



Protocolo de administração de fluoresceína sódica para visualização de deposição de urina de bovinos em pastagens

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 113

Protocolo de administração de fluoresceína sódica para visualização de deposição de urina de bovinos em pastagens

**Patrícia Perondi Anção Oliveira
Editor Técnico**

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2014

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234
13560 970, São Carlos, SP
Caixa Postal 339
Fone: (16) 3411- 5600
Fax: (16): 3361-5754
Home page: www.cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alexandre Berndt
Secretária-Executiva: Simone Cristina Méo Niciura
Membros: Ane Lisy F.G. Silvestre, Maria Cristina Campanelli Brito,
Milena Ambrosio Telles, Sônia Borges de Alencar

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar
Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito
Foto(s) da capa: Teresa Cristina Alves

1ª edição

1ª edição on-line (2014)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Oliveira, Patrícia Perondi Anchão

Protocolo de administração de fluoresceína sódica para visualização de deposição de urina de bovinos em pastagens. — [Recurso eletrônico] /Patrícia Perondi Anchão Oliveira — Dados eletrônicos. — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2014.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: Word Wide Web: <<http://www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/publicacao/Documentos113.pdf>>

Título da página na Web (acesso em 15 de abril de 2014).

22 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 113; ISSN: 1980-6841).

1. Gado de corte - Comportamento animal - Protocolo de administração - Fluoresceína sódica - Solo - Pastagem. I. Patrícia Perondi Anchão Oliveira. VI. Título. VII. Série.

CDD: 591.5

© Embrapa 2014

Autores

Marcos Rafael Gusmão

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,
marcos.gusmao@embrapa.br

Teresa Cristina Alves

Médica Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,
teresa.alves@embrapa.br

Amanda Prudêncio Lemes

Médica Veterinária, mestre em Ciência Animal e Pastagem, bolsista DTI-B CNPq da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlo, SP,
amanda-lemes@hotmail.com

Giovana Maranhão Bettiol

Geógrafa, especialista em Geoprocessamento, Analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,
giovana.bettiol@embrapa.br

André de Faria Pedroso

Engenheiro Agrônomo, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,
andre.pedroso@embrapa.br

Patrícia Perondi Anchão Oliveira

Engenheira Agrônoma, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,
patricia.anchao-oliveira@embrapa.br

Sumário

Introdução	9
Metodologia	11
Resultados e discussão	15
Conclusões	21
Referências	21

Apresentação

O aumento dos Gases de Efeito Estufa – GEE – e o conseqüente aquecimento global têm causado preocupação à sociedade em geral, que cobra ações governamentais e dos setores produtivos nacionais, dentre eles, da pecuária. O Brasil ocupa posição de destaque internacional na produção pecuária e exportação de carne e assumiu compromissos voluntários de redução das emissões de GEE, refletindo os anseios da sociedade brasileira.

O Brasil tem aumentado consistentemente a produção de produtos de origem animal. Nos últimos anos, o aumento na produção foi obtido através do aumento da eficiência no manejo dos sistemas de produção, sem aumento nas áreas de pastagens, com a recuperação de pastagens, a melhoria dos índices zootécnicos e a adoção de sistemas integrados e de boas práticas agropecuárias. Para que essas técnicas possam fazer parte das políticas governamentais para o setor, é preciso determinar o nível das emissões dos sistemas tradicionais e o potencial de mitigação (redução de emissões e remoção de GEE da atmosfera) dos sistemas “melhorados”, em âmbito nacional.

Nesse contexto, a rede de pesquisa “Pecuária Sustentável - PECUS” foi concebida para produzir as informações necessárias, de forma imparcial e utilizando métodos padronizados internacionalmente, com vistas a dar suporte ao governo brasileiro na elaboração de políticas e negociações internacionais.

Para tal finalidade, a rede de pesquisa PECUS criou um comitê técnico, composto por vários subcomitês de especialistas, encarregados de gerar protocolos de pesquisa, de forma a garantir a obtenção de resultados válidos, comparáveis e reportáveis da produção dos componentes produtivos e da vegetação natural, dos fluxos de emissão de GEE e do sequestro de carbono, por meio da padronização e sistematização dos métodos de avaliação nos diferentes sistemas de produção localizados nos principais Biomas brasileiros. É nesse contexto que o presente protocolo é apresentado, de forma a subsidiar com metodologia para a visualização de urina de bovinos em sistemas de produção.

