



**METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA  
FENOTIPAGEM DE ALTO DESEMPENHO PARA  
TEMPERATURA *CORE* E CH<sub>4</sub> EM BOVINOS LEITEIROS**

**EDVALDO ALVES VIEIRA**

**2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA  
FENOTIPAGEM DE ALTO DESEMPENHO PARA  
TEMPERATURA *CORE* E CH<sub>4</sub> EM BOVINOS LEITEIROS**

Autor: Edvaldo Alves Vieira  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Setembro de 2020

**EDVALDO ALVES VIEIRA**

**METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA  
FENOTIPAGEM DE ALTO DESEMPENHO PARA  
TEMPERATURA *CORE* E CH<sub>4</sub> EM BOVINOS LEITEIROS**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA no Programa de Pós- Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira  
Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Samarini Machado  
Prof. Dr. Thierry Ribeiro Tomich

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Setembro de 2020

636.234 Vieira, Edvaldo Alves.

V714m Metodologias alternativas para fenotipagem de alto desempenho para temperatura *core* e CH<sub>4</sub> em bovinos leiteiros. / Edvaldo Alves Vieira. – Itapetinga-BA: UESB, 2020.  
59f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA no Programa de Pós- Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira e coorientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Fernanda Samarini Machado e Prof. D.Sc. Thierry Ribeiro Tomich.

1. Bovinos leiteiros – Temperatura corporal - Mudança climática. 2. Pecuária de precisão – Sensor de temperatura. 3. Bovinos leiteiros - Fenotipagem de alto desempenho. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pereira, Luiz Gustavo Ribeiro. III. Machado, Fernanda Samarini. IV. Tomich, Thierry Ribeiro. V. Título.

**CDD(21): 636.234**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Termômetro *wireless* implantável
2. Bem-estar animal - Mudança climática

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE  
DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ZOOTECNIA**

Área de Concentração: Produção de Ruminantes

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** “Metodologias alternativas para fenotipagem de alto desempenho para temperatura *core* e CH<sub>4</sub> em bovinos leiteiros”.

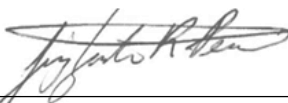
**Autor (a):** Edvaldo Alves Vieira

**Orientador (a):** Prof. Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Samarini Machado

Prof. Dr. Thierry Ribeiro Tomich

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



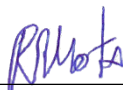
---

Luiz Gustavo Ribeiro Pereira (Orientador)  
Prof. Dr. - Embrapa Gado de Leite



---

Amália Saturnino Chaves  
Prof.<sup>a</sup>. Dra. – UFJF



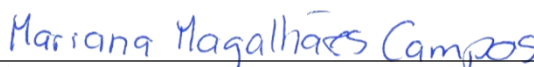
---

Rodrigo Reis Mota  
Dr.–Universidade de Liège - Bélgica



---

Thierry Ribeiro Tomich  
Dr.– Embrapa Gado de Leite



---

Mariana Magalhães Campos  
Dra.– Embrapa Gado de Leite

Data de realização: 03 de setembro de 2020.

*“Creio que a pessoa que teve mais experiência de privações consegue enfrentar problemas com mais firmeza que a pessoa que nunca passou por sofrimento. Portanto, visto por esse ângulo, um pouco de sofrimento pode ser uma boa lição para a vida”.*

*Dalai Lama*

*A Deus que me concedeu o dom da vida;*

*a meus pais que me incentivaram e me  
apoiam em todo o meu percurso,*

*a todos que fizeram parte dessa trajetória de quatro anos de  
Doutorado.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pela minha vida e pela de todas as pessoas que estiveram ao meu lado ao longo desses quatro anos. Obrigado, Senhor, por ter me concedido a graça de chegar até aqui!*

*Aos meus pais Dilma e José pela paciência e pelo suporte. Sem o apoio de vocês, esta conquista não seria possível. Em especial minha mãe, que não está mais presente fisicamente, mas que continua sendo presença em minha vida em todos os momentos.*

### **AMO VOCÊS!**

*Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela oportunidade de realização deste curso.*

*Às secretárias do PPZ Raquel e Roberta por toda a ajuda.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no Exterior.*

*À Embrapa que possibilitou a realização deste trabalho por meio do Projeto PECUS-RumenGases (Embrapa/CNPq/FAPEMIG).*

*Ao PVE-CAPES pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante a execução desse trabalho.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro.*

*Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA).*

*Ao professor e orientador DSc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira pela oportunidade, pelo incentivo e por todo conhecimento compartilhado.*

*Ao Rodrigo Mota e Darlene pelo apoio e paciência no desenvolvimento desse trabalho na Bélgica.*

*Aos meus co-orientadores Thierry Ribeiro Tomich e Fernanda Samarini Machado.*

*Ao meu co-orientador na Bélgica Jérôme Bindelle pela receptividade, pela paciência e pelo apoio e ensinamentos.*

*Aos professores que fizeram parte da minha caminhada desde a educação básica até à pós-graduação.*

*Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia pelos conhecimentos transmitidos.*

*Aos colaboradores e colegas da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco.*

*Aos meus amigos de longa data: Ana, Vinícius, Luana, Bruna, Vanessa, Taynara, Débora, Joyce, Katiane, Aline, Tânia, Izabella, Carolzinha, Aline Nora, Roberta, Amália, Sarah e Evelyn.*

*Aos meus colegas de profissão: João Paulo, Camila Lage, Victor Malacco, Laís, Diego, Natália, Patrícia, Hilton, Vanessa, Ellen, George Abreu e Mário Júnior.*

*À família criada em Gembloux-Bélgica: Rodrigo, Ana, Darlene e Teodoro.*

*À família criada em BRUXELAS, amigos e pessoas importantíssimas que estiveram ao meu lado, Nicolas, Tiffany, Vanessa, Fabrice, Oliver e Aurelian.*

*Enfim, agradeço a todos que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais esta etapa.*

*Muito obrigado!*



## BIOGRAFIA

EDVALDO ALVES VIEIRA, filho de Dilma Alves da Silva e José Alberto Vieira, nasceu em Caetanópolis, Minas Gerais, no dia 15 de agosto de 1991.

No ano de 2008, concluiu o Ensino Médio no Colégio Cenequista Bernardo Mascarenhas – Caetanópolis, Minas Gerais.

Em 2009, iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Instituto de Ciências Agrárias campus Montes Claros, sob a orientação do Professor DSc. Eduardo Robson Duarte.

Em 2013, iniciou um estágio no exterior na Universidade de Lisboa em Lisboa – Portugal.

Em Junho de 2014, finalizou o curso de graduação obtendo o título de “Zootecnista”.

Em agosto de 2014, iniciou o curso de Pós-Graduação em Produção Animal stricto sensu, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Instituto de Ciências Agrárias campus Montes Claros, sob a orientação da Professora DSc. Luciana Castro Geraseev. Em 31 de Março de 2016 defendeu a referida Dissertação, obtendo o título de “Mestre em Produção Animal”.

Em 04 de abril de 2016, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia stricto sensu, em nível de Doutorado, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB campus Itapetinga, sob orientação do Professor DSc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, com período sanduíche na Universidade de Liège – Gembloux, Bélgica, sob a supervisão do Prof. Jèrome Bindelle. Foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES .

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
I – REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1.1 Introdução .....	1
1.2 – Importância e métodos de aferição de temperatura <i>core</i> em ruminantes ..	3
1.3 – Emissões de Gases de efeito estufa na pecuária.....	5
1.4 – Metodologias para mensuração de gases em ruminantes.....	6
REFERÊNCIAS.....	9
II – OBJETIVOS.....	15
III – HIPÓTESES.....	16
IV – CAPÍTULO I.....	17
4.1 – RESUMO.....	17
4.2 – Introdução.....	19
4.3 – Material e Métodos.....	20
4.3.1 – Local e manejo dos animais.....	20
4.3.2 – Implante do microchip e mensuração de temperatura.....	20
4.3.3 – Análise estatística.....	21
4.4 – Resultados .....	22
4.5 – Discussão .....	23
4.5 – Conclusão.....	27
4.6 – Referências.....	28
V – CAPÍTULO II.....	36
5.1 – Introdução.....	37
5.2 – Material e Métodos.....	38
5.2.1 – Banco de dados, animais e variáveis avaliadas.....	38
5.2.2 – Mensuração na câmara respirométrica.....	38
5.2.3 – Mensuração na Máscara Facial.....	39
5.2.4 – Procedimentos Estatísticos.....	40
5.3 – Resultados .....	43
5.3.1 – Dinâmica de produção de CH <sub>4</sub> e comparação entre Câmara respirométrica e Máscara Facial quatro horas após alimentação.....	43
5.3.2 – Avaliação das subamostragens na CR para escolha do melhor horário para coleta spot de metano entérico com MF.....	44
5.4 – Discussão.....	44
5.5 – Conclusão.....	47
5.6 – Referências.....	47

