPE).

5.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, observando a significância dos modelos linear, quadrático, cúbico, utilizando-se o procedimento General Linear Models (GLM) do programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 2009). As médias foram comparadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Realizou-se também análise de correlação de Pearson entre pares de variáveis. A significância obtida na correlação linear foi avaliada ficando estabelecido que exista uma correlação de alta intensidade entre as variáveis com $r > 0,60$; média intensidade com $0,30 < r < 0,60$; e de baixa intensidade com $r < 0,30$. O nível de significância obtido para todas as correlações foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Estudo da análise de regressão

Não houve influência dos níveis de glicerina bruta, em substituição do milho, na dieta de cabras leiteiras com relação as concentrações séricas dos metais Cu, Fe, Zn e Mn. As concentrações séricas de Co, Mo, Cr, Al, Cd, Ni e Pb estiveram abaixo do limite de detecção, de modo que não foram expressos seus respectivos níveis de $P < F$ da análise de regressão (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios da concentração de metais essenciais e tóxicos no soro sanguíneo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta

Metais (mg/L)	Níveis de Glicerina da Dieta (%)				Tipo de Efeito			P > F	Média Geral
	0	5	10	15	L ¹	Q ²	C ³		
Cu	0,94	1,00	0,94	0,92	ns	ns	ns	0,4835	0,95
Fe	1,23	1,50	1,65	1,45	ns	ns	ns	0,8657	1,46
Zn	1,05	2,01	1,28	1,52	ns	ns	ns	0,6672	1,47
Co	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Mn	0,02	0,02	0,03	0,02	ns	ns	ns	0,8556	0,02
Mo	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Cr	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Al	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Cd	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Ni	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Pb	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-

¹Linear; ²Quadrático; ³Cúbico; ns = não significativo ao nível de 5 % de probabilidade; <LD = Limite de detecção; LD Cu = 0,0071 mg/L; LD Fe = 0,067 mg/L; LD Zn = 0,074 mg/L; LD Co = 0,024 mg/L; LD Mn = 0,0023 mg/L; LD Mo = 0,028 mg/L; LD Cr = 0,014 mg/L; LD Al = 1,30 mg/L; LD Cd = 0,017; LD Ni = 0,020 mg/L; LD Pb = 0,080 mg/L.

Não houve influência dos níveis de glicerina bruta, em substituição do milho, na dieta de cabras leiteiras com relação as concentrações urinárias dos metais Cu, Zn, Mn, Mo, Cr e Al. As concentrações urinárias de Fe, Co, Cd, Ni e Pb estiveram abaixo do limite

de detecção, de modo que não foram expressos seus respectivos níveis de P<F da análise de regressão (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios da concentração de metais essenciais e tóxicos na urina de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta

Metais (mg/L)	Níveis de Glicerina da Dieta (%)				Tipo de Efeito			P > F	Média Geral
	0	5	10	15	L ¹	Q ²	C ³		
Cu	0,06	0,06	0,07	0,05	ns	ns	ns	0,6844	0,06
Fe	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Zn	0,39	0,40	0,46	0,45	ns	ns	ns	0,7346	0,43
Co	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Mn	0,03	0,02	0,03	0,02	ns	ns	ns	0,4040	0,03
Mo	0,16	0,26	0,18	0,19	ns	ns	ns	0,3358	0,20
Cr	0,06	0,04	0,05	0,05	ns	ns	ns	0,5934	0,05
Al	2,19	1,77	2,04	1,80	ns	ns	ns	0,7787	1,95
Cd	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Ni	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Pb	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-

¹Linear; ²Quadrático; ³Cúbico; ns = não significativo ao nível de 5 % de probabilidade; <LD = Limite de detecção; LD Cu= 0,0053 mg/L; LD Fe= 0,13 mg/L; LD Zn= 0,10 mg/L; LD Co= 0,032 mg/L; LD Mn= 0,0026 mg/L; LD Mo= 0,040 mg/L; LD Cr= 0,0092 mg/L; LD Al= 0,25 mg/L; LD Cd= 0,010 mg/L; LD Ni= 0,024 mg/L; LD Pb= 0,086 mg/L.

Não houve influência dos níveis de glicerina bruta, em substituição do milho, na dieta de cabras leiteiras com relação as concentrações lácteas dos metais Cu, Zn e Mn. A concentrações lácteas de Fe, Co, Mo, Cr, Al, Cd, Ni e Pb estiveram abaixo do limite de detecção, de modo que não foram expressos seus respectivos níveis de P<F da análise de regressão (Tabela 10).

Tabela 10. Valores médios da concentração de metais essenciais e tóxicos no leite de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta

Metais (mg/L)	Níveis de Glicerina da Dieta (%)				Tipo de Efeito			P > F	Média Geral
	0	5	10	15	L ¹	Q ²	C ³		
Cu	0,14	0,13	0,11	0,13	ns	ns	ns	0,4231	0,13
Fe	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Zn	2,61	3,03	2,12	2,10	ns	ns	ns	0,1002	2,47
Co	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Mn	0,13	0,11	0,11	0,11	ns	ns	ns	0,4269	0,12
Mo	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Cr	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Al	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Cd	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Ni	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Pb	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-

¹Linear; ²Quadrático; ³Cúbico; ns = não significativo ao nível de 5 % de probabilidade; <LD = Limite de detecção; LD Cu= 0,0053 mg/L; LD Fe= 0,13 mg/L; LD Zn= 0,10 mg/L; LD Co= 0,032 mg/L; LD Mn= 0,0026 mg/L; LD Mo= 0,040 mg/L; LD Cr= 0,0092 mg/L; LD Al= 0,25 mg/L; LD Cd= 0,010 mg/L; LD Ni= 0,024 mg/L; LD Pb= 0,086 mg/L.

Não houve influência dos níveis de glicerina bruta, em substituição do milho, na dieta de cabras leiteiras com relação aos metais Cu, Zn e Mn em queijos tipo coalho. As concentrações dos metais Fe, Co, Mo, Cr, Al, Cd, Ni e Pb nos queijos tipo coalho estiveram abaixo do limite de detecção, de modo que não foram expressos seus respectivos níveis de P<F da análise de regressão (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios da concentração de metais essenciais e tóxicos em queijo tipo coalho de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta

Metais (mg/Kg)	Níveis de Glicerina da Dieta (%)				Efeito			P > F	Média Geral
	0	5	10	15	L ¹	Q ²	C ³		
Cu	0,42	1,04	0,47	0,58	ns	ns	ns	0,2208	0,63
Fe	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Zn	20,34	23,41	22,41	22,98	ns	ns	ns	0,2628	22,30
Co	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Mn	0,52	0,60	0,30	0,37	ns	ns	ns	0,1045	0,45
Mo	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Cr	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Al	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Cd	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Ni	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-
Pb	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-	-	-	-

¹Linear; ²Quadrático; ³Cúbico; ns = não significativo ao nível de 5 % de probabilidade; <LD = Limite de detecção; LD Cu= 0,021 mg/kg; LD Fe= 0,50 mg/kg; LD Zn= 0,39 mg/kg; LD Co= 0,13 mg/kg; LD Mn= 0,010 mg/kg; LD Mo= 0,16 mg/kg; LD Cr= 0,037 mg/kg; LD Al= 1,0 mg/kg; LD Cd= 0,039 mg/kg; LD Ni= 0,10 mg/kg; LD Pb= 0,34 mg/kg.