Protocolo de administração fluoresceína sódica para visualização de deposição de urina de bovinos em pastagens

Marcos Rafael Gusmão

Teresa Cristina Alves

Amanda Prudêncio Lemes

Giovana Maranhão Bettiol

André de Faria Pedroso

Patrícia Perondi Anção Oliveira

Introdução

A visualização dos locais de deposição de urina bovina em áreas de pastagens é de grande importância nos estudos de reposição de nutrientes no solo (MOIR et al., 2011) e dinâmica de gases de efeito estufa nesses ambientes (OENEMA et al., 1997; WILLIAMS et al., 1999). Estima-se que são produzidos 1.000 kg de nitrogênio (N) por hectare, através da urina de bovino leiteiro. Sendo que entre 300 a 700 kg/ha/ano de N provindo da urina são assimilados pela pastagem. O excesso de N não assimilado pelas plantas permanece, após nitrificação, na forma de nitrato (NO_3^-), e representa a principal fonte de perda de nitrogênio em pastagens. A desnitrificação de NO_3^- , através de agentes redutores químicos e biológicos no solo, produz espécies de nitrogênio sob forma de gás, dentre as quais o óxido nítrico N_2O , considerado importante gás de efeito estufa.

A observação direta do comportamento de micção dos bovinos e a visualização direta da área coberta pela urina é o método mais preciso para determinação dos locais de deposição de urina. Porém, esse método apresenta limitações como a dificuldade em identificar a área coberta por urina após cada micção e a interferência da presença do observador no comportamento de micção do animal; além de exigir

muito esforço. Em função dessas limitações, métodos indiretos são empregados, tais como a equivalência entre os números de defecações e micções e a estimativa da área de cobertura da micção em duas vezes a área coberta pela defecação (FERREIRA et al., 2004; HAYNES e WILLIAMS, 1993). Outro método indireto refere-se à observação do crescimento e do padrão de coloração das plantas na pastagem, sendo estimados como locais de deposição de urina aqueles que apresentam plantas de maior porte e coloração verde-intensa (MOIR et al. 2011; DAY e DETKING, 1990). Entretanto, em sistemas baseados em pastagens manejadas intensivamente, nos quais doses elevadas de fertilizantes nitrogenados são aplicadas, tal método seria pouco profícuo. Dessa forma, o presente documento propõe a administração de um marcador interno que possibilite não só a visualização, mas também o dimensionamento da deposição de urina em ambientes naturais, como a pastagem. Essa metodologia aumentaria a acurácia nos estudos sobre reciclagem de nutrientes e sobre a dinâmica de gases de efeito estufa.

A fluoresceína sódica (FS) ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$) é um corante com características fluorescentes. A FS apresenta peso molecular de 376,28, ponto de fusão de 314 – 316°C e estado sólido de cor alaranjada escura. A FS é pouco solúvel em água, mesmo em sua apresentação sólida, sendo solúvel em álcool. A molécula de FS é altamente fluorescente com excitação a 494 nm e emissão a 521 nm. A FS absorve energia no espectro de luz azul, com comprimento de onda entre 465 e 490 nm; enquanto no espectro de luz verde, entre 520 e 530 nm, ela emite luz (SILVA, 2010). A FS pura é considerada relativamente não tóxica. O efeito tóxico é usualmente causado pela impureza. A DL_{50} de FS é de 2.200 mg/kg para camundongos, 600 mg/kg para ratos e 300 mg/kg para coelhos.