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Página
Tabela 1 –	Temperaturas observadas nas diferentes regiões dos bezerros, variáveis climáticas e índice de temperatura e umidade.....	19
Tabela 2 –	Equações para predição da temperatura retal (°C) utilizando somente o Bio-thermo microchip em diferentes locais ou combinações com os parâmetros: temperatura do ar (TA, °C), umidade relativa (UR, %) ou índice de temperatura e umidade (ITU).....	26
CAPÍTULO II		
Tabela 1 –	Protocolos do Comitê de Ética em experimentos utilizando bovinos leiteiros.....	49
Tabela 2 –	Estatística descritiva das variáveis avaliadas.....	49
Tabela 3 –	Médias experimentais da produção de CH <sub>4</sub> consumo de matéria seca (CMS), rendimento e intensidade de CH <sub>4</sub> e de eficiência preditiva entre as técnicas da câmara respirométrica e da máscara facial em bovinos leiteiros	50
Tabela 4 –	Médias experimentais da produção de CH <sub>4</sub> , rendimento e intensidade de CH <sub>4</sub> em bovinos leiteiros na câmara respirométrica e nos pontos das subamostragens 240, 260, 640, 660, 680min após a alimentação e métricas de eficiência preditiva dos modelos	51

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I		Página
Tabela 1 –	Temperaturas observadas nas diferentes regiões dos bezerros, variáveis climáticas e índice de temperatura e umidade.....	19
Tabela 2 –	Equações para predição da temperatura retal (°C) utilizando somente o Bio-thermo microchip em diferentes locais ou combinações com os parâmetros: temperatura do ar (TA, °C), umidade relativa (UR, %) ou índice de temperatura e umidade (ITU).....	26
CAPÍTULO II		
Tabela 1 –	Protocolos do Comitê de Ética em experimentos utilizando bovinos leiteiros.....	49
Tabela 2 –	Estatística descritiva das variáveis avaliadas.....	49
Tabela 3 –	Médias experimentais da produção de CH <sub>4</sub> consumo de matéria seca (CMS), rendimento e intensidade de CH <sub>4</sub> e de eficiência preditiva entre as técnicas da câmara respirométrica e da máscara facial em bovinos leiteiros	50
Tabela 4 –	Médias experimentais da produção de CH <sub>4</sub> , rendimento e intensidade de CH <sub>4</sub> em bovinos leiteiros na câmara respirométrica e nos pontos das subamostragens 240, 260, 640, 660, 680min após a alimentação e métricas de eficiência preditiva dos modelos	51

## RESUMO

VIEIRA, Edvaldo Alves. **Metodologias alternativas para fenotipagem de alto desempenho para temperatura *core* e CH<sub>4</sub> em bovinos leiteiros**. Itapetinga, BA: UESB, 2020. 59p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).\*

A aferição da temperatura *core* e a mensuração da emissão de metano entérico em bovinos leiteiros de forma automatizada e contínua, com baixo custo e em larga escala, ainda é um desafio a ser solucionado. Podem gerar variáveis de importância ambiental (pegada de carbono e de adaptação dos animais aos extremos climáticos), fisiológicas, metabólicas e de bem-estar animal. A crescente disponibilidade de sensores e tecnologias é uma oportunidade para a fenotipagem de alto desempenho para essas características. A tese foi estruturada em dois experimentos: *i*) Foi avaliado o melhor local de implante de microchip com sensor de temperatura com base na acurácia e precisão de modelos, considerando ou não variáveis climáticas para prever a temperatura *core* em bezerros leiteiros lactentes. Foram utilizados 19 bezerros Holandês x Gir ( $32.2 \pm 5.2$ kg de peso vivo ao nascimento) e o implante dos microchips foi realizado no quarto dia de vida na base da orelha, prega caudal e umbilical (implantes subcutâneos), tábua do pescoço (músculo cleido-ociptal) e parte interna da coxa (músculo gracilis), implantes intramusculares. A temperatura retal (TR) aferida com termômetro clínico digital foi utilizada como método referência de temperatura *core*. A temperatura do ar (TA), umidade relativa (UR) e o índice de temperatura e umidade (ITU) foram avaliados no mesmo momento da aferição da temperatura retal e da obtenção dos dados gerados pelo microchip, do dia do implante até os 60 dias de idade dos animais. A amplitude de variação da temperatura do ar foi de 7.6 a 34.4°C, a de umidade relativa do ar foi de 17,5 a 99,0% e o ITU de 50.6 a 91.52. As médias de TR e as obtidas pelos sensores no pescoço, cauda, coxa e umbigo foram 38,7; 36,9; 38,0; 37,0 e 37,8°C respectivamente. As temperaturas obtidas no pescoço e na coxa (intramusculares) foram as mais próximas da temperatura retal; já as correlações com a TR retal foram 0,56, 0,60, 0,60, 0,53 e 0,48 respectivamente. A tábua do pescoço e prega caudal foram os locais de implante do microchip que apresentaram melhor correlação. A predição da TR apresentou precisão moderada ( $r_c = 0,49$  a  $0,60$ ) e elevada acurácia ( $cb = 0,79$  a  $0,88$ ), sem a utilização dos dados climáticos e ITU como variáveis preditivas. A inclusão dos dados climáticos e de ITU como variáveis preditivas aumentou a precisão em 21,3%, a acurácia em 10,2% e reduziu o erro médio absoluto em 23%. Os coeficientes de correlação e concordância e erro médio absoluto de predição para a base da cauda e pescoço foram 0,68 e 0,67 e 0,29 e 0,28°C respectivamente. Os locais mais apropriados de implante dos microchips para o

monitoramento da temperatura core de bezerros lactentes foram a tábua do pescoço e a prega caudal. Recomenda-se a utilização da temperatura do ar, da umidade relativa ou do ITU como variável preditiva nos modelos de predição de temperatura *core* em bezerros lactentes. *ii*) No segundo estudo, o objetivo foi: *i*) comparar as mensurações pela câmara respirométrica (CR) 20h., de avaliação com a máscara facial (MF) quatro horas após a alimentação; *ii*) avaliar o potencial de utilização das subamostragens na CR (240, 260, 640, 660 e 680min. após a alimentação) para encontrar o horário mais apropriado para avaliação com a MF. Dados de emissão de CH<sub>4</sub> de 109 vacas leiteiras (551.3 ±150 kg) foram obtidos por câmara respirométrica (método referência) e máscara facial (método alternativo). Para comparar as duas técnicas, foram usados dados de CMS (consumo de matéria seca), produção diária de CH<sub>4</sub>, rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub>. Os valores de emissão de CH<sub>4</sub> obtidos por coleta spot foram extrapolados para 24 horas e em seguida comparados com a produção total diária obtida na câmara. As médias obtidas entre as duas técnicas para produção de CH<sub>4</sub>, rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub> foram semelhantes (P>0,05). Foram observadas diferenças para o CMS. Os modelos de predição apresentaram coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e o coeficiente de correlação e concordância (CCC) de 0.20 e 0.45 respectivamente. Como a eficiência preditiva entre as técnicas da CR e a MF foi baixa, foi realizado estudo com as subamostragens na CR para encontrar um horário mais adequado para avaliação na MF. Correlações foram altas e positivas ( $\rho > 0.82$ ) entre os valores obtidos por extrapolação das subamostragens e a avaliação tradicional por CR. As subamostragens aos 240, 260, 640, 660 e 680min. após a alimentação apresentaram potencial para serem testadas. Não foram observadas diferenças entre a produção de CH<sub>4</sub>, rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub> entre a CR e os pontos da subamostragem da CR (P>0,05). Os valores de R<sup>2</sup> variaram de 0.35 a 0.67. O CCC para as subamostragens da CR foram de 0.58, 0.59, 0.79, 0.80. A predição usando MF quatro horas após a alimentação apresentou baixa acurácia e precisão. Os horários mais promissores para avaliações de curta duração com máscara facial são 340 a 680 min. após a alimentação matinal. Novos estudos devem ser realizados adotando esses tempos de subamostragem para que seja avaliada a capacidade da técnica para fenotipagem de alto desempenho.

**Palavras-chave:** temperatura corporal, pecuária de precisão, sensores, termômetro *wireless* implantável, mudança climática

---

\* Orientador: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, D Sc. UESB/Embrapa e Co-orientadores: Fernanda Samarini Machado e Thierry Ribeiro Tomich, DSc.

## ABSTRACT

VIEIRA, Edvaldo Alves. **Alternative methodologies for high-throughput phenotyping for core temperature and CH<sub>4</sub> in dairy cattle**. Itapetinga, BA: UESB, 2020. 59p. Thesis. (PhD in Animal Science – Ruminant Production).\*