Estudo de correlação de Pearson

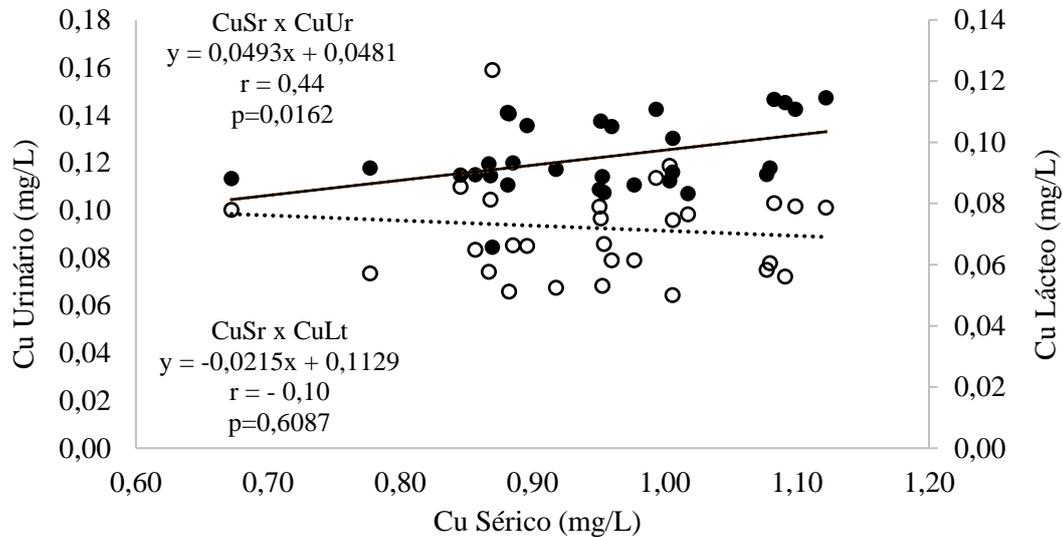


Figura 8. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações séricas de Cu com Cu urinário e Cu lácteo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância.

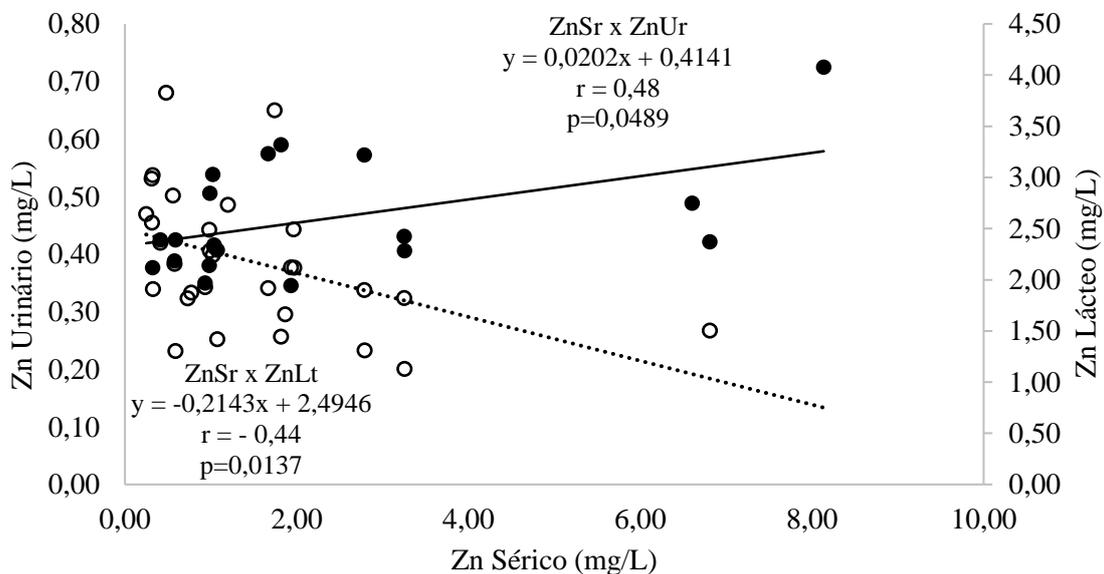


Figura 9. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações séricas de Zn com Zn urinário e Zn lácteo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância.

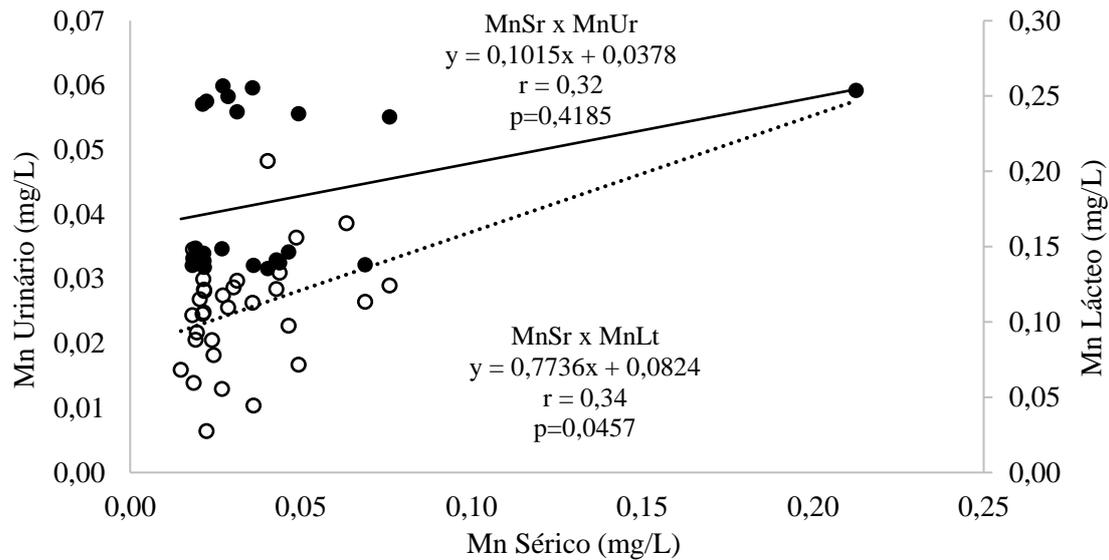


Figura 10. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações séricas de Mn com Mn urinário e Mn lácteo de cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância.

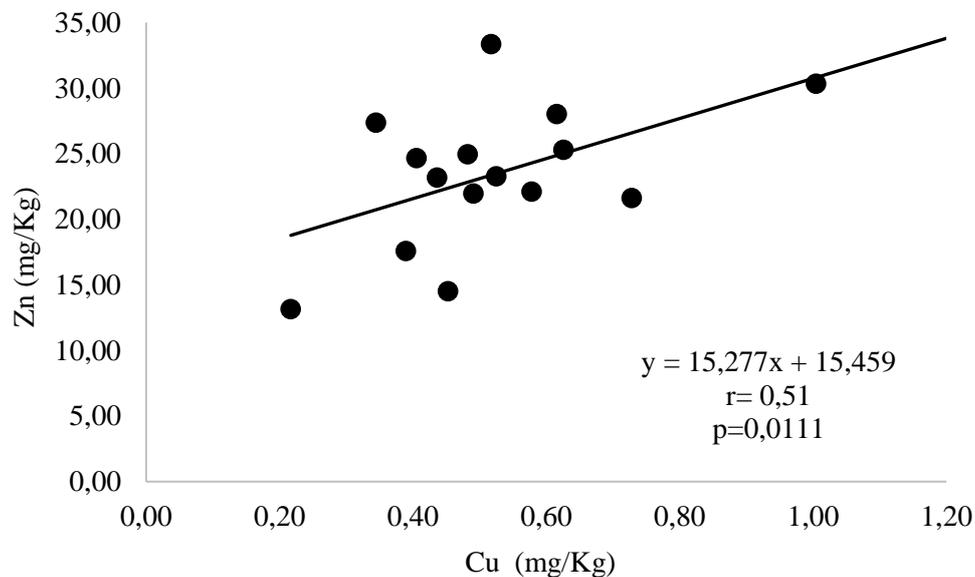


Figura 11. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações de Cu com Zn em queijo tipo coalho das cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância.

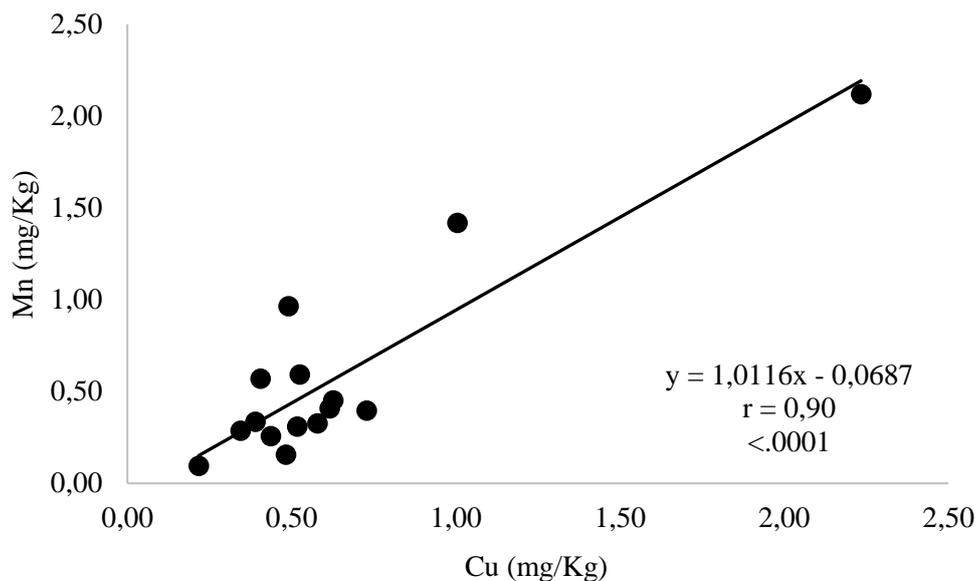


Figura 12. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações de Cu com Mn em queijo tipo coalho das cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância.