A administração de FS é reportada em diferentes espécies animais para estudos diversos. Sampaio e Pippi (1997) testaram a FS como método alternativo de avaliação da viabilidade tecidual no intestino delgado isquêmico em equinos, nos quais foram injetados 100 mg/kg de solução de FS a 5% por infusão intravenosa rápida. Na detecção dos locais de

micção, Neilson (2003) recomenda para gatos a administração de 50 mL/animal de FS via oral ou 0,3 mL/animal de solução de FS 10% via injetável, e posterior visualização na excreta através de lanterna de luz negra; enquanto que para ovinos, Morton e Baird (1990) administraram 10 mL/animal de solução 10% de FS por três manhãs consecutivas, e os locais de micção foram visualizados na noite do quarto dia por meio de lanterna de luz negra. Embora haja menção do uso de FS em bovinos objetivando visualizar os locais de micção (FERREIRA et al., 2004), na literatura não foram encontrados trabalhos que descrevam uma metodologia de administração desse agente contrastante.

Considerando que são inexistentes os estudos a respeito da administração de FS em bovinos objetivando a visualização dos locais de micção nas áreas de pastagens, este protocolo estabelecerá os procedimentos para a administração de FS em bovinos, sob sistema de pastejo rotacionado com o objetivo de visualizar os locais de micção.

Materiais e Métodos

Foram estudadas cinco dosagens de FS (50; 100; 150; 200 e 284,4 mg/kg de peso vivo), definidas a partir das dosagens utilizadas em equinos por Sampaio e Pippi (1997). Os animais utilizados foram bezerros machos da raça holandesa preta e branca - HPB, com 30 dias de idade e peso médio de 138 kg de peso vivo. As doses de FS p.a. (Synth) foram administradas às 10h e 30min, por via oral. As cápsulas contendo FS, medindo 50 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro, foram confeccionadas com papel interfolhado natural (folha interna) e embrulhadas com papel Kraft natural (folha externa) (Figura 1). As cápsulas foram fornecidas aos animais através de aplicador manual, por via de aplicação endoesofágica (Figura 2). Para cada dosagem foi utilizado um animal contido por coleira, que foi mantido isolado durante a avaliação, em abrigo individual contendo bebedouro e comedouro de ração, mantido sobre relvado de *Cynodon dactylon* cv. Coast-cross.



Figura 1. Confeção de cápsula contendo fluoresceína sódica. Foto: Teresa Cristina Alves.



Figura 2. Administração de fluoresceína sódica em cápsula a um bovino através de aplicador manual. Foto: Teresa Cristina Alves.

Os animais ficaram sob observação para verificar se a FS poderia provocar alterações na atividade e no comportamento geral dos mesmos. Foram observados o consumo de água, sal mineral e forragem, além do comportamento de micção. Os locais de deposição de urina foram visualizados na noite do dia seguinte à aplicação, às 20h e 30min (34 horas após a administração da FS aos animais), por meio de lanterna de luz negra táctica (LED com comprimento de onda entre 380 e 420 nm, alimentação com três Pilhas AA e dimensões de 150 mm de comprimento x 57 mm de diâmetro). A fluorescência nos locais de deposição de urina foi classificada em três níveis visuais de intensidade: nível 1 (baixa fluorescência), nível 2 (fluorescente) e nível 3 (alta fluorescência). Durante a visualização dos locais de deposição de urina, o avaliador utilizou óculos de segurança na cor laranja (Universal Modelo SS 55-0), para proteção contra o comprimento de onda emitido pela lanterna de luz negra.

O critério para a definição da dosagem de FS que permitisse a visualização dos locais de micção baseou-se na facilidade de percepção e intensidade de fluorescência, e na ausência de sintomas de reação adversa no animal tratado.

Com a definição da dosagem de FS, um segundo experimento foi realizado para administrá-la a animais em pastejo. Foram usados três animais machos da raça Nelore, com peso médio de 450 kg de peso vivo, aos quais foi administrada uma dose diária de FS por via oral, aplicação endoesofágica, por dois dias consecutivos. As aplicações de FS ocorreram às 8h. Durante as três noites do período de ocupação do piquete, a partir das 18h, os locais de deposição de urina foram visualizados através de lanterna de luz negra, conforme descrito anteriormente. Os perímetros das áreas de deposição de urina foram demarcados com tinta spray de cor branca, visando quantificar a área de solo coberta por urina durante a micção (Figura 3).



Figura 3. Visualização e marcação de locais de deposição de urina bovina pela visualização da fluorescência de FS presente na urina através de lanterna de luz negra. Foto: Teresa Cristina Alves.