High-throughput phenotyping is defined as a method to determine the characterization of phenotypes quickly and automatically, generating significant volumes of data. It involves the use of methodologies for collecting information based on the data obtained on the property. Among the various techniques currently used in high-performance phenotyping, two of them help to optimize information. These techniques make it possible to monitor the growth and development of calves in terms of physiological status by controlling body temperature, as well as in adults animals, by monitoring the gases produced. This study aims evaluate the best microchip implant site with a temperature sensor and the accuracy and precision of this device for monitoring core temperature in lactating dairy calves. Nineteen Holstein x Gir calves ( $32.2 \pm 5.2$  kg live weight at birth) were used and the microchips were implanted on the fourth day of life at the base of the ear, caudal and umbilical fold (subcutaneous implants), neck (cleido-ocipital muscle) and thigh (gracilis muscle), intramuscular implants. The rectal temperature (RT) measured with a digital clinical thermometer was used as a core temperature reference method. Air temperature (AT), relative humidity (RH) and the temperature and humidity index (THI) were evaluated at the same time as the rectal temperature was measured and the data generated by the microchip of the implant day until 60 days old were obtained of the animals. The range of variation of the air temperature was 7.6 to 34.4°C, the relative humidity of the air was 17.5 to 99.0% and the ITU 50.6 to 91.52. The RT means and those obtained by the sensors in the neck, tail, thigh and navel were 38.7; 36.9; 38.0; 37.0 and 37.8°C respectively. The temperatures obtained in the neck and thigh (intramuscular) were the closest to the rectal temperature, whereas the correlations with the rectal TR were 0.56, 0.60, 0.60, 0.53 and 0.48, respectively. The neck board and caudal fold were the microchip implant sites that showed the best correlation. The prediction of RT showed moderate precision ( $r_c = 0.49$  to  $0.60$ ) and high accuracy ( $cb = 0.79$  to  $0.88$ ) without the use of climatic data and UTI as predictive variables. The inclusion of climatic and THI data as predictive variables increased precision by 21.3%, accuracy by 10.2% and reduced mean absolute error by 23%. The correlation and agreement coefficients and mean absolute prediction error for the base of the tail and neck were 0.68 and 0.67 and 0.29 and 0.28°C, respectively. The most appropriate locations for microchip implantation to

monitor the core temperature of suckling calves were the neck board and the caudal fold. It is recommended to use air temperature, relative humidity or THI as a predictive variable in models of prediction of core temperature in suckling calves. In the second study of metrics the objective was: *i*) to compare the measurements by the CR 20h of evaluation with the MF four hours after feeding; *ii*) evaluate the potential for using subsamples in the CR (240, 260, 640, 660 and 680 minutes after feeding) to find the most appropriate time for the evaluation of the FM. CH<sub>4</sub> emission data from 109 dairy cows ( $551.3 \pm 150$  kg) were obtained by respirometric chamber (reference method) and face mask (alternative method). To compare the two techniques, data from CMS (dry matter consumption), daily CH<sub>4</sub> production, CH<sub>4</sub> yield and intensity were used. The CH<sub>4</sub> emission values obtained through the spot collection were extrapolated to 24 hours and then compared with the total daily production obtained in the chamber. The means obtained between the two techniques for CH<sub>4</sub> production, CH<sub>4</sub> yield and intensity were similar ( $P > 0.05$ ). Differences were observed for CMS. Based on the study of accuracy and precision of the models, the determination coefficient ( $R^2$ ) and the correlation and agreement coefficient (CCC) between CR and FM values were 0.2 and 0.45 respectively. As the predictive efficiency between the CR techniques and the FM was low, a study was carried out with the subsamples in the CR to find a more suitable time for evaluation in the FM. Correlations were high and positive ( $\rho > 0.82$ ) between the subsampling points in the CR. The subsamples of the CR (240, 260, 640, 660 and 680min after feeding) had the potential to be tested. There were no differences between the production of CH<sub>4</sub>, yield and intensity of CH<sub>4</sub> between the CR and the points of the subsampling of the CR.  $R^2$  values ranged from 0.35 to 0.67. The CCC for the CR subsamples were 0.58, 0.59, 0.79, 0.80. The prediction using FM four hours after feeding showed low accuracy and precision. The subsamples of the CR showed the potential for evaluating the production of CH<sub>4</sub> at these times by the FM and should be tested in new studies that allow adjustments so that this technique can be applied safely for high-throughput phenotyping.

**Keywords:** body temperature, precision sensors, implantable wireless thermometer, climate change.

---

\* Advisor: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, *D Sc.* UESB e Co-advisor: Fernanda Samarini Machado e Thierry Ribeiro Tomich, *D Sc*



# I – REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 Introdução

A produção de leite mundial cresceu exponencialmente nos últimos 50 anos (FAOstat, 2016). Com o aumento do número de animais nos sistemas de produção, novos desafios surgiram e o manejo de precisão, focado na gestão da variabilidade animal, espacial e temporal, tem potencial para melhorar o desempenho econômico, ambiental e social dos sistemas de produção de leite.

Um dos preceitos básicos da pecuária de precisão é a adoção de tecnologias capazes de gerar dados individualizados, que são informações importantes para a tomada de decisão. O uso de sensores está cada dia mais acessível e com aplicações mais amplas. O implante subcutâneo ou intramuscular de microchips com biossensores em animais *pet* (Quimby et al., 2009) e em equinos (Auclair-Ronzaud et al., 2020) é utilizado comercialmente, permitindo a identificação e a aferição da temperatura dos animais de forma automatizada. Por meio desse parâmetro é possível detectar alterações fisiológicas nos animais, uma vez que extremos de temperatura podem ocasionar febre, desidratação, diarreia dentre outros. Em ruminantes, é um dispositivo que ainda está sendo testado e utilizado, principalmente em trabalhos de pesquisa envolvendo novilhos (Reid et al., 2012), vaca leiteira (Iwasaki et al., 2019); e cabras (Torrao et al., 2011).

Além de sensores, a utilização de dispositivos como data loggers intravaginais em vacas foi descrita por Wang et al., (2020) que avaliaram as mudanças de temperatura durante o ciclo estral em vacas em diferentes estações do ano. Esses autores observaram, entre as estações, alterações na temperatura, sendo mais elevadas no verão e similares entre outono e inverno. Além disso, salientaram que os diagnósticos de estro, prenhez e parto são fortemente ligados às mudanças na temperatura corporal e que as mensurações por dispositivos intravaginais são melhores correlacionadas com a temperatura corporal e não são afetadas por fatores externos.

Os bezerros lactentes são animais constantemente desafiados por agentes infecciosos e parasitários, sendo a categoria animal que mais demanda monitoramento de temperatura *core* para o diagnóstico de possíveis problemas de saúde. Entretanto, não existem ainda trabalhos que evidenciam de forma clara a relação entre temperatura obtida

por sensores implantados em diferentes regiões subcutâneas e intramusculares com a temperatura retal de bezerros lactentes.

Somado ao desafio do adensamento (aumento do número de animais por rebanho), crescente nos sistemas de produção animal, as questões ambientais, relacionadas às emissões de gases de efeito estufa pelos ruminantes vem ganhando importância nos últimos anos.

A produção de ruminantes é responsável por aproximadamente 81% dos gases de efeito estufa (GEE) gerados na pecuária (Wolf et al., 2017). A produção de CH<sub>4</sub> é resultado do processo de digestão. Esse gás é decorrente da atividade da microbiota ruminal sobre o alimento (Franzluebbers, 2020). Alternativas têm sido pesquisadas a fim de reduzir esse processo e otimizar a produção de leite e o crescimento dos animais (Johnson e Johnson, 1995; Eckard et al., 2010).

Diversas pesquisas têm sido elaboradas com o objetivo de buscar técnicas para mensuração dos gases de origem entérica. A câmara respirométrica é a mais utilizada e conhecida como “*gold standard*” ou padrão ouro em avaliações respirométricas (Hammond et al., 2016). Além disso, é precisa e acurada, possibilitando a elaboração de ensaios detalhados que são importantes para o conhecimento da dieta, do metabolismo e exigências dos animais em diferentes categorias (Machado et al., 2016). No entanto, é de elevado custo e laboriosa, o que faz com que métodos alternativos a essa técnica sejam pesquisados (Ricci et al., 2014).

A máscara facial surgiu como opção prática e com potencial para utilização na mensuração de gases de origem entérica em ruminantes. A técnica consiste em coletas *spot* do gás produzido pelo animal durante 30 minutos. Os resultados são extrapolados para 24 horas, obtendo-se a produção diária de CH<sub>4</sub> (Machado et al., 2016). No entanto, os resultados já obtidos em alguns ensaios vêm sendo discutidos quanto ao nível de acurácia e precisão, bem como a possibilidade de substituir a técnica padrão da câmara respirométrica (Oss et al., 2016; Silveira et al., 2019).

A mensuração da emissão de metano entérico e a aferição da temperatura *core* em bovinos leiteiros, abrangendo grande quantidade de animais e com custos acessíveis, ainda é um desafio. A fenotipagem dessas variáveis pode ser relevante para avanços no conhecimento sobre produção de gases de efeito estufa na pecuária, para adaptações dos animais aos extremos climáticos e para as áreas de fisiologia, metabolismo e de bem-estar animal. Assim, o desenvolvimento de novos métodos com a utilização de sensores e

tecnologias cada vez mais acessíveis pode viabilizar a fenotipagem de alto desempenho para essas variáveis.

A fenotipagem de alto desempenho envolve a caracterização de fenótipos de forma rápida e automatizada, geralmente adotando processos e tecnologias que permitem a coleta de informações em propriedades comerciais (Hocquete et al., 2011). A fenotipagem é importante para o entendimento da base genética do rebanho (Mrode et al., 2020).

A utilização de sensores e de tecnologias de precisão é prática com adoção crescente nas propriedades leiteiras. Técnicas de aferição de temperatura *core* e de mensuração das trocas gasosas em bovinos leiteiros vêm ganhando importância nos últimos anos em face das questões relacionadas às mudanças climáticas e emissões de gases de efeito estufa, além de questões relacionadas ao monitoramento sanitário e de bem-estar dos animais de produção.

## **1.2 Importância e métodos de aferição de temperatura *core* em ruminantes**

A termorregulação é a capacidade do corpo de controlar sua temperatura dentro de um intervalo constante (Cannon, 1929). A maior produção de calor pelos animais é a estratégia dos homeotérmicos, quando a temperatura ambiente é mais baixa do que a corporal; enquanto a perda de calor por evaporação é utilizada em situações em que a temperatura ambiente excede à corporal (Jessen & Jessen, 2001). No caso de bezerros, considera-se a faixa de variação da temperatura *core* de 38 a 39,5°C como temperaturas fisiológicas de animais sob termoneutralidade (Bligh, 1998; Nascimento et al., 2019). Os animais são capazes de se adaptar às adversidades climáticas sob condições em que a temperatura corporal não pode ser compensada por mecanismo de termorregulação. Os animais podem apresentar estresse térmico. Essa condição em bezerros, tem efeito negativo no bem-estar animal e causa perdas econômicas diretas como a mortalidade e perda de desempenho do rebanho (Roy e Collier, 2012).