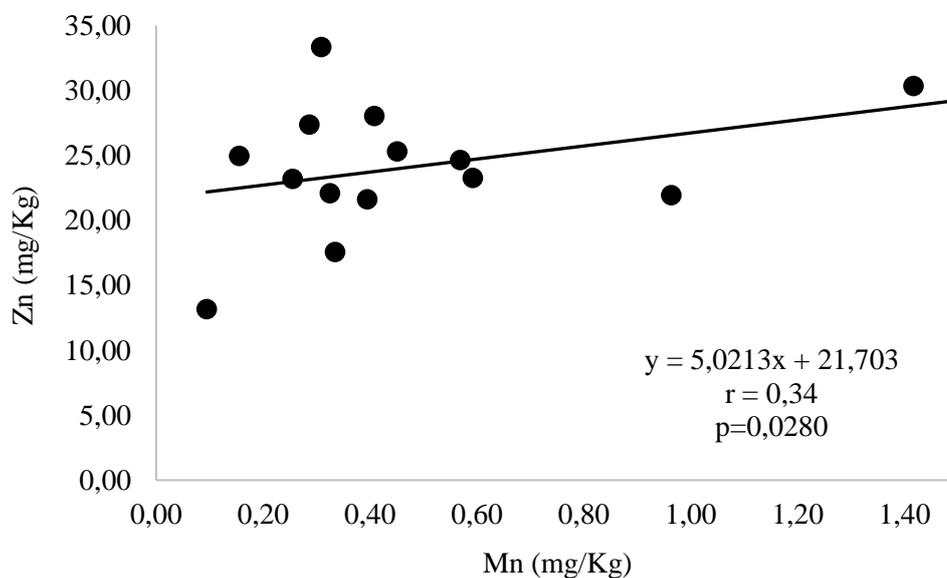


Figura 13. Representação gráfica da análise de correlação entre as concentrações de Mn com Zn em queijo tipo coalho das cabras que receberam diferentes níveis de glicerina bruta na dieta, sendo representadas pelas respectivas equações lineares, coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância.

7. DISCUSSÃO

7.1. Soro sanguíneo

As concentrações séricas de Cu, Fe, Zn e Mn não foram influenciadas negativamente pelos diferentes níveis de glicerina bruta na dieta das cabras (Tabela 7). A concentração média de Cu (0,95 mg/L), permaneceu dentro dos limites de normalidade citados por Underwood e Suttle (1998), ao qual para espécie em questão citam o valor equivalente a 0,96 mg/L; o mesmo em relação aos valores referenciados por Kaneko et al. (2008), que para ovinos designaram o intervalo de 0,58 – 1,6 mg/mL. Schweinzer et al. (2017) fazem referência de $0,8 \pm 0,2$ mg/L para a espécie caprina, utilizando o ICP-OES para determinação dos oligoelementos, e González e Silva (2017) reportam valores de 0,8 – 1,2 mg/L para ruminantes em geral.

Os teores de Fe no soro sanguíneo também não foram influenciados negativamente pelo acréscimo da glicerina na alimentação das cabras leiteiras nesse experimento, em que média geral obtida foi de 1,46 mg/L. Underwood e Suttle (1998) apresentaram valores entre 0,95 – 2,01 mg/L para espécie, enquanto que Schweinzer et al. (2017), faz referência de $1,89 \pm 0,42$ mg/L para caprinos, e Kaneko et al. (2008) citam intervalo entre 0,39 – 1,55 mg/L para a espécie bovina.

A média geral da concentração sérica de Zn foi de 1,47 mg/L, e este valor encontra-se concordante com referência feita por González et al. (2017), com intervalo entre 0,52 – 1,56 mg/L e acima do citado por Suttle (2010), que referencia 0,6 mg/L na espécie ovina, bem como que Schweinzer et al. (2017), os quais referenciam de $0,6 \pm 0,2$ mg/L, também para caprinos.

Já em relação à média geral da concentração sérica do Mn, foi observado valor de 0,02 mg/L. Para Gonzalez e Silva (2019), o Mn é único no sentido de que se absorve muito pouco, não mais de 1% no intestino, e tem níveis sanguíneos muito baixos (5 – 10 ng/mL ou 0,005 – 0,01 mg/L), referenciando este intervalo independentemente de espécies, raças e categorias animais. Já dado de Mn sérico referenciado por Schweinzer et al. (2017), é de $0,003 \pm 0,001$ mg/L para caprinos. Conforme González e Silva (2019), a concentração sanguínea de Mn não é considerado um bom indicador do status do mineral, uma vez que o teor de Mn é maior nas hemácias, tornando-se preferível medir o Mn no sangue total para avaliar o status do Mn em animais. A absorção ainda pode ser

diminuída por níveis elevados de cálcio e fósforo. Seu transporte no sangue é feito principalmente pela transferrina e sua distribuição é maior em ossos, fígado, rins e pâncreas (Suttle, 2010; González e Silva, 2019).

Segundo Suttle (2010), o Mn no sangue é mais alto no bezerro recém-nascido (23 – 28 $\mu\text{g/L}$) do que na mãe (15 – 17 $\mu\text{g/L}$). Segundo o mesmo autor, o Mn plasmático não reflete a ingestão de Mn em novilhos em dietas basais contendo 8 – 128 mg/kg da matéria seca (intervalo de médias 10 – 13,5 $\mu\text{g/L}$ ou 0,01 – 0,014 mg/L); considera, ainda, que níveis marginais para carência de Mn varia de 0,001 – 0,002 mg/L, em ovinos. A média observada neste estudo está coincidente com às médias encontradas no limite superior reportadas por Suttle (2010).

Questiona-se tais referências e resultados encontrados, uma vez que alguns dados para a espécie caprina, particularmente para cabra leiteiras, são inexistentes. Os dados aqui encontrados vêm tornar a glicerina bruta, utilizada neste estudo, como opção na alimentação de ruminantes, uma vez que as concentrações dos metais essenciais encontrados (Cu, Fe e Zn), além dos demais que se encontravam em concentrações abaixo dos limites de detecção pelo procedimento analítico, não estiveram em concentrações que pudessem reportar estado de atenção para o manejo nutricional de cabras leiteiras, que viessem a comprometer o metabolismo e conseqüente desenvolvimento de distúrbios nutricionais relacionados com metais essenciais e tóxicos.

Lage (2009) trabalhou com níveis crescentes (0 a 12%) de glicerina na dieta de ovelhas Santa Inês e concluíram que os quantificados Zn e Cu em músculo e fígado não possuíam capacidade tóxica, não comprometendo a seguridade do produto utilizado na dieta dos animais. Importante considerar esses dados que foram quantificados em fígado e músculos, uma vez que o fígado que é órgão estoque de metais (SUTTLE, 2010), como os que foram quantificados neste estudo, no soro sanguíneo, faculta a indicação deste tipo de produto na dieta de cabras leiteiras. Não foi possível encontrar dados relacionados a composição sérica de oligoelementos na literatura referente a caprinos com ingestão de glicerina bruta adicionado ao manejo alimentar.

7.2. Urina

As concentrações urinárias de Cu, Zn, Mn, Mo, Cr e Al não foram influenciadas negativamente pelos diferentes níveis de glicerina bruta na dieta das cabras (Tabela 9). As referências acerca da concentração de elementos traços na urina de caprinos são

escassas, uma vez que dados são encontrados quando se trata de macrominerais. Neste contexto, torna-se difícil a discussão dos resultados encontrados.