Na manhã do quarto dia, ocasião que os animais foram rotacionados entre os piquetes, as demarcações dos locais de deposição de urina foram posicionadas com equipamento “Estação Total”, visando à elaboração de mapas contendo as localizações de urina (Figura 4).



Figura 4. Posicionamento, através de Estação Total, do local de deposição de urina bovina, visualizado e marcado durante a noite através de lanterna de luz negra. Foto: Teresa Cristina Alves.

Resultados

Para as diferentes dosagens estudadas, não se observou alteração no comportamento de micção dos bezerros da raça HPB, submetidos à dose única, por via oral. A excreção de FS via urina ocorreu a partir da primeira micção, cerca de 30 minutos após a administração do corante, verificada visualmente pela coloração esverdeada da urina dos animais, sem auxílio de lanterna.

Durante o período de observação dos animais (ao longo de 34 horas após a administração de FS), não se observaram sintomas de reação adversa nos bezerros decorrentes da ingestão da FS. Os animais mantiveram as atividades normais de alimentação e dessedentação. Embora não tenham sido encontrados trabalhos sobre o uso da FS em bovinos, Watson e Rosen (1990) verificaram que foi segura a dosagem de FS de 25 mg/kg de peso corporal, administrada através de cápsula por via oral em humanos; pois de vinte voluntários apenas um desenvolveu uma urticária superficial, no braço, e que desapareceu após 4 horas. Em condições normais o organismo metaboliza a FS no fígado e a excreta pelos rins, sendo que a maior parte do composto é eliminada nas primeiras 24 horas (BELEÑA et al., 2013).

Verificou-se que, para as diferentes dosagens estudadas, os locais de deposição de urina puderam ser visualizados à noite, por meio de lanterna de luz negra, 34 horas após a administração do corante. As maiores intensidades de fluorescência foram verificadas para as maiores dosagens, obtendo-se a seguinte ordem de intensidade de fluorescência: dose 284,4 > 200 = 150 = 100 > 50 (Figura 5).

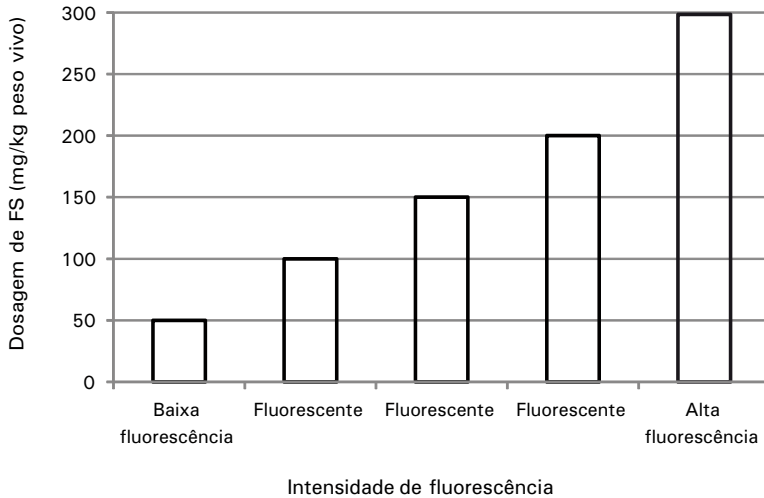


Figura 5. Intensidade de fluorescência de FS em função da dosagem. Avaliação feita 34 horas após a administração de FS aos animais.

Os locais de micções marcados nas primeiras observações foram monitorados, observando-se que, conforme as primeiras micções foram secando, houve perda da fluorescência, sendo necessário reidratá-los (molhar o relvado com água por meio de regador manual) para reativar a fluorescência sob a incidência da luz negra. Tal fato reforça a necessidade de marcar os locais da micção todas as noites após a administração da fluoresceína aos animais, para não perder a visualização e a identificação desses locais.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a dosagem de 50 mg/kg peso vivo permitiu a visualização dos locais de deposição de urina para as micções efetuadas no período de 34 horas após a administração de FS. Para o sistema de pastejo rotacionado, com período de ocupação de três dias, os locais de deposição de urina dos animais podem ser visualizados com a administração de FS nas manhãs

dos dois primeiros dias de ocupação do piquete. Sendo os locais de deposição de urina visualizados com auxílio de lanterna de luz negra, e marcados com tinta spray branca nas noites dos três dias de ocupação do piquete (Tabela 1).