A temperatura *core* é definida como a temperatura interna do corpo próxima a dos principais órgãos vitais (Cabanac, 2006). A aferição da temperatura *core* permite monitorar a termorregulação e é utilizada como procedimento de monitoramento fisiológico geral dos animais (Macaulay et al., 1995). Com base em parâmetros de hipotermia, neutrotermia e hipertermia é possível inferir sobre as reações do animal às adversidades ambientais, às anormalidades fisiológicas, além de ser possível associá-los ao crescimento, nutrição, lactação e reprodução (Collier et al., 2006).

O diagnóstico rápido e eficaz de animais que não estão saudáveis no rebanho é essencial para iniciar o tratamento, garantir a recuperação e minimizar a incidência e a propagação de doenças. O método padrão para se obter a temperatura corporal do animal é a aferição da temperatura retal (TR) ou aricular (Reid et al., 2012). É um procedimento que pode causar estresse nos animais (Burfeind et al., 2010) e servir de veículo de transmissão de agentes causadores de doenças. Outro possível problema das mensurações manuais de TR é que o aumento no tamanho dos rebanhos nas fazendas leiteiras gera dificuldade operacional para adoção do procedimento. Por esse motivo, a busca por métodos alternativos, automáticos e precisos têm sido alvo de pesquisas nos últimos anos (Giro et al., 2019a; Hill et al., 2016; Iwasaki et al., 2019; Lee et al., 2016; Teixeira et al., 2019).

A termografia infravermelha é uma técnica para mensuração da temperatura corporal. Peng et al., (2019) desenvolveram um ensaio avaliando a temperatura de diversas regiões do corpo do animal para destacar qual melhor se correlacionaria com a temperatura retal sob diferentes condições de ITU (Índice de temperatura e umidade). Das sete regiões avaliadas (orelha, frente, maxilar, flanco, garupa, úbere anterior e posterior), a frente foi a que apresentou maior correlação com a temperatura retal. No entanto, os autores destacaram que a temperatura da superfície corporal é influenciada por diversos fatores externos e internos, como a raça, a produção de leite e as condições climáticas. Porém, apesar da limitação da medição da temperatura da superfície em refletir a temperatura interna do corpo, a técnica de termografia infravermelha é prática e recomendada para o diagnóstico precoce de estresse por calor, por ser de fácil manejo e manipulação, quando se compara a aferição no reto.

Outra metodologia para aferição da temperatura foi descrita por Bewley et al., (2008) e envolveu a utilização de “*bolus*” com sensores de temperatura. Os autores observaram que devido à atividade dos microrganismos no rúmen, a temperatura no local foi 0.5 °C mais alta que a temperatura corporal (aferida por termômetro no reto). Além disso, observaram alta correlação entre as temperatura reticular e retal.

Para otimizar a aferição da temperatura nos animais, dispositivos de radiofrequência como o Microchip Biothermo (Digital Angel Corp., St. Paul, MN), que fornece a temperatura em tempo real, foi desenvolvido e já é comercializado para uso em animais *pet*. No entanto, Reid et al. (2012) testaram esses dispositivos em novilhas da raça holandesa. Esses autores avaliaram chips implantados na prega umbilical, na orelha e na linha média posterior à marrafa e observaram que o local de melhor correlação com

a temperatura retal foi a prega umbilical sugerindo novos estudos para avaliar o potencial desses dispositivos no diagnóstico de doenças.

Lee et al., (2016) utilizaram dispositivos similares (termo-registradores digitais em forma de botão) em novilhas da raça holandesa em diferentes regiões do pescoço, com o objetivo de comparar os resultados com a temperatura retal em diferentes estações do ano. Observaram que a temperatura ambiente influencia a obtida pelo dispositivo implantado, no entanto sugeriram a utilização dessa ferramenta para auxiliar na detecção de febre em animais.

Giro et al., (2019) avaliaram a utilização de chips para monitoramento da temperatura corporal em bovinos de corte em pastejo. Esses autores observaram praticidade na metodologia, porém relataram limitações para determinar a temperatura corporal, uma vez que a temperatura do ambiente influenciou as temperaturas obtidas pelos chips. Tecnologias que otimizam o gerenciamento para a identificação da temperatura corporal interna dos animais são importantes para os produtores, já que podem favorecer adoções de práticas de manejo que reduzam as perdas de produção. Com o uso de dispositivos para mensuração de temperatura corporal, a técnica de diagnóstico de saúde se tornaria automatizada e menos laboriosa.

### **1.3 Emissões de Gases de efeito estufa na Pecuária**

A pecuária brasileira tem importante impacto no produto interno bruto nacional (PIB). Em 2018, o PIB aumentou 1,1% em relação ao ano anterior e a participação correspondente à atividade teve alta de 0,1%, dados positivos para o setor. O efetivo de bovinos alcançou 213,5 milhões de cabeças, ano recorde no volume de carne exportada. A produção de leite teve crescimento de 1,6%, o que gerou aumento da produtividade nacional, que ultrapassou pela primeira vez 2000 kg/vaca/ano. Resultados que revelam a importância da pecuária no desenvolvimento econômico do Brasil (Ibge, 2018).

No setor agropecuário, 81% dos GEE gerados pela pecuária são oriundos da produção de ruminantes (Wolf et al., 2017). Além de ser considerada uma das principais fontes de emissão antropogênica, do total de GEE emitido, 90% é proveniente dos ruminantes. Esses animais produzem CH<sub>4</sub> naturalmente no processo de digestão. A produção desse gás é decorrente da atividade da microbiota ruminal sobre o alimento ingerido. A fermentação dos nutrientes resulta na formação de ácidos graxos voláteis (AGV's), que posteriormente serão utilizados pelo animal como fonte de energia e na

produção de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e  $\text{CH}_4$  (Martin et al., 2008). Sabe-se que entre 2 a 12% da energia bruta consumida pelo animal são gastos no processo de formação de  $\text{CH}_4$ . A qualidade e quantidade de alimento ingerido podem colaborar para o aumento da produção desse gás (Franzluebbbers, 2019). Os componentes da dieta, tais como o tipo de carboidrato, são importantes para a produção de  $\text{CH}_4$ , já que são capazes de influenciar o pH ruminal e alterar a microbiota (Archimède et al., 2011).

Diferentes estratégias como a manipulação da dieta, da qualidade das pastagens e da eficiência alimentar são algumas das opções que têm sido avaliadas a fim de reduzir a produção de  $\text{CH}_4$  (Kliem et al., 2018; Børsting et al., 2019; Doyle et al., 2019; Richardson et al., 2019; Van Gastelen et al., 2019; Akanmu et al., 2020; Nogueira et al., 2020). Além disso, devido à complexidade de mensuração de  $\text{CH}_4$ , diferentes metodologias têm sido pesquisadas para esse fim.

#### **1.4 Metodologias para mensuração de $\text{CH}_4$ em ruminantes**

Os primeiros estudos relacionados à avaliação do  $\text{CH}_4$  entérico eram focados na quantificação da energia perdida na forma desse gás. O  $\text{CH}_4$  é utilizado no cálculo do balanço energético e influencia a produção de calor metabólico (Reynolds et al., 2000) e, recentemente, vem sendo avaliado com foco mais voltado às questões ambientais que envolvem gases de efeito estufa e mudanças climáticas.

Os métodos de medição de  $\text{CH}_4$  têm sido utilizados para avaliação de dietas e aditivos antimetanogênicos, estratégias de mitigação, seleção genética para menor emissão e para elaboração de inventários, ciclo de vida e pegada de carbono de produtos pecuários (Hammond et al., 2016; Gidlund et al., 2017; Carvalho et al., 2018; Richardson et al., 2019; Costa et al., 2020; Cunha et al., 2016). Existem diversas metodologias sendo testadas para quantificar a emissão de  $\text{CH}_4$  entérico.

A câmara respirométrica, técnica reconhecida como padrão ouro na avaliação da produção de gases em ruminantes, possui diferentes tipos: as de circuito fechado e aberto. Nas câmaras de circuito fechado, o ar que é recirculado, passa por absorventes de  $\text{CO}_2$  e umidade. Além disso, são adicionados novas quantidades de  $\text{O}_2$  puro, fazendo a substituição do ar que foi utilizado pelo animal, mantendo a composição do ar em níveis normais (Resende et al., 2006). Nas câmaras de circuito aberto, o ar externo que circula dentro delas é amostrado e analisado na entrada. Após análise, com a quantidade de ar conhecida, é possível calcular a composição dos gases  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  produzidas e a

concentração de O<sub>2</sub> consumida (Resende et al., 2006). Por ser uma técnica precisa e acurada, também possibilita a realização de estudos detalhados de bionergética que são importantes para a avaliação de alimentos, metabolismo e avaliação das exigências nutricionais de energia pelos animais. É uma técnica de elevado custo (mão-de-obra, estrutura laboratorial e equipamentos) que requer manutenção cuidadosa (Machado et al., 2016). No entanto, apresenta limitações de capacidade analítica, geralmente permitindo a avaliação de apenas um animal por câmara/dia (Rodriguez, et al., 2006). Nesse contexto, técnicas fundamentadas em mensurações baseada em coletas de curta duração têm sido desenvolvidas e avaliadas (Ricci et al., 2014; Oss et al., 2016; Huhtanen et al., 2019)