Foram obtidos, no presente estudo, valores médios gerais na urina de 0,06 mg/mL para Cu, de 0,43 mg/L para Zn, de 0,03 mg/L para Mn, de 0,2 mg/L para Mo, de 0,05 mg/L para Cr e de 1,95 mg/L para Al. Dados referenciados por Ahamad et al. (2017), os quais realizaram estudos de análise de elementos traços e metabolômica na urina de bovinos e camelos por urina liofilizada submetida a cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) e espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), encontraram concentrações de 0,02 mg/L para Cu, de 0,08 mg/L para Zn, de 0,01 mg/L para Mn, de 2,66 mg/L para Cr e de 0,29 mg/L para Al em bovinos; enquanto que não averiguaram o elemento Mo. Realizando contraste de dados com a espécie bovina, verifica-se que concentrações urinárias de Cu, Zn e Al foram maiores e a de Cr menor, com as referências de Ahamad et al. (2017).

Neto et al. (2016) citaram a importância da nutrição na alimentação de ruminantes sobre o funcionamento renal, é fundamental para otimizar a utilização de diferentes ingredientes em rações e obtenção de bons índices produtivos e manutenção da saúde animal; e que a urina contém ureia, aminoácidos, creatinina, ácidos orgânicos, amônia, toxinas e sais inorgânicos (NETO et al., 2016; AHAMAD et al., 2017).

Importante considerar a relação direta da concentração dos metais presentes na glicerina bruta, derivada do óleo de algodão utilizada nas dietas dos animais (Tabela 6), com a caracterização química dos metais na urina (Tabela 9), em que estes metais foram excretados nas respectivas concentrações detectadas. Os animais deste experimento tiveram ingestão adequada de água, não tendo registro de redução de volume de água ofertada. Conforme Langhans et al. (1995) a ingestão de água pelos animais, quando em níveis satisfatório, é indispensável para o processo de digestão dos alimentos recebidos, pela absorção e eliminação de diferentes moléculas orgânicas e inorgânicas. Neste contexto, a adequada ingestão de água foi essencial para a excreção destes metais (Cu, Zn, Mn, Mo, Cr e Al), os quais estiveram em níveis detectáveis pelo procedimento analítico por ICP-OES. Os metais que estiveram em concentrações abaixo do limite de detecção na urina das cabras tornam, indiscutivelmente, como valores de referência, nas condições do presente experimento, ou seja, com a glicerina bruta derivada do óleo de algodão.

Como os rins exercem múltiplas funções que podem ser didaticamente caracterizadas como filtração, reabsorção, homeostase, funções endocrinológica e

metabólica (SODRÉ et al., 2007), mais estudos são necessários para melhor compreender a ação da glicerina, obtidas de diferentes fontes, no metabolismo renal de cabras leiteiras.

Também não foi possível encontrar dados relacionados a determinação de oligoelementos na urina em literatura referente a caprinos com ingestão de glicerina bruta adicionado ao manejo alimentar.

7.3. Leite de cabra

As concentrações de Cu, Zn e Mn no leite de cabras foram aquelas detectáveis na análise por ICP-OES e não foram influenciadas negativamente pelos diferentes níveis de glicerina bruta na dieta (Tabela 10).

A concentração média geral de Cu foi de 0,13 mg/L, de Zn foi de 2,47 mg/L e de Mn foi de 0,12 mg/L. Os dados aqui registrados encontram-se possíveis de serem comparados com alguns trabalhos realizados. A concentração de Cu obtido nesse estudo foi semelhante ao resultado registrado por Akinsoyinu et al. (1979), os quais encontraram concentração de 0,28 mg/L no leite de cabras. Baquero et al. (2011) obtiveram valor médio de 0,10 mg/L em leite em pó caprino desnatado pelo método de espectroscopia do infravermelho próximo. Já Al-Awadi e Srikumar (2001), obtiveram valor médio de 0,27 mg/L de Cu analisado por espectrometria de absorção atômica em leite bovino.

O valor médio do Zn lácteo foi semelhante ao encontrado em leite de ovelhas *in natura* (2,76 mg/L) e leite caprino integral UHT (3,22 mg/L) determinados por espectrofotômetro de absorção atômica em forno grafite (GFAAS) citados por Bossu (2009); Suttle (2010) reporta valor de 5,5 mg/L em leite de cabra; Moniello et al. (2005) determinaram intervalo de 2 – 3 mg/L para o Zn em leite de ovelhas. Com os dados apresentados verifica-se que a dieta contendo glicerina bruta proporcionou efetivo metabolismo do Zn no organismo das cabras, uma vez que as concentrações encontradas em todos os níveis estabelecidos (0 – 15%) estiveram semelhantes dos autores acima citados.

Quanto ao Mn, o valor médio geral está acima do descrito por Akinsoyinu et al. (1979) em leite de cabras (0,05 mg/L) e por Al-Awadi e Srikumar (2001) em leite de vacas (0,03 mg/L). Pereira Júnior et al. (2009) encontraram média de 0,14 mg/L em leite de búfalas criadas no estado do Pará digeridas com HNO₃ e H₂O₂ em bloco digestor e quantificadas por espectrômetro de absorção atômica com chama. De acordo com Suttle

(2010), esse oligoelemento se apresenta de maneira menos abundante no leite independente da espécie (com exceção do colostro) geralmente não ultrapassando o valor de 0,1 mg/L devido a influências fisiológicas, o que corrobora com o encontrado nesse estudo.

Considerando que o leite é um alimento muito importante para a nutrição animal e humana, faz-se relevante identificar seus limites máximos permitidos por agências reguladoras, para que os metais não sejam fatores de risco para a saúde de quem consome o leite. Com base nos metais quantificados e aqueles que estiveram abaixo dos limites de detecção, verifica-se que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) faz referência da concentração de Cu em leite fluído pronto para o consumo em 2 mg/L, de modo que a concentração de Cu encontrada está bem abaixo deste valor referenciado. Para os metais Zn e Mn, a ANVISA não faz registro de limite máximo a ser considerado para esses metais no leite, independentemente de sua origem.

A ANVISA estabelece normas e padrões sobre limites de contaminantes. Os metais tóxicos arsênio (As), Cd, Pb e estanho (Sn) em leite são os que tem seus limites máximos tolerados referenciados, além de resíduos tóxicos, desinfetantes, e outras substâncias que envolvam risco à saúde. Os limites máximos permitidos para Pb em leite fluído e produtos lácteos é de 0,02 mg/L; e para o Cd, o valor é de 0,05 mg/L. Neste estudo, as concentrações de Pb (< 0,086) e Cd (< 0,010), dois metais tóxicos importantes estiveram abaixo dos das concentrações preconizadas pela ANVISA (2013), o que torna possível discutir que a presença da glicerina bruta não facultou disponibilidade em concentrações não recomendadas, tornando o produto recomendável como produto que possa fazer parte da dieta de cabras em lactação, sem promover risco à saúde animal e humana.

Conforme discutido por Flynn (1992), a presença de elementos metálicos nos alimentos varia amplamente em função de numerosos fatores associados a condições ambientais, práticas tecnológicas e uso indiscriminado de produtos químicos em tratos culturais e na produção animal, e tem provocado o aparecimento de elementos químicos em alimentos, a exemplo do Pb e Cd. Segundo Murta (1993) amostras com teores de Cd a partir de 0,0174 mg/L devem ser consideradas contaminadas, pois o elemento tem caráter acumulativo, estando os dados obtidos em cabras leiteiras suplementadas com glicerina bruta com concentrações que apresenta margem de segurança e dentro das normativas nacionais. Neste contexto, torna o presente estudo o primeiro a identificar a presença desses metais no leite integral cru oriundo de cabras leiteiras em Pernambuco.

Dois estudos importantes que foram realizados por Gonçalves et al. (2008) e por Mota (2009) com leite de vacas, sendo um em Goiás e outro em Pernambuco, apresentaram resultados de metais que igualmente foram quantificados neste experimento; de modo que torna possível discutir os dados obtidos com os de cabra. Gonçalves et al. (2008) realizaram estudo para avaliar metais pesados em leite integral bovino pasteurizado do Estado de Goiás e encontraram médias, das cinco mesorregiões, de Cu (0,49 mg/L), Zn (3,73 mg/L), e Fe (0,96 mg/L), Cd (0,05 mg/L) e Pb (0,24 mg/L) em leite integral pasteurizado de bovinos. Concluíram que, em vista os resultados médios obtidos no presente estudo, que o leite analisado foi considerado uma fonte pobre em Zn, Cu e Fe.