Tabela 1. Datas de administração de fluoresceína sódica (AFS) e visualização e marcação dos locais de deposição de urina dos bovinos (VMLDU) mantidos em pastejo rotacionado, com período de ocupação de três dias.

Dia de ocupação do piquete	Período do dia	
	Manhã	Noite
1	AFS	VMLDU
2	AFS	VMLDU
3	-	VMLDU

Na manhã do quarto dia, período de saída dos animais do piquete, os locais de deposição de urina visualizados e marcados anteriormente foram posicionados com equipamento “Estação Total”. No escritório foi feito o *downloading* dos dados para o programa AutoGeo. Os dados foram exportados para o formato *shapefile* e trabalhados no programa ArqGIS para confecção dos mapas de localização das deposições de urina no piquete (Figuras 6 a 11).

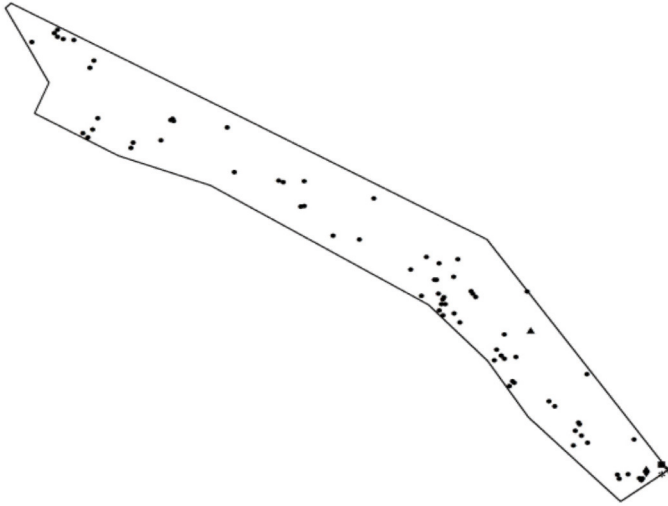


Figura 6. Posicionamento das deposições de urina bovina em piquete de pastagem degradada no período chuvoso. Legenda: ▲ Estação Total, — Cerca, ● Urina, ■ Saleiro, ◆ Bebedouro e * Porteira.

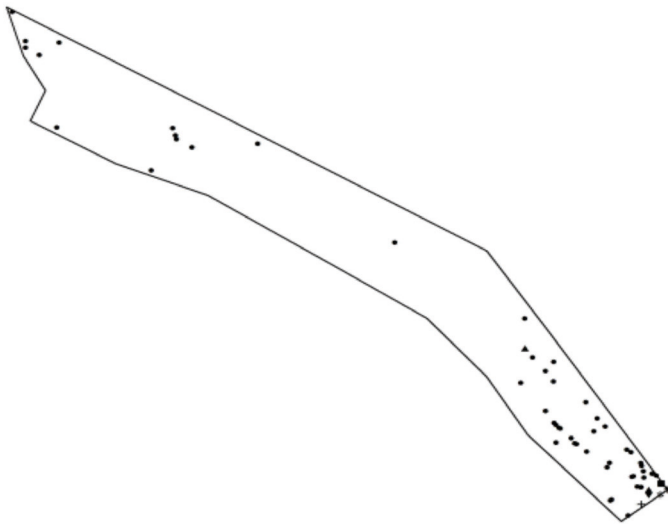


Figura 7. Posicionamento das deposições de urina bovina em piquete de pastagem degradada no período seco. Legenda: ▲ Estação Total, — Cerca, ● Urina, + Cocho, ■ Saleiro, ◆ Bebedouro e * Porteira.