A utilização da máscara facial para aferições de curta duração das trocas gasosas, pode ser opção de menor custo e de maior capacidade analítica, podendo envolver a avaliação em rebanhos comerciais. Alguns trabalhos têm buscado avaliar a aplicabilidade, viabilidade, acurácia e precisão de métodos baseados em coletas de curta duração por amostradores de gases ou máscara facial (Hammond et al., 2016; Oss et al., 2016). Os primeiros estudos com a metodologia da MF, iniciaram-se em 1937, com o intuito de estimar a produção de CH<sub>4</sub> com base em coletas de curta duração (*spot*) (Washburn e Brody, 1937). O princípio é similar à técnica da câmara respirométrica. No entanto, apresentava baixo custo comparada à metodologia padrão, permite a obtenção de respostas rápidas baseadas em mensurações de curta duração, além de possibilitar mensurações em maior número de animais por dia. No Brasil, uma das principais vantagens em validar a técnica é a possibilidade de gerar informações para animais ou rebanhos mantidos em sistemas de produção a pasto. Pesquisas realizadas por Oss et al., (2016) em animais em confinamento, utilizaram a coleta de gases 4h. após a alimentação com máscara facial em estudo de comparação de técnicas para mensuração de gases em ruminantes. Esses autores encontraram similaridade dos resultados obtidos em câmara respirométrica, técnica do gás traçador (SF<sub>6</sub>) e máscara facial.

Existem outras metodologias de avaliação de gases de curta duração que têm sido testadas, como o detector de CH<sub>4</sub> a laser (Vrancken et al., 2019), o *Green Feed* (Garnsworthy et al., 2019) e ainda métodos indiretos como a espectroscopia de infravermelho médio (MIR) em amostras de leite (Vanlierde et al., 2018). O detector de CH<sub>4</sub> a laser consiste na mensuração da concentração de CH<sub>4</sub> ,manualmente, por meio de pistola posicionada a de 1 a 3 m de distância do animal. A coleta dos dados é realizada pelo aparelho a laser e ocorre em curtos períodos de tempo, os dados obtidos constituem

uma série de picos que representam o ciclo respiratório do animal. Estudos sugerem que essa técnica tem potencial de fornecer informações detalhadas sobre como o CH<sub>4</sub> é liberado pelos ruminantes em curtos períodos de tempo (Ricci et al., 2014).

O *GreenFeed* (GF) (C-Lock Inc., Rapid City, Dakota do Sul, EUA) utiliza a medição de curta duração em sistemas de alimentação com auxílio de sensores acoplados, que medem o fluxo de ar e a concentração dos gases. O sistema GF tem a capacidade de mensurar a emissão de CH<sub>4</sub> em rebanhos, além de não ser uma técnica com elevados custos (Hammond et al., 2016). Huhtanen et al. (2019) . Desenvolveram estudo para comparar as mensurações realizadas pelo sistema GF com equações de predição para produção de metano entérico em câmaras respirométricas e encontraram concordância com os valores gerados pelos modelos, sugerindo que a emissão entérica de CH<sub>4</sub> pode ser medida por esse dispositivo.

A utilização da espectroscopia de infravermelho médio (MIR) tem potencial para estimar a produção individual de metano pelos bovinos em rebanhos leiteiros. O CH<sub>4</sub> é predito com base em espectroscopia em amostras de leite, podendo ser empregado em larga escala para gerar valores estimados de produção individual de CH<sub>4</sub> (Soyeurt et al., 2006). Vanlierde et al., (2016) Avaliaram a predição de metano pelo uso do MIR no leite para desenvolver equações com potencial para uso em programas de fenotipagem de alto desempenho. Concluíram que a metodologia apresentou baixo custo e foi capaz de identificar vacas com fenótipo de baixa emissão de CH<sub>4</sub>.

Em animais a pasto, algumas tecnologias são baseadas no método de Covariância de Vórtices Turbulentos ou “*eddy covariance*”, que propicia uma medida direta da quantidade absorvida ou emitida de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), vapor d’água e calor entre uma superfície com vegetação e a atmosfera, além da utilização do analisador de metano (PICARRO G2311-f, PICARRO Inc., USA). Dumortier et al., (2017). Avaliaram a viabilidade de estimar as emissões de metano em áreas sob pastejo intensivo. Esses autores observaram que as mensurações tiveram alta variabilidade devido à dificuldade de captação dos gases pela movimentação dos animais.



## REFERÊNCIAS

AKANMU, A. M., HASSEN, A., & ADEJORO, F. A. Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. **Animals**, *10*(1), (2020).

AR4 Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change — IPCC. (n.d.). Retrieved April 30, 2020.

AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014 — IPCC. (n.d.). Retrieved April 30, 2020.

ARMSBY, H. P. (1903). The principles of animal nutrition. **The principles of animal nutrition**. (1st ed.).

ARCHIMÈDE, H., EUGÈNE, M., MARIE MAGDELEINE, C., BOVAL, M., MARTIN, C., MORGAVI, D. P., LECOMTE, P., & DOREAU, M. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, *166–167*, 59–64, (2011).

AUCLAIR-RONZAUD, J., BENOIST, S., DUBOIS, C., FREJAVILLE, M., JOUSSET, T., JAFFRÉZIC, F., WIMEL, L., & CHAVATTE-PALMER, P. No-Contact Microchip Monitoring of Body Temperature in Yearling Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, *86*, (2020).

BARNOSKY, A. D. Megafauna biomass tradeoff as a driver of Quaternary and future extinctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *105*(SUPPL. 1), 11543–11548, (2008).

BERCKMANS, D. General introduction to precision livestock farming. **Animal Frontiers**, *7*(1), 6–11, (2017).

BEWLEY, J. M., GROTT, M. W., EINSTEIN, M. E., SCHUTZ, M. M. Impact of intake water temperatures on reticular temperatures of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *91*(10), 3880–3887, (2008).

BLIGH, J. Comparison of Rectal and Deep Body Temperature in the Calf. **Nature** *176*, 402–403 (1955).

Børsting, C. F., Brask, M., Hellwing, A. L. F., Weisbjerg, M. R., & Lund, P. Enteric methane emission and digestion in dairy cows fed wheat or molasses. **Journal of Dairy Science**, *103*(2), 1448–1462, (2020).

Brasil. Intended Nationally Determined Contribution Towards Achieving the Objective of the United Nations Framework Convention on Climate Change - iNDC. Brasília. 2015.

Burfeind, O., von Keyserlingk, M. A. G., Weary, D. M., Veira, D. M., & Heuwieser, W. Short communication: Repeatability of measures of rectal temperature in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, (2010).

Collier, R. J., Dahl, G. E., & VanBaale, M. J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 89(4), 1244–1253, (2006).

Cabanac, M. Adjustable set point: To honor Harold T. Hammel. **Journal of Applied Physiology** 100, 1338–1346 (2006).

Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. **Physiological Reviews** ;9(3):399–431, 1929.

CARVALHO, P. H. A., BORGES, A. L. C. C., SILVA, R. R., LAGE, H. F., VIVENZA, P. A. D., RUAS, J. R. M., FACURY FILHO, E. J., PALHANO, R. L. A., GONÇALVES, L. C., BORGES, I., SALIBA, E. O. S., JAYME, D. G., CARVALHO, A. Ú. Energy metabolism and partition of lactating Zebu and crossbred Zebu cows in different planes of nutrition. **PLOS ONE**, 13(8), (2018).

CHAGUNDA, M. G. G., YAN, T. Do methane measurements from a laser detector and an indirect open-circuit respiration calorimetric chamber agree sufficiently closely? **Animal Feed Science and Technology**, 165(1–2), 8–14, (2011).

CHAGUNDA, M. G. G., ROSS, D., ROOKE, J., YAN, T., DOUGLAS, J. L., PORET, L., MCEWAN, N. R., TEERANAVATTANAKUL, P., ROBERTS, D. J. Measurement of enteric methane from ruminants using a hand-held laser methane detector. **Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences**, 63(2), 68–75. (2013).

COSTA, H., SALIBA, E., BOMFIM, M., LANA, Â. M., BORGES, A. L., LANDIM, A., MOTA, C., TONUCCI, R., FACIOLA, A. P. Sheep methane emission on semiarid native pasture potential impacts of either zinc sulfate or propylene glycol as mitigation strategies. **Animals**, 10(3). (2020).

DIJKSTRA, J. (Jan), FORBES, J. M. (JOHN M., e FRANCE, J. (n.d.). Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolismo, 2005.

DOYLE, N., MBANDLWA, P., KELLY, W. J., ATTWOOD, G., LI, Y., ROSS, R. P., STANTON, C., & LEAHY, S. Use of Lactic Acid Bacteria to Reduce Methane Production in Ruminants, a Critical Review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2207). **Frontiers Media S.A**, (2019).

Dumortier, P., Aubinet, M., Beckers, Y., Chopin, H., Debaq, A., Gourlez de la Motte, L., Jérôme, E., Wilmus, F., & Heinesch, B. Methane balance of an intensively grazed pasture and estimation of the enteric methane emissions from cattle. **Agricultural and Forest Meteorology**, 232, 527–535, (2017).

Eckard, R. J., Grainger, C., & de Klein, C. A. M. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, 130(1–3), 47–56, (2010).