Mota (2009) estudou fatores de risco para concentração de metais em leite de vacas criadas do Agreste de Pernambuco e identificou média geral da concentração de Pb no leite cru das vacas leiteiras de $1,130 \pm 0,754$ mg/l. Quanto ao Cd, a concentração média geral foi de $0,001 \pm 0,004$ mg/l. As concentrações de Pb estiveram acima dos limites máximos permitidos em leite fluido e produtos lácteos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), que é de 0,02 mg/L. Já em relação ao Cd, o valor obtido estava abaixo do preconizado pela ANVISA (2013), que é de 0,05 mg/L. Teor de Cd em leite fluido encontrados na literatura foram os de Amodio et al. (1987), que obtiveram teores de 0,020 a 0,025 mg/L, utilizando também espectrofotometria de absorção atômica com chama.

Ainda são escassos os trabalhos contendo informações específicas sobre o leite de cabra (CATUNDA et al., 2016), particularmente em relação à concentração de elementos traços essenciais e metais pesados, pois ainda existem lacunas em relação a composição mineral, particularmente dos oligoelementos e metais pesados do leite de cabras, que venha a subsidiar discussão mais adequada a respeito de dados analíticos obtidos de leite em relação aos diferentes fatores de variabilidade que definem composições variadas no leite.

7.4. Queijo tipo coalho

As concentrações de Cu, Zn e Mn no queijo tipo coalho quantificados não foram influenciados pelos diferentes níveis de glicerina bruta na dieta (Tabela 11). A concentração média geral de Cu identificada no queijo foi de 0,63 mg/Kg, enquanto que a concentração de Zn foi de 22,30 mg/Kg e a de Mn foi de 0,45 mg/Kg.

A concentração de Cu encontrada foi superior aos valores obtidos por Kira e Maihara (2007), as quais verificaram as concentrações de Cr, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de quatro tipos de queijos (Mussarela, Minas, Prato e Parmesão) por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente após dissolução parcial (hidrólise com HCl). Encontraram diferentes concentrações de Cu em diferentes tipos de queijo, como média de $0,35 \pm 0,01$ mg/Kg em queijo tipo Mussarela, $0,27 \pm 0,05$ mg/Kg em queijo tipo Minas, $0,52 \pm 0,04$ mg/Kg em queijo tipo Prato e $0,29 \pm 0,03$ mg/Kg em queijo tipo Parmesão. Também superior aos valores obtidos por Baquero et al. (2011), os quais encontraram valor médio de Cu de $0,38 \pm 0,05$ mg/Kg em queijo coalho de cabras, porém inferior ao obtido por Yilmaz (2012), na Turquia, com valor médio de $12,0 \pm 4,0$ mg/Kg de Cu em queijo branco fresco utilizando o equipamento ICP-OES.

O valor médio encontrado de Zn no queijo tipo coalho foi de 22,30 mg/Kg, e este foi semelhante ao encontrado por Baquero et al. (2011) na mesma espécie, ao qual determinou o valor de 20,25 mg/Kg (média de produção artesanal e comercial). Yilmaz (2012) obtiveram valor médio de Zn na concentração de $14,0 \pm 4,0$ mg/Kg, sendo este inferior aos encontrados neste estudo, porém inferior ao obtido por Oliveira (2017), que encontrou em queijo coalho caprino a concentração de 29,1 mg/Kg de Zn submetido a digestão por via seca com ácido clorídrico (HCl) e quantificado por ICP-OES. Já Kira e Maihara (2007) encontraram concentrações de Zn com média de $36,9 \pm 1,1$ mg/Kg em queijo tipo Mussarela, de $7,52 \pm 0,76$ mg/Kg em queijo tipo Minas, de $33,2 \pm 2,1$ mg/Kg em queijo tipo Prato e de $49,6 \pm 1,8$ mg/Kg em queijo tipo Parmesão. Em variados queijos tipo coalho da espécie ovina, Borys et al. (2006) quantificaram por ICP-OES Zn na ordem de 18,77 mg/Kg. Por ser rico em peptídeos bioativos que por sua vez são carreadores de zinco, o queijo de coalho possui alta concentração desse oligoelemento, o que justifica o alto teor de Zn nos queijos (SILVA et al., 2012).

A concentração média de Mn encontrado no queijo de coalho no referido experimento foi de 0,45 mg/Kg. Tal valor foi superior ao relatado por Martin-Hernandez e Juarez (1989), ao qual determinou uma média equivalente a 0,20 mg/L (variados tipos de queijo caprino). Já Kira e Maihara (2007) encontraram concentrações de Mn com média de $0,30 \pm 0,01$ mg/Kg em queijo tipo Mussarela, de $0,35 \pm 0,01$ mg/Kg em queijo tipo Minas, de $0,24 \pm 0,01$ mg/Kg em queijo tipo Prato e de $0,28 \pm 0,01$ mg/Kg em queijo tipo Parmesão. Oliveira (2017) registraram média de 0,30 mg/Kg em queijo coalho caprino. Levkov et al. (2017) avaliaram o conteúdo de oligoelementos em amostras de

queijos, digeridos em micro-ondas e determinados por ICP-OES, produzidos a partir de leite cru de ovelha e encontraram concentração de Mn de 0,12 – 0,70 mg/kg, concluindo que queijo com tal concentração é seguro para consumo. De acordo com Suttle (2010) os derivados lácteos acompanham a baixa concentração do leite, geralmente com concentrações inferiores a < 1 mg/L, reforçando o demonstrado.

Quanto aos metais que estiveram com valores abaixo do limite de detecção, é possível comparar com os dados de Borys et al. (2006). Estes autores verificaram que os valores de Fe e Cr estiveram igualmente baixos com os valores obtidos neste estudo, porém superiores às concentrações de Pb e Cd. Borys et al. (2006) identificaram Cd em queijo em concentração inferior a 0,0009 mg/Kg, com Pb na concentração inferior a 0,07 mg/Kg, Cr com média de 0,050 mg/Kg e Fe com 2,11 mg/Kg.

Verifica-se que existe uma variação na concentração de metais essenciais quando se faz contraste com os dados da literatura. Kira e Maihara (2007) reportaram que é extremamente difícil apresentar valores médios de nutrientes para queijos como um todo devido às diferenças nos processos de fabricação e padrões de identidade. Mesmo dentro de uma variedade de queijo, variações no tipo e composição de leite, processo, estação do ano e localidade podem levar a intensas flutuações na composição nutricional.

Desse modo, torna-se fundamental o desenvolvimento de metodologias que permitam verificar a composição mineral de queijo tipo coalho produzido por cabras leiteiras, em diferentes condições alimentares, recebendo ou não suplementação com glicerina bruta de diferentes origens, sob os pontos de vista nutricional e toxicológico.

Kira e Maihara (2007) também reportam que as variações encontradas nas concentrações de metais em queijo podem ser afetadas pelos diferentes conteúdos de gordura presentes na matriz; levando-se em consideração ao elemento Cu, este está ligado aos glóbulos de gordura. Pode-se supor uma relação entre o teor de gordura e a associação de um determinado elemento com a caseína, de forma mais intensa, dificultando a liberação do elemento da matriz, levando conseqüentemente a baixas recuperações nos procedimentos analíticos utilizados em rotina laboratorial para quantificação de metais.

A ingestão de dietas com diferentes níveis de glicerina, nas condições em que o presente experimento foi conduzido revelou condição metabólica satisfatória, sendo possível identificar pelas relações que foram registradas da concentração sérica de Cu no soro com o Cu urinário e lácteo (Figura 8); do Zn sérico com o Zn urinário e lácteo (Figura 9), em que relação linear positiva foi obtida do Cu sérico com o Cu urinário e do Zn sérico

com o Zn urinário; assim como a linearidade negativa do Cu sérico com o Cu lácteo e do Zn sérico com o Zn lácteo.

Quanto ao Mn, obteve-se linearidade positiva do Mn sérico com o Mn urinário e som o Mn lácteo, tendo este último, diferenciado da linearidade do Cu e Zn lácteos anteriormente citados (Figura 10).