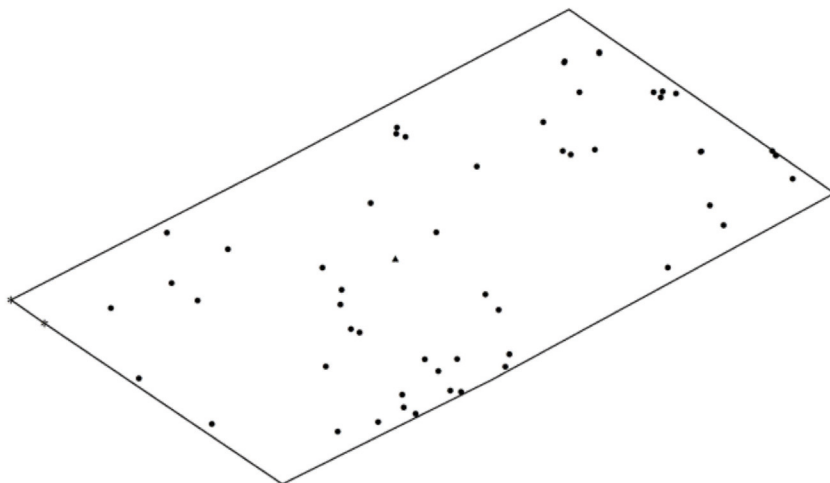


Figura 8. Posicionamento das deposições de urina bovina em piquete de pastagem de sequeiro com alta lotação animal no período chuvoso. Legenda: ▲ Estação Total, — Cerca, ● Urina e * Porteira.

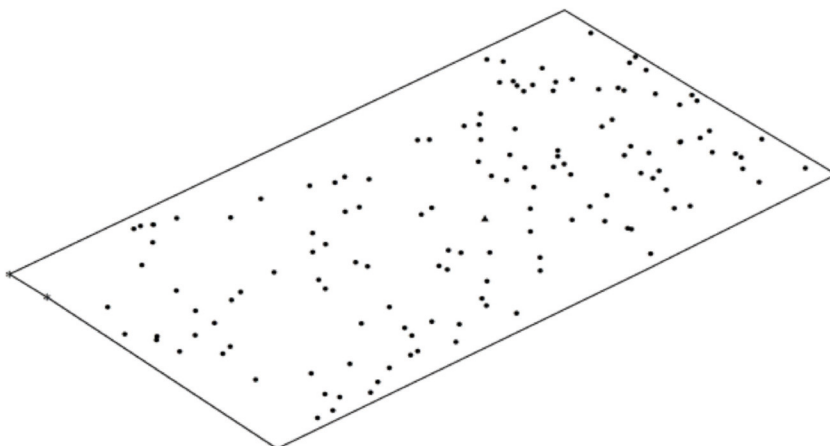


Figura 9. Posicionamento das deposições de urina bovina em piquete de pastagem de sequeiro com alta lotação animal no período seco. Legenda: ▲ Estação Total, — Cerca, ● Urina e * Porteira.

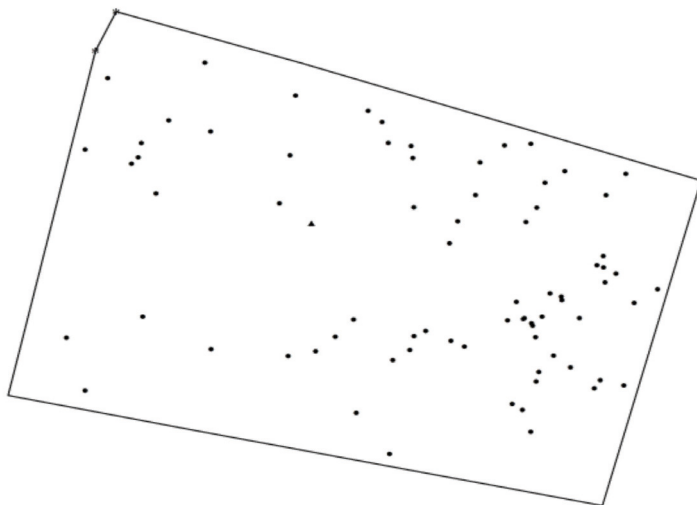


Figura 10. Posicionamento das deposições de urina bovina em piquete de pastagem irrigada com alta lotação animal no período chuvoso.
Legenda: ▲ Estação Total, — Cerca, ● Urina e * Porteira.