FAOSTAT. (2016). Retrieved April 29, 2020, from <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

FRANKENBERG, C., ABEN, I., BERGAMASCHI, P., DLUGOKENCKY, E. J., VAN HEES, R., HOUWELING, S., VAN DER MEER, P., SNEL, R., & TOL, P. Global column-averaged methane mixing ratios from 2003 to 2009 as derived from SCIAMACHY: Trends and variability. *Journal of Geophysical Research*, 116(D4), (2011).

FRANZLUEBBERS, A. J. Cattle grazing effects on the environment: Greenhouse gas emissions and carbon footprint. In *Management Strategies for Sustainable Cattle Production in Southern Pastures* (pp. 11–34). **Elsevier**, (2019).

GERBER, PJ, STEINFELD, HENDERSON, MOTTET, OPIO, DIJKMAN, FALCUCCI, & TEMPIO. *A global Assessment of emissions And mitigation opportunities*. [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications), (2013).

Gidlund, H., Hetta, M., & Huhtanen, P. Milk production and methane emissions from dairy cows fed a low or high proportion of red clover silage and an incremental level of rapeseed expeller. **Livestock Science**, 197, 73–81, (2017).

GIRO, A., BERNARDI, A.C. de C., BARIONI JUNIOR, W., LEMES, A.P., BOTTA, D., ROMANELLO, N., BARRETO, A. do N., GARCIA, A.R., Application of microchip and infrared thermography for monitoring body temperature of beef cattle kept on pasture. **Journal of Thermal Biology** , 2019.

Hammond, K. J., Waghorn, G. C., & Hegarty, R. S. The GreenFeed system for measurement of enteric methane emission from cattle. **Animal Production Science**, 56(3), 181–189, (2016).

HILL, T. M., BATEMAN, H. G., SUAREZ-MENA, F. X., DENNIS, T. S., & SCHLOTTERBECK, R. L. Short communication: Changes in body temperature of calves up to 2 months of age as affected by time of day, age, and ambient temperature. **Journal of Dairy Science**, 99(11), 8867–8870, (2016).

HOCKSTAD, L., & HANEL, L. *Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks*, (2018).

HOOK, S. E., WRIGHT, A. D. G., & MCBRIDE, B. W. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, (2010).

HUHTANEN, P., RAMIN, M., & HRISTOV, A. N. Enteric methane emission can be reliably measured by the GreenFeed monitoring unit. **Livestock Science**, 222, 31–40, (2019).

IWASAKI, W., ISHIDA, S., KONDO, D., ITO, Y., TATENO, J., TOMIOKA, M., Monitoring of the core body temperature of cows using implantable wireless thermometers. **Computation Electronic Agricultural**, 2019.

JAMI, E., & MIZRAHI, I. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. **PLOS ONE**, 7(3), (2012).

JESSEN, C., & JESSEN, C. Introduction. In *Temperature Regulation in Humans and Other Mammals* (pp. 1–6). **Springer Berlin Heidelberg**, (2001).

JOHNSON, K. A., & JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, 73(8), 2483–2492, (1995).

KELLNER, O. J. **Scientific Feeding Of Animals**, (1909).

KESSEL, J. VAN, FUNCTION, J. R.-P. . . C. on R., undefined. (n.d.). The effect of pH on in vitro methane production from ruminal bacteria, 1995.

KLIEM, K. E., HUMPHRIES, D. J., KIRTON, P., GIVENS, D. I., & REYNOLDS, C. K. Differential effects of oilseed supplements on methane production and milk fatty acid concentrations in dairy cows. **Animal**, 13(2), 309–317, (2019).

KNAPP, J. R., LAUR, G. L., VADAS, P. A., WEISS, W. P., & TRICARICO, J. M. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 97, Issue 6, pp. 3231–3261). **Elsevier**, (2014).

LEE, Y., BOK, J.D., LEE, H.J., LEE, H.G., KIM, D., LEE, I., KANG, S.K., CHOI, Y.J., Body temperature monitoring using subcutaneously implanted thermo-loggers from holstein steers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**. 29, 299–306, 2016.

MACAULAY, A. S., G. L. HAHN, D. H. CLARK, and D. V. SISSON. Comparison of calf housing types and tympanic temperature rhythms in Holstein calves. **Journal of Dairy Science**. 78:856–862, 1995.

MCALLISTER, T. A., OKINE, E. K., MATHISON, G. W., & CHENG, K.-J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane. **Production in ruminants microbiological aspects of methane production in ruminants**, (1995).

MCGINN, S. M., BEAUCHEMIN, K. A., IWAASA, A. D., & MCALLISTER, T. A. Assessment of the Sulfur Hexafluoride (SF<sub>6</sub>) Tracer Technique for Measuring Enteric Methane Emissions from Cattle . **Journal of Environmental Quality**, 35(5), (2006).

MOSS, A., JOUANY, J.-P., NEWBOLD, J., & MOSS, A. R. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. 49(3), 231–253, (2000).

Murray, R. M., Bryant, A. M., & Leng, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, 36(1), 1–14, (1976).

NASCIMENTO, F.G. O., RODRIGUES, G.M., GUIMARÃES, E.C., NASCIMENTO, What is the best temperature-humidity index equation to indicate heat stress in crossbred dairy calves in a tropical environment? **Ciência Rural** 49, 2019.

NOGUEIRA, R. G. S., PERNA JUNIOR, F., PEREIRA, A. S. C., CASSIANO, E. C. O., CARVALHO, R. F., & RODRIGUES, P. H. M. Methane mitigation and ruminal fermentation changes in cows fed cottonseed and vitamin E. **Scientia Agricola**, 77(6), (2020).

OSS, D. B., MARCONDES, M. I., MACHADO, F. S., PEREIRA, L. G. R., TOMICH, T. R., RIBEIRO, G. O., CHIZZOTTI, M. L., FERREIRA, A. L., CAMPOS, M. M., MAURÍCIO, R. M., CHAVES, A. V., & MCALLISTER, T. A. An evaluation of the face mask system based on short-term measurements compared with the sulfur hexafluoride

(SF6) tracer, and respiration chamber techniques for measuring CH<sub>4</sub> emissions. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 49–57, (2016).

PENG, D., CHEN, S., LI, G., CHEN, J., WANG, J., & GU, X. Infrared thermography measured body surface temperature and its relationship with rectal temperature in dairy cows under different temperature-humidity indexes. *International Journal of Biometeorology*, 63(3), 327–336, (2019).

QUIMBY, J. M., OLEA-POPELKA, F., & LAPPIN, M. R. Comparison of digital rectal and microchip transponder thermometry in cats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, (2009).

RICHARDSON, I., DUTHIE, C. A., HYSLOP, J., ROOKE, J., & ROEHE, R. Nutritional strategies to reduce methane emissions from cattle: Effects on meat eating quality and retail shelf life of loin steaks. *Meat Science*, 153, 51–57, (2019).

ROY, K. S., and R. J. COLLIER. Regulation of acclimation to environmental stress. Pages 49–64. *Environmental Physiology of Livestock*. 1st ed. R. J. Collier, ed. John Wiley & Sons, Chichester, 2012.

SAUNOIS, M., STAVERT, A. R., POULTER, B., BOUSQUET, P., CANADELL, J. G., JACKSON, R. B., RAYMOND, P. A., DLUGOKENCKY, E. J., HOUWELING, S., PATRA, P. K., CIAIS, P., ARORA, V. K., BASTVIKEN, D., BERGAMASCHI, P., BLAKE, D. R., BRAILSFORD, G., BRUHWILER, L., Carlson, K. M., CARROL, M., ZHUANG, Q. The Global Methane Budget. *Earth System Science Data Discussions*, 1–138, (2019).

SILVEIRA, S. R., TERRY, S. A., BIFFIN, T. E., MAURÍCIO, R. M., PEREIRA, L. G. R., FERREIRA, A. L., RIBEIRO, R. S., SACRAMENTO, J. P., TOMICH, T. R., MACHADO, F. S., CAMPOS, M. M., GAMA, M. A. S., & CHAVES, A. V. Replacement of Soybean Meal With Soybean Cake Reduces Methane Emissions in Dairy Cows and an Assessment of a Face-Mask Technique for Methane Measurement. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 295, 2019.

SOYEURT, H., DARDENNE, P., DEHARENG, F., LOGNAY, G., VESELKO, D., MARLIER, M., BERTOZZI, C., MAYERES, P., & GENGLER, N. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3690–3695, (2006).

TAPIO, I., SNELLING, T. J., STROZZI, F., & WALLACE, R. J. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (Vol. 8, Issue 1, p. 7), 2017.

TEIXEIRA, V.A., COELHO, S.G., TOMICH, T.R., PACHECO RODRIGUES, J.P., CAMPOS, M.M., MACHADO, F.S., GUALBERTO BARBOSA da SILVA, M.V., MONTEIRO, G.A., RIBEIRO PEREIRA, L.G. Reproductive characteristics of bulls from two breed compositions and their correlations with infrared thermography. *Journal of Thermal Biology*, 2019.

TOMSCHY R., HERRY M., SAMMER G., KLEMENTSCHITZ R., RIEGLER S., FOLLMER R., GRUSCHWITZ D., JOSEF F., GENSASZ S., KIRNBAUER R., S. T., ELEKTROFAHRZEUGE, F., PÖTSCHER, F., Winter, R., PÖLZ, W., LICHTBLAU,

G., SCHREIBER, H., KUTSCHERA, U., NIEDERTSCHEIDER, M., Haas, W., GÖRG, C., ROGELJ, J., DEN ELZEN, M., HÖHNE, N., FRANSEN, T., FEKETE, H., WINKLER, H., SCHAEFFER, R., SHA, F., MEINSHAUSEN, M. Elfter Umweltkontrollbericht Umweltsituation in Österreich. **Nature**, (2016).