Tal perfil é coerente com a dinâmica metabólica que ocorre após a absorção e utilização dos nutrientes em diferentes vias metabólicas (SUTTLE, 2010). Tais metais quando são absorvidos, parte deles são metabolizados e parte são excretados, como foi observado pelas relações positivas observadas dos metais no sangue e na urina, quando revelaram relação positiva. No caso da relação negativa que o Cu e o Zn tiveram com o leite, muito provavelmente ocorreu pela menor drenagem destes metais do sangue para o leite, por ter sido efetivamente utilizado e naturalmente excretado pela urina. Já em relação ao Mn, em que teve linearidade positiva com o leite, este metal pode ter tido uma maior permeabilidade para o leite, sem prejuízo às vias metabólicas existentes em que este metal precisaria ser utilizado. Conforme citou Suttle (2010), o Mn é um elemento traço que é absorvido muito pouco, não mais de 1% no intestino, e tem níveis sanguíneos muito baixos.

A inter-relação entre minerais no metabolismo animal é extremamente importante para a formação de estruturas no organismo e participação de reações bioquímicas, seja diretamente ou como componentes essenciais de sistemas enzimáticos (SUTTLE, 2010; GONZÁLEZ e SILVA, 2017). Deste modo, a absorção, utilização e excreção são mais homogêneas que outros elementos, o que pode justificar a dinâmica deste com o soro, urina e leite aqui identificados.

Com relação ao queijo, relação positiva foi observada do Cu para com o Zn (Figura 11) e Mn (Figura 12), respectivamente, assim como do Zn como o Mn (Figura 13). Black et al. (1985) investigaram os efeitos da acumulação e depleção de Mn nos tecidos e a interferência deste oligoelemento na disponibilidade de outros. O Mn aumentou a deposição de Zn no fígado e rins; aumentou a concentração do Cu no soro, fígado e rins, ficando comprovado a relação que existe entre estes metais.

8. CONCLUSÃO

A inclusão de 5 até 15% de glicerina bruta derivada do óleo de algodão, nas dietas de cabras leiteiras, em substituição parcial ao milho, não altera a concentração de metais em soro sanguíneo, urina, leite e queijo tipo coalho, pois as concentrações encontradas nas diferentes matrizes biológicas e no queijo tipo coalho não estabelece fator de risco para quadros de intoxicação, além de que a inclusão da glicerina bruta na dieta de cabras torna-se um fonte alternativa de energia da dieta para cabras leiteiras.

9. REFERÊNCIAS

ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOI, A.R.; CARMO, C.A.; EDUARDO, J.L.P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 260-258, 2008.

AHAMAD, S.R.; ALHAIDER, A.Q.; SHAKEEL, F. Metabolomic and elemental analysis of camel and bovine urine by GC-MS and ICP-MS. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 23-29, 2017.

AKINSOYINU, A.O.; TEWE, O.O.; MBA, A.U. Concentration of trace elements in milk of west african dwarf goats affected by state of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 6, 1979.

AL-AWADI, F.M.; SRIKUMAR, T.S. Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 463–469, 2001.

ALMEIDA, M.T.C.; EZEQUIEL, J.M.B.; PASCHOALOTO, J.R.; PEREZ, H.L.; CARVALHO, V.B.; CASTRO FILHO, E.S.; VAN CLEEF, E.H.C.B. Effects of high concentrations of crude glycerin in diets for feedlot lambs: feeding behaviour, growth performance, carcass and non-carcass traits. **Animal Production Science**, v. 58, n. 7, p. 1271-1278, 2017.

AMODIO; COCCHIERI, R.; FIORI, P. Lead and cádmium concentrations in livestock bred in Campania. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p. 460-464, 1987.

ANDRADE, G.P.; CARVALHO, F.F.R.; BATISTA, Â.M.V.; PESSOA, R.A.S.; COSTA, C.A.; CARDOSO, D.B.; MACIEL, M.V. Evaluation of crude glycerin as a partial substitute of corn grain in growing diets for lambs. **Small Ruminant Research**, v. 165, p. 41-47, 2018.

ANP. Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis** - Rio de Janeiro: ANP, 2019.

ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Resolução ANP n. 07, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008, 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0042_29_08_2013.pdf/c5a17d2d-a415-4330-90db-66b3f35d9fbd>.

BAQUERO, M.F.; ÁLVAREZ RÍOS, S.; RODRÍGUEZ, E.R.; ROMERO, C.D.; MARTÍN, J. D. Influence of diet and rennet on the composition of goats' milk and cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 2, p. 250–256, 2011.

BATISTA, N.L.; SOUZA, B.B. Caprinovinocultura no semiárido brasileiro - fatores limitantes e ações de mitigação. **ACSA – Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 01-09, 2015.

BENEDETI, P.D.B.; SILVA, G.L.; PAULA, E.M.P.; SHENKORU, T.; MARCONDES, M.I.; MONTEIRO, H.F.; AMORATI, B.; YEH, Y.; POULSON, S.R.; FACIOLA1, A.P. Effects of partial replacement of corn with glycerin on ruminal fermentation in a dual-flow continuous culture system. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1-13, 2015.

BESERRA, V.A.; CESAR, A.S.; PERES, A.A.C. Adoção da glicerina bruta na dieta animal e seu impacto no produto final. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 250, p. 259-266, 2016.

BLACK, K.A.; EELLS, J.T.; NOKER, P.E.; HAWTREY, C.A. Role of hepatic tetrahydrofolate in species difference in metanol toxicity. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, v. 82, n. 11, p. 35-54, 1985.

BORYS, M.; PAKULSKI, T.; BORYS, B.; PAKULSKA, E.; WĘGRZYN, E. The content and retention of some major and trace minerals in sheep's milk and cheese. **Archiv fur Tierzucht-archives of Animal**, v. 49, p. 263-267, 2006.

BOSSU, C.M. **Fracionamento de zinco nas amostras de leite**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2009.

BOUTAKHRIT, K.; CLAUS, R.; BOLLE, F.; DEGROODT, J.M.; GOEYENS, L. Open digestion under reflux for the determination of total arsenic in seafood by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with hydride generation. **Talanta**, v. 66, p. 1042-1047, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa; queijo coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2001.

BUTCHER, D.J. Advances in inductively coupled plasma optical emission spectrometry for environmental analysis. **Instrumentation Science and Technology**, v. 38, p. 458-469, 2010.

CAIXETA, M.R. **Aplicação de glicerina bruta residual da produção de biodiesel em agroecossistemas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal De Alfenas. Alfenas – MG, 2014.

CASALI, A.O., DETMANN, E., VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335-342, 2008.

CASELANI, K. Resíduos de agrotóxicos e metais pesados na nutrição de bovinos. **Veterinária em Foco**, v. 12, n. 2, 2015.

CASTRO, J.T. **Estratégias analíticas para determinação de metais e ametais em amostras de café por espectrometria atômica**. 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia.

CATUNDA, K.L.M.; AGUIAR, E.M.; SILVA, J.G.M.; RANGEL, A.H.N. Leite caprino: características nutricionais, organolépticas e importância do consumo. **Revista Centauro**, v. 7, n. 1, p. 34 - 55, 2016.

CHANJULA, P.; PAKDEECHANUAN, P.; WATTANASIT, S. Effects of Dietary Crude Glycerin Supplementation on Nutrient Digestibility, Ruminal Fermentation, Blood Metabolites, and Nitrogen Balance of Goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 27, n. 3, p. 365–374, 2014.

CHAVES, E.S. **Desenvolvimento de métodos para análise inorgânica de biodiesel, matérias-primas e co-produtos utilizando espectrometria atômica**. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal De Santa Catarina.

CHAVES, E.S.; SANTOS, E.J.; ARAUJO, R.G.O.; OLIVEIRA, J.V.; FRESCURA, V.L.A.; CURTIUS, A.J. Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES e ICPMS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 71–76, 2010.

CHYE, S.J.; AHMAD, R.; NOOR AZIAH, A.A. Studies on the physicochemical and sensory characteristics of goats's milk dadih incorporated with tropical-fruit purees. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1387-1392, 2012.

CLASEN, C.D.; LISBOA, M.T.; PINTO, A.M.T.P.; RIBEIRO, A.S.; VIEIRA, A.M. Avaliação de métodos de solubilização para determinação de metais em glicerina proveniente da produção de biodiesel por técnicas de espectrometria atômica. **Química nova**, v. xy, n. 00, p. 1-8, 2014.