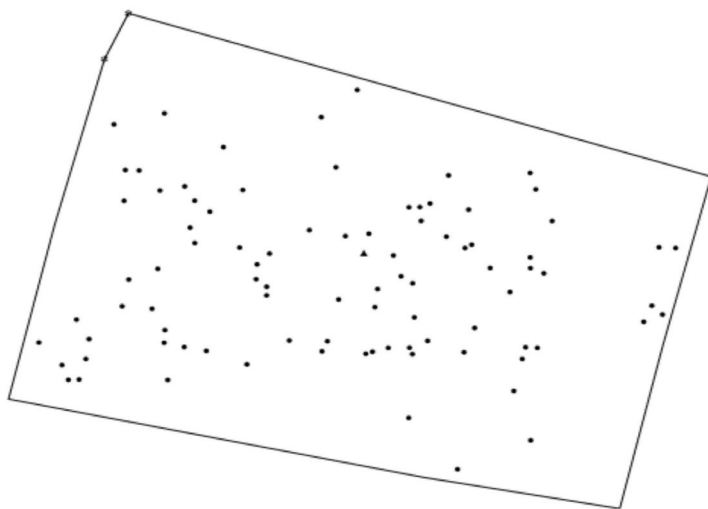


Figura 11. Posicionamento das deposições de urina bovina em piquete de pastagem irrigada com alta lotação animal no período seco.
Legenda: ▲ Estação Total, — Cerca, ● Urina e * Porteira.

Conclusão

A fluoresceína sódica na dosagem de 50 mg/kg de peso vivo, administrada em uma dose diária por dois dias consecutivos, por via oral, é segura aos bovinos e eficiente na visualização noturna dos locais de deposição de urina, com auxílio de lanterna de luz negra.

Referências

BELEÑA, J. M.; NÚÑEZ, M.; RODRÍGUEZ, M. Adverse reactions due to fluorescein during retinal angiography. **JSM Ophthalmology**, v. 1, p. 1-4, 2013.

DAY, T. A.; DETLING, J. K. Grassland Patch Dynamics and Herbivore Grazing Preference Following Urine Deposition. **Ecology**, v. 71, p. 180-188, 1990.

FERREIRA, E.; ROCHA, G. C. da; BRAZ, S. P.; SOARES, J. C.; ANDRADE, F. A. A. Modelos estatísticos para o estudo da distribuição de excretas de bovinos em pastagens tropicais e sua importância na sustentabilidade desses sistemas. **Livestock Research for Rural Development**, v. 16, n. 9, 2004.

HAYNES, R. J.; WILLIAMS, P. H. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. **Advances in Agronomy**, San Diego. v. 49, p. 119-199, 1993.

MOIR, J. L.; CAMERON, K. C.; Di, H. J.; FERTSAK, U. The spatial coverage of dairy cattle urine patches in an intensively grazed pasture system. **Journal of Agricultural Science**, v. 149, p. 473-485, 2011.

MORTON, I. D.; BAIRD, D. B. Spatial distribution of dung patches under sheep grazing. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 285-294, 1990.

NEILSON, J. C. Feline house soiling: elimination and marking behaviors. **Veterinary Clinical of Small Animal**, v. 33, p. 287–301, 2003.

OENEMA, O.; VELTHOF, G. L.; YAMULKI, S.; JARVIS, S. C. Nitrous oxide emissions from grazed grassland. **Soil Use and Management**, v. 13, p. 288-295, 1997.

SAMPAIO, A.; PIPPI, N. L. Avaliação da viabilidade de intestino delgado com isquemia experimental pelo uso de fluoresceína sódica em eqüinos. **Ciência Rural**, v. 27, p. 269-272, 1997.

SILVA, S. E. da. **Uso da Fluoresceína sódica em tumores da base do crânio: Um estudo experimental introdutório com análise qualitativa digital de contraste tumoral**. Porto Alegre: PUCRS, 2010, 60 p.

WATSON, A.P.; ROSEN, E. S. Oral fluorescein angiography: reassessment of its relative safety and evaluation of optimum conditions with use of capsules. **British Journal of Ophthalmology**, v. 47, p. 458-461, 1990.

WILLIAMS, D. LI.; INESON, P.; COWARD, P. A. Temporal variations in nitrous oxide fluxes from urine-affected grassland. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 779-788, 1999.