VAN ASSELDONK, M. A. P. M., JALVINGH, A. W., HUIRNE, R. B. M., & DIJKHUIZEN, A. A. Potential economic benefits from changes in management via information technology applications on Dutch dairy farms: A simulation study. **Livestock Production Science**, *60*(1), 33–44, (1999).

VAN GASTELEN, S., DIJKSTRA, J., & BANNINK, A. Are dietary strategies to mitigate enteric methane emission equally effective across dairy cattle, beef cattle, and sheep? **Journal of Dairy Science**, *102*(7), 6109–6130, (2019).

VANLIERDE, A., SOYEURT, H., GENGLER, N., COLINET, F. G., FROIDMONT, E., KREUZER, M., GRANDL, F., BELL, M., LUND, P., OLIJHOEK, D. W., EUGÈNE, M., MARTIN, C., KUHLA, B., & DEHARENG, F. Short communication: Development of an equation for estimating methane emissions of dairy cows from milk Fourier transform mid-infrared spectra by using reference data obtained exclusively from respiration chambers. **Journal of Dairy Science**, *101*(8), 7618–7624, 2018.

WOLF, J., ASRAR, G. R., & WEST, T. O. Revised methane emissions factors and spatially distributed annual carbon fluxes for global livestock. **Carbon Balance and Management**, *12*(1), 16, (2017).

## II – OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar metodologias alternativas para fenotipagem de alto desempenho quanto à temperatura *core* e à emissão de CH<sub>4</sub> em bovinos leiteiros.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### **Capítulo I:**

Avaliar o melhor local de implante de microchip com sensor de temperatura em bezerros lactentes com base na avaliação de modelos de predição que incluem ou não condições climáticas como variáveis preditivas.

#### **Capítulo II:**

Comparar as mensurações de CH<sub>4</sub> obtidas pela câmara respirométrica (CR) 20h. de avaliação com e pela máscara facial (MF) durante 30 minutos, quatro horas após a alimentação.

Avaliar o potencial de utilização das subamostragens na CR (240, 260, 640, 660 e 680min após a alimentação) para verificar o horário mais apropriado de avaliação da emissão de CH<sub>4</sub> com uso da MF.

### III – HIPÓTESES

#### **Capítulo I:**

O Microchip Biothermo é capaz de estimar com acurácia e precisão a temperatura *core* nos locais de implante em bezerros lactentes.

#### **Capítulo II:**

A técnica da máscara facial estima de forma precisa e acurada a emissão de metano entérico por vacas leiteiras em lactação.



## IV - CAPÍTULO I

### Seleção de locais para implante de microchip para predição da temperatura *core* em bezerros jovens

#### PONTOS DE DESTAQUE

Temperatura *core* é um importante parâmetro para monitorar a saúde de bezerros.

A utilização de termômetros convencionais é de difícil aplicação em larga escala.

Os microchips com sensores de temperatura podem ser uma alternativa para predizer a temperatura *core*.

Os melhores locais para o implante de microchips em bezerros ainda não são conhecidos.

O implante de microchip na base da cauda permite predizer a temperatura *core*.

#### RESUMO

Implantes de microchips com sensores de temperatura podem automatizar as mensurações de temperatura *core* em bezerros e o melhor local para implante ainda não é conhecido. A acurácia e precisão das predições de temperatura *core* baseadas em dados obtidos pelos microchips precisam ser investigados. O objetivo desse estudo foi o de investigar o melhor local para implante de microchips para monitorar a temperatura *core* em bezerros leiteiros. Dezesete bezerros ( $32.2 \pm 5.2$  Kg de peso corporal), Holandês x Gir foram utilizados e os microchips, implantados quatro dias após o nascimento. Os locais de implante foram: base da orelha, base da cauda e umbigo (implantes subcutâneos), pescoço (músculo cleidocefálico) e perna (músculo gracilis) (implantes intramusculares). A temperatura retal (TR, °C) foi obtida por meio do termômetro clínico digital, metodologia considerada como referência para a temperatura *core*. A temperatura do ar (TA, °C), umidade relativa do ar (UR, %) e o índice de temperatura e umidade (ITU) foram avaliados no mesmo momento que a temperatura retal e a mensuração da temperatura dos microchips durante 56 dias. As faixas da TA, UR e ITU durante o experimento variaram de 7.6 a 34.4°C, 17.5 a 99.0% e 50.6 a 91.5 respectivamente. A média da temperatura para o reto, orelha, pescoço, base da cauda, perna e umbigo foram 38.7; 36.9; 38.0; 37.0, 37.8 e 37.0°C respectivamente. Os implantes intramusculares

(pescoço e perna) tiveram valores próximos ao do reto. As correlações das temperaturas entre RT e orelha, pescoço, base da cauda, perna e umbigo foram 0.56, 0.60, 0.60, 0.53 e 0.48, respectivamente. A predição da temperatura retal baseada na aferição do microchip teve moderada precisão ( $r_c = 0.49$  a  $0.60$ ) e alta acurácia ( $C_b = 0.79$  a  $0.88$ ). a inclusão da TA, UR e ITU como variáveis preditoras nos modelos diminuiu o erro médio absoluto (23%) e aumentou a precisão (21.3%) e acurácia (10.2%). O coeficiente de correlação e concordância e o erro quadrático médio para as equações usando a base da cauda e o pescoço foram 0.68 e 0.67. e 0.29 e 0.28°C respectivamente. A base da cauda é o local mais promissor para o implante do microchip para predizer e monitorar a temperatura core em bezeros jovens. A inclusão da temperatura do ar como variável preditora nos modelos é recomendada.

**PALAVRAS-CHAVE:** pecuária de precisão, saúde animal, sensores, temperatura corporal

## INTRODUÇÃO

A temperatura corporal dos animais é afetada pelo clima e pelas condições fisiológicas (Collier et al., 2006) e um dos principais indicadores de saúde para bezerros (Adams et al., 2013). Temperaturas anormais são utilizadas para identificar doenças e podem garantir recuperação e prevenir a disseminação para os outros animais do rebanho. A temperatura retal (TR) é o método padrão de mensuração da temperatura core. A TR é obtida por meio de termômetro clínico inserido na ampola retal. Esse procedimento é laborioso e propenso a erros de mensuração relacionados com a qualidade do termômetro, erros na posição do dispositivo e falhas humanas.

A manipulação dos animais para a mensuração da temperatura pode ser estressante (Burfeind et al., 2010), além de ser fonte de disseminação de doenças infecciosas e de agentes parasitários. O aumento do rebanho leiteiro tem dificultado as práticas de manipulação para aferição da temperatura core usando o termômetro convencional. Pesquisas de alternativas automatizadas para mensuração de temperatura têm sido citadas por diversos grupos de pesquisa (Giro et al., 2019; Hill et al. 2016; Iwasaki et al., 2019; Lee et al., 2016; Teixeira et al., 2019, and Woodrum Setser et al., 2020). Diversas ferramentas têm sido utilizadas para mensuração da temperatura core em bezerros. Hill et al., (2016) utilizaram o data logger afixado na pele da cauda e mostraram um aumento de 0.03°C para cada 1°C de mudança na temperatura ambiente.

O implante de microchip em animais pet (Quimby et al., 2009) e equinos (Auclair-Ronzaud et al., 2020) tem sido utilizados para automatizar as mensurações. Entretanto, em ruminantes esses dispositivos têm sido utilizados para novilhas (Reid et al., 2012), vacas leiteiras (Iwasaki et al., 2019) e cabras (Torrao et al., 2011), mas ainda em escala experimental. Woodrum Setser et al. (2020) avaliaram o desempenho dos microchips na orelha, na escápula e no músculo trapézio para predizer a temperatura core em bezerros leiteiros. Esses autores concluíram que as mensurações realizadas pelos microchips nesses locais não podem ser utilizadas para predizer a temperatura retal. Novos locais como o umbigo, base da cauda e outros músculos devem ser investigados como possíveis estratégias para solucionar essa limitação. Adicionalmente, a inclusão da TA, UR e ITU como variáveis preditoras pode melhorar a eficiência dos modelos de predição da TR baseados na aferição das temperaturas dos microchips.

O objetivo foi o de avaliar locais para implante do microchip em bezerros jovens como ferramenta para estimar a TR, combinando ou não com as variáveis climáticas como preditoras.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local e manejo dos animais

O experimento foi realizado na Embrapa Gado de leite em Coronel Pacheco-Minas Gerais, Brasil. Os procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Embrapa Gado de Leite - CEUA/EGL n°907825118. Dezesete bezerros Holandês x Gir, machos com  $32.2 \pm 5.2$ kg peso vivo no início do experimento foram utilizados.

Os animais foram alojados em galpão coberto, em baias individuais com camas de areia (1,25 x 1,75 m), contidos por correntes de 1,2 m de comprimento. Os bezerros receberam 10% do peso vivo (PV) de colostro e foi realizada a cura do umbigo com solução de iodo a 10% nos dois primeiros dias. Do segundo ao terceiro dia de idade foram alimentados com 5 litros de leite de transição, divididos em duas refeições oferecidas às 8h e às 16 h.

Durante o período experimental (quarto aos 60º dias), os animais receberam 5 litros de sucedâneo de leite (Kalvolak, Nutrifeed, Amersfoort, Holanda) reconstituído com 15% (base na matéria seca), divididos em duas refeições oferecidas às 8h. e às 16h. A água e o concentrado (Soymax Rumen pré-inicial Floculado, Total Alimentos, Três Corações, Brasil) foram oferecidos *ad libitum*.