DALMASO, A.C., FERREIRA, V.B.; MOUSQUER, C.J.; CASTRO, W.J.R.; SILVA FILHO, A.S.S.; SIMIONI, T.A.; HOFFMANN, A.; FERNANDES, G.A. Glicerina bruta de biodiesel na alimentação de ruminantes. **PUBVET**, v. 8, n. 12, 2014.

DASARI, M.A.P.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.P. Low pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n. 1-2, p. 225-231, 2005.

DETMANN, E., SOUZA, M.A., VALADARES FILHO, S.C., QUEIROZ, A.C., BERCHIELLI, T.T., SALIBA, E.O.S., CABRAL, L.S., PINA, D.S., LADEIRA, M.M., AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal, INCT. Viçosa, MG: Suprema. p. 214, 2012.

DONKIN, S. S.; KOSER, S. L.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; CECAVA, M. J. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5111-5119, 2009.

DUQUE, A.C.A.; LOPES, F.C.F.; OLIVEIRA, J.S.; MORENZ, M.J.F.; REIS, L.G.; SILVA, J.S.; BORGES, A.L.C.C.; SILVA, R.R. Glicerina em substituição ao milho no concentrado de vacas em lactação. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 60-66, 2018.

EMBRAPA. Panorama da ovinocultura e da caprinocultura a partir do Censo Agropecuário 2017. **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**, n. 7, dezembro 2018.

FEIJÓ, F.C. **Glicerina Bruta na Alimentação de Vacas Leiteiras**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal De Mato Grosso.

FELICIANO FILHO, W.; PEREIRA JUNIOR, J. Introdução ao biodiesel. **Informativo CRQ-IV**, v. 84, n. 4, p. 14-15. 2007.

FLYNN, A. Minerals and trace elements in milk. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 36, p. 209-252, 1992.

GIOTTO, F.M.; OSMARI, M.P.; SALAB, B.L.; MATOS, L.F.; DÍAZ, T.G. Subproduto do biodiesel na alimentação de ruminantes: o caso da glicerina. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, Umuarama**, v. 18, n. 4, p. 253-257, 2015.

GOMES, A.C.S.; LINDINO, C.A.; GONÇALVES JÚNIOR, A.C.; GOMES, G.D. Determinação de Cd, Cr e Pb no leite e na alimentação bovina do Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 3, p. 211-218, 2013.

GONÇALVES, J.R.; MESQUITA, A.J.; GONÇALVES, R.M. Determinação de metais pesados em leite integral bovino pasteurizado no estado de goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 365-374, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução a bioquímica veterinária**. 3ª ed. Porto Alegre-RS: UFRGS Editora, 2017.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Minerais e vitaminas no metabolismo animal**. 1ª ed. Porto Alegre-RS: LacVet, 2019.

GOUVEIA, S.T.; SILVA, F.V.; COSTA, L.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, n. 2, p. 269–275, 2001.

GUINÉ, M.F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente**. 1ª ed. Piracicaba-SP: CPG/CENA, 1998.

HARRIS, D.C. **Quantitative chemical analysis**. 6ªed. New York: WH Freeman, 2003.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de análise instrumental**. 6ªed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

IBGE. Produção da pecuária municipal 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, v. 45, p.1-8, 2017.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6ed. Estados Unidos: Academic Press, 2008.

KHATTAB, M.S.A.; EL-NOR, S.A. **Glycerol a bio diesel by-product as feed-stuff for ruminant animals**. 1ed. Mauritius: Lambert Academic Publishing, 2019.

KIRA, C.S.; MAIHARA, V.A. Determinação de elementos essenciais maiores e traço em queijos por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido após digestão parcial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 446-450, 2007.

KREHBIEL, C.R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 86, suplemento, p. 392, 2008.

KRUG, F.J.; ROCHA, F.R.P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2ª ed. São Paulo: EditSBQ, 2019.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M.; AMARASIRIWARADENA, C.J.; FONER, H.; MARTINES, L. Determination of the residual carbon content by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after decomposition of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, n. 6, 1992, p. 845-850, 1992.

LAGE, J.F. **Glicerina bruta oriunda da agroindústria do biodiesel na alimentação de cordeiros em terminação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2009.

LAGE, J.F., PAULINO, P.V., PEREIRA, L.G.R., VALADARES, F S.C., DE OLIVEIRA, A.S., DETMANN, E., SOUZA, N.K.P., LIMA, J.C.M., Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 45, p. 1012–1020, 2010.

LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; PEREIRA, L.G.R.; DUARTE, M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; SOUZA, K.P.; LIMA, J.C.M. Carcass characteristics of

feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p.108-113, 2014.

LAMMERS, P.J.; KERR, B.J; HONEYMAN, M.S.; STALDER, K.; DOZIER, W.A.; WEBER, T.E.; KIDD, M.T.; BREGENDAHL, K. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Poultry Science**, v. 87, p. 104-107, 2008.

LANGHANS, W. R. ROSSI, AND E. SCHARRER. 1995. Relationships between feed and water intake in ruminants. Pages 199–216 in **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction**, W. v. Englehardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves, D. Geisecke, ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany. 626p.

LEÃO, J.P., RAMOS, A.T., MARUO, V.M., SOUZA, D.P.M., NEIVA, J.N.M., RESTLE, J. E MORON, S.E. Anatomopatologia de amostras de bovinos alimentados com glicerol. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 42, p. 1253-1256, 2012.

LEE, J.D.; Química inorgânica não tão concisa. 5ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

LEVKOV, V.; TRAJCE STAFILOV, T.; PACINOVSKI, N.; ANDONOVSKA, K.B.; MATEVA, N.; GJORGOVSKA, N.; EFTIMOVA, E.; KOSTADINOV, T. The content of macro and trace elements in curd and traditional white brined cheese. **VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA**, v. 75, n. 97, p. 36-42, 2017.

LIMA, T.L.S.; ALVES, R.N.; CAVALCANTI, M.T.; ROCHA, T.C.; GONÇALVES, M.C. Padronização do processamento de queijo Coalho caprino condimentado com cumaru produzido por agroindústria na Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 3, p. 562-567, 2017.

LISBOA, M.T.; CLASEN, C.D.; VELLAR, D.C.S.; ORESTE, E.Q.; SAINT'PIERRE, T.A.; RIBEIRO, A.S.; VIEIRA, M.A. An easy and fast procedure for the determination of Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Na, K and Si in biodiesel by ICP OES using emulsification as

sample preparation strategy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 143-151, 2014.

LUKAS, M. Comparison of spectrometric techniques for the analysis of liquid gas turbine fuels. **Journal of Engineering for Gas Turbines and Power**, v. 115, p. 620-627, 1993.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 632-638, 2009.

MARTIN-HERNANDEZ, M. C.; JUAREZ, M. Retention of Main and Trace Elements in Four Types of Goat Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1092-1097, 1989.

MARCOLINO, G.V. **Detecção de metais pesados em leite integral cru de vacas criadas no agreste meridional do estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns-PE, 2014.

MENESES, M.A. **Glicerina loira em dietas para vacas lactantes confinadas**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia, Bahia. 2017.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of Aoac International**, v. 85, p. 1217–1240, 2002.

Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Agenda de inovação para a cadeia produtiva do biodiesel**. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Oleaginosas e Biodiesel (CSOB), Brasília – DF, 2019.

Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa Nº 42, de 16 de dezembro de 2010**, 2010.

Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa Nº - 38, de 27 de outubro de 2015**, 2015.

MONIELLO, G.; INFASCELLI, F.; PINNA, W.; CAMBONI, G. Mineral requirements of dairy sheep. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 63-74, 2005.

MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D.W. **Inductively coupled plasma in analytical atomic spectroscopy**. 1ªed. New York: VCM Publisher, 1992.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V. L.C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639- 648, 2009

MURTA, P. H. G. A influência da poluição ambiental sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 7, 12-14 p. 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids**. 6th ed. Washington, DC: National Academy Press, 2007.

NETO, J.P.; SOARES P.C.; BATISA, A.M.V.; ANDRADE, S.F.J.; ANDRADE, R.P.X.; LUCENA, R.B.; GUIM, A. Water balance and renal excretion of metabolites in sheep fed forage cactus (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 322-328, 2016.

OLIVEIRA, T.B. **Caracterização físico-química, de minerais e atendimento à legislação de queijos produzidos e comercializados no estado da Paraíba, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal da Bahia – BA, 2017.

OLIVEIRA, E.N.A.; SANTOS, D.C.; ALMEIDA, F.L.C.; FEITOSA, B.F.; FEITOSA, R.M. Caracterização de queijos artesanais comercializados em municípios do Ceará. **E-xacta**, v. 11, n. 2, p. 55-62, 2018.

PAIVA, P.G.; RENNÓ, F.P.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; SANTOS, F.C.R.; COSTA, A.G.B.V.B.; CABRAL, G.F.; ALMEIDA, G.F. Glicerina na alimentação de bovinos. **Science and animal health**, v. 3, n. 1, p. 31-55, 2015.

PEIXOTO, R.M.; ARAÚJO, R.M.P.; PEIXOTO, J.S.; ROCHA, W.S.; AQUINO DE SÁ, M.C.; DA COSTA, M.M. Composição do leite de cabras Saanen infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus* e submetidas a dois protocolos de tratamento. **Ciência animal brasileira**, v. 17, n. 3, p. 449-458, 2016.

PEREIRA JÚNIOR, J.B.; FERNANDES, K.G.; MÜLLER, R.C.S. Determinação direta de Ca, Mg, Mn E Zn em amostras de leite de búfala da ilha de marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2333-2335, 2009.

RAMOS, L.P.; SILVA, F.R.; MANGRICH, A.S.; CORDEIRO, C.S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RODRIGUES, F.V.; RONDINA, D. Alternativas de uso de subprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de ruminantes: glicerina bruta. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2013.

ROHENKOHL, J.E.; CORRÊA, G.F.; AZAMBUJA, D.F.; FERREIRA, F.R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

SAMPAIO, B.; SAMPAIO, Y.; LIMA, R.C.; AIRES, A.; SAMPAIO, G. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas. **Revista de Economia**, v. 35, n. 2, p. 137-159, 2009.

SANTANA, E.O.C.; JÚNIOR, H.A.S.; OLIVEIRA, Z.F.; FERREIRA, A.H.C.; MACIEL, M.S.; CARVALHO, M.E.L.; FIGUEIREDO, C.B.; SANTOS, M.S. Utilização da glicerina na dieta de vacas lactantes em pastagens. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 12, n. 1, p. 3857– 3878, 2015.

SCHWEINZER, V.; IWERSEN, M.; DRILLICH, M.; WITTEK, T.; TICHY, A.; MUELLER, A.; KRAMETTER-FROETSCHER, R. Macromineral and trace element supply in sheep and goats in Austria. **Veterinarni Medicina**, v. 62, n. 2, p. 62–73, 2017.

SHIN, J.H.; WANG, D.; KIM, S.C.; ADESOGAN, A.T., STAPLES, C.R. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed corn silage- or cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, 2012.

SILVA, T.M.; OLIVEIRA, R.L.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, N.G., DE PELLEGRINI, C.B.; TRAJANO, J.S., ROCHA, T.C.; BORJA, M.S. Ingestive behavior and physiological parameters of goats fed diets containing peanut cake from biodiesel. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 1, p. 59-66, 2015.

R.A. SILVA; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, p. 1533–1538, 2012.

SKRZYDLEWSKA, E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 13, p. 277-293, 2003.

SNEDDON, J.; VINCENT, M.D. ICP-OES and ICP-MS for the determination of metals: application to oysters. **Analytical Letters**, v. 41, p. 1291-1303, 2008.

SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J., FOX, D.G., RUSSEL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

SODRÉ, F.J.; COSTA, J.C.B; LIMA, J.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOUZA, M.V.; VIANNA, M.W.S.; SOUZA, M.W.; ZANDIM, B.M.; FERNANDES, R.B.A.; FONTES, M.P.F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1774-1781, 2009.

SUTTLE, N.F. **Mineral Nutrition of Livestock**. 4^a ed. Pondicherry: Mixed Sources, 2010.

TEIXEIRA, I.A.M.; GOMES, R.A.; CASTAGNINO, D.S.; FIGUEIREDO, F.O.M.; HÄRTER, C.J.; BIAGIOLI, B.; SILVA, S.P.; RIVERA, A.R. Inovações tecnológicas na caprinocultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, n. 1, p. 104-120, 2013.

THOH, D.; PAKDEECHANUAN, P.; CHANJULA, P. Effect of supplementary glycerin on milk composition and heat stability in dairy goats. **Asian-Australian Journal Animal of Science**, v. 30, n. 12, p. 1711-1717, 2017.

TREVIZAN, L.C.; NÓBREGA, J.A.; Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: na overview of applications. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 18, n. 4, p. 678-690, 2007.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3ed. Nova York: CBA Publishing, 1998.

VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacterium for remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 327-338, 2002.

VAN CLEEF, E.H.C.B. **Glicerina bruta em dietas para bovinos da raça nelore confinados**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2012.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VESCHI, J.L.A.; CAVALCANTE, M.B.; LIMA, W.E.; DA COSTA, S.M.M. Caracterização de Propriedades de Criação de Caprinos Leiteiros Localizadas em Petrolina, PE e Santa Maria da Boa Vista, PE. **Embrapa Semiárido Petrolina**, 2016.

YILMAZ, D.D. Effect of Feeding Habits of Cows on Trace Element Contents of Some Dairy Products. **Karaelmas Science and Engineering Journal**, v. 2, n.2, p. 13-17, 2012.

10. ANEXOS

10.1 Licença do Comitê de Uso nos Animais – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Universidade Federal Rural de Pernambuco

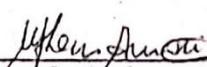
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	059/2016
Número do processo	23082.006973/2016
Data de emissão da licença	06 de Junho de 2016
Título do Projeto	Glicerna bruta na dieta de pequenos ruminantes em confinamento.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Francisco Fernando Ramos de Carvalho
Colaboradores	Antonia Sherlânea Chaves Vêras; Marcelo de Andrade Ferreira; Wilson Moreira Dutra Júnior; Maria Luciana Menezes Wanderley Neves; Lígia Maria Gomes Barreto.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Caprino; 20 (machos) e 24 (fêmeas) Ovino; 40 (machos) total 104 animais.


Prof.ª Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.ª Dra. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

10.2 Redação dada pela Resolução ANP n° 4, de 2.2.2010 – DOU 3.2.2010

Especificação do Biodiesel

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS

RESOLUÇÃO ANP Nº 4, DE 2.2.2010 - DOU 3.2.2010 - RETIFICADA DOU 22.2.2010

Revogada pela Resolução ANP nº 27, de 8.5.2014 - DOU 9.5.2014 - Efeitos a partir de 9.5.2014.

O DIRETOR-GERAL da AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP, no uso de suas atribuições, considerando o disposto no inciso I, art. 8º da Lei nº 9.478, de 06 de agosto de 1997, alterada pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 e com base na Resolução de Diretoria nº 70, de 2 de fevereiro de 2010,

Considerando o disposto no art. 1º da Resolução CNPE nº 06, de 16 de setembro de 2009, que estabelece em 5 (cinco) por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel, a partir de 1º de janeiro de 2010,

"Tabela I: Especificação do Biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20º C	kg/m³	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40ºC	Mm²/s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	ºC	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono (4)	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	-	5453	- EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538

Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (7)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	- EN 14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 15771	6584 (8)	- EN 14105 (8) EN 14106 (8)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584 (8)	- EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (5)	% massa	Anotar	15342 15344	6584 (8)	- EN 14105 (8)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (5)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (8)

Nota:

- (1) Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.
- (2) O limite indicado deve ser atendido na certificação do biodiesel pelo produtor ou importador.
- (3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.
- (4) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.
- (5) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.
- (6) Poderá ser utilizado como método alternativo o método ASTM D6890 para número de cetano.
- (7) O limite máximo de 19°C é válido para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas. Os métodos de análise indicados não podem ser empregados para biodiesel oriundo apenas de mamona.
- (8) Os métodos referenciados demandam validação para as matérias-primas não previstas no método e rota de produção etílica."

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação no Diário Oficial da União.

HAROLDO BORGES RODRIGUES LIMA