### 2.2. Implante do microchip e mensuração de temperatura

A cápsula de vidro e biocompatível Bio-Thermo microchip (LifeChip® with Bio-Thermo™ Technology, Destron Fearing™, Langeskov, Denmark) foi utilizada para aferição da temperatura local. Esse dispositivo é um transponder com uma bobina eletromagnética e um biossensor de temperatura embutido que funciona como identificação passiva de radiofrequência (RFID). O leitor Allflex RS420 (Allflex - Sistemas de Identificação Animal Ltda, Joinville, Brasil) foi usado para leitura da mensuração da temperatura nos locais e a identificação de cada animal. As temperaturas retais foram mensuradas simultaneamente. O implante do microchip foi realizado no quarto dia de vida, utilizando uma seringa especial com o dispositivo acoplado no seu interior. Os locais implantados foram: base da orelha, base da cauda e umbigo (implantes subcutâneos), pescoço (músculo cleidocefálico) e perna (músculo gracilis) (implantes intramusculares).

A temperatura retal foi obtida pelo termômetro digital *Domotherm* (Incoterm, Porto Alegre, Brasil, capaz de mensurar temperaturas de 32.0 a 44.0°C) como descrito

por Dirksen et al. (1993). Ambas as medidas (temperatura retal e leitura dos microchips) ocorreram duas vezes ao dia, às 6h e às 14h.

A (TA, °C), (UR, °C) e o (ITU) foram mensurados utilizando Termo Higrômetro Digital sem Cabo (Supermedy<sup>®</sup>, São Paulo, São Paulo) no mesmo momento da mensuração da temperatura pelo chip. O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado com base nos valores de TA e UR (Thom, 1959) através da fórmula:

$$THI = \left( 0.8 \times Ta + \left( \frac{RH}{100} \right) \times (Ta - 14.4) + 46.4 \right) \quad (1)$$

onde Ta é a temperatura do ar (°C) e RH é a umidade relativa do ar (%).

### 2.3 Análise Estatística

A comparação das temperaturas retal e as obtidas no microchip foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS (9.4) de acordo com o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + L_i + \delta_j + \gamma_{jk} + \vartheta_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que  $Y_{ijk}$  é a observação  $ijk$ ,  $\mu$  é a média geral,  $L_i$  é o efeito fixo da mensuração da temperatura no local,  $\delta_j$  é o efeito aleatório do animal  $j$ ,  $\gamma_{jk}$  é o efeito aleatório do dia  $k$  dentro de animal  $j$ ,  $\vartheta_{kl}$  é o efeito aleatório de tempo  $l$  dentro de dia  $k$ , e  $\varepsilon_{ijk}$  é o efeito aleatório do erro  $\sim NID(0, \sigma^2)$ . Os dados foram analisados como medidas repetidas multivariadas, usando o Kronecker  $UN \otimes CS$  como estrutura de covariância (Galecki, 1994). As médias dos mínimos quadrados foram comparadas pelo teste de *Dunnnett* com  $\alpha$  igual a 0,05 e temperatura retal como grupo controle.

O coeficiente de correlação entre as variáveis ambientais e as temperaturas foram avaliados de duas formas. Primeiro, a matriz do coeficiente de correlação de Pearson foi estimada usando todos os dados e todas as variáveis. Após esse procedimento, para investigar as correlações dentro dos animais, a correlação de todas as variáveis com a temperatura retal foi avaliada por animal e para obter uma comparação mais clara entre elas. Um intervalo de confiança de 95% foi estimado usando a transformação  $z$  de Fisher (Rödel, E. and Fisher, 1971) usando o procedimento CORR do SAS (9.4).

A análise de regressão foi conduzida utilizando a função *lm* do Software R (versão 3.6.1). Foi avaliada a possibilidade de estimar a temperatura retal de 20 modelos que incluíam ou não as variáveis climáticas e o ITU. Foram utilizados cinco modelos lineares simples, um para cada posicionamento do chip no animal, e outros 15 modelos combinando o posicionamento do chip com as variáveis ambientais e ITU e interações. A significância de cada inclinação foi avaliada considerando  $\alpha$  igual a 0,05. Quando a

interação não foi significativa ( $P > 0,05$ ), foi removido do modelo e avaliada uma equação sem intercepto; O método de eliminação foi usado e os efeitos foram removidos quando  $P > 0,05$ . Para evitar colinearidade entre preditores, os coeficientes de correlação de Pearson foram avaliados e, depois de a equação estimada, aqueles com fator de variação maior que 3 foram removidos. As métricas utilizadas para avaliação dos modelos foram o Coeficiente de Correlação de Concordância (CCC) (Lin, 1989), calculado usando o método assintótico do pacote DescTools (versão 0.99.29). O CCC foi decomposto em fator de correção de viés ( $C_b$ ) e o coeficiente de correlação entre os valores observados e os preditos ( $r_c$ ), que medem a acurácia e a precisão respectivamente. A raiz do erro médio quadrático (RMSE) e do erro absoluto médio (MAE) foi calculada usando o pacote de interpolação (versão 6.0-84). O erro quadrático médio (RMSE) e o erro absoluto médio (MAE) foram calculados por uma validação cruzada de 10 vezes repetida, cinco vezes usando o pacote circunflexo (versão 6.0-84). Para a análise gráfica de cada equação, os resíduos foram plotados em função dos valores previstos centrados.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Diferenças entre as temperaturas corporais nos locais

A amplitude de variação da temperatura do ar foi de 7.6 a 34.4°C, a de umidade relativa do ar foi de 17,5 a 99,0% e o ITU de 50.6 a 91.52 (Tabela 1), representando uma variação ampla que caracteriza situações neutras e de estresse térmico. As médias das temperaturas para o reto, base da orelha, pescoço, base da cauda, perna e umbigo foram 38.7; 36.9; 38.0; 37.0 e 37.8°C respectivamente (Tabela 1). A menor diferença comparando-se com a TR foi obtida para o pescoço (-0.71°C) e a maior para o implante no umbigo (-1.7°C, Tabela 1). As temperaturas obtidas no pescoço e na perna foram mais próximas da TR. Entretanto, todas as temperaturas obtidas pelos microchips foram menores ( $P < 0.05$ ) que a TR (Figura 2).

A TR mostrou um baixo desvio padrão (Tabela 1) comparada com as temperaturas dos microchips, independentemente do local de implantação. Em relação ao desvio padrão entre os cinco locais de implante do microchip, os menores valores numéricos das temperaturas dos microchips foram obtidos para o pescoço e para a perna.

#### 3.2 Correlação entre as temperaturas retal e as obtidas pelos microchips

As correlações entre a TR e as obtidas pelos microchips foram were 0.56, 0.60, 0.60, 0.53 e 0.48 para base da orelha, pescoço, base da cauda, perna e umbigo respectivamente (Figura 3).

Embora o implante na base da cauda tenha sido subcutâneo, a correlação com a TR (0.60) foi igual à correlação da TR e à temperatura obtida no microchip implantado no pescoço (0.60), sendo este intramuscular. A perna, outro local com implante intramuscular, apresentou baixa correlação com a TR (0.53), comparada com o pescoço e a base da cauda

Para todas as variáveis avaliadas, as estimativas de correlação e seus intervalos de confiança de 95% com a temperatura retal mostraram clara variabilidade entre os animais, especialmente para as temperaturas da orelha e do umbigo (Figure 4).

### **3.3 Estudo de Regressão entre as temperaturas obtidas no reto e as aferidas nos locais pelos microchips**

O desempenho dos modelos de predição da TR com base nas temperaturas do microchip, incluindo ou não variáveis ambientais, são apresentados na Tabela 2. Os modelos que não incluíram TA, UR ou ITU como variáveis preditivas apresentaram valores menores de  $r_c$ ,  $C_b$  e CCC. Além disso, a inclusão de TA, UR ou ITU como variáveis preditivas diminuiu os valores de RMSE e MAE (Tabela 2).

Os modelos desenvolvidos para o pescoço e para a base da cauda mostraram alta precisão ( $r_c = 0.60$ ) e acurácia ( $C_b = 0.88$ ). As estimativas de temperatura *core* obtidas pelos microchips mostraram  $C_b$  acima de 0.8, indicando alta acurácia de precisão dos modelos. O erro médio absoluto (MAE) variou de  $0.374^\circ\text{C}$  (umbigo sem as variáveis ambientais como preditores) até  $0.282^\circ\text{C}$  (base da cauda com a UR como variável preditiva).

Houve estabilidade dos resíduos ao longo da predição da temperatura retal (Figura 5). Além disso, foi observado homogeneidade das variâncias acima dos níveis dos valores preditos (Figure 5).

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Diferenças de temperaturas ao longo das mensurações nos locais de implante**

A ampla variação de TA, UR e ITU encontrada no presente estudo incluiu condições termoneutras e de estresse por calor, o que é desejável para o desenvolvimento de modelos de predição da temperatura *core* com base em dados de microchip. Tal

alcance melhorou a cobertura de utilização do modelo, que pode ser aplicado em sistemas de produção sob diferentes condições climáticas.

O ITU é usado para avaliar o conforto térmico dos animais. Valores acima de 72 podem causar estresse por calor em bovinos leiteiros (Ingraham et al., 1974). Os animais do presente estudo foram submetidos a ITU de 50,6 a 91,5 e TR variando de 37,0 a 40,5 ° C. Assim, o limiar fisiológico neutro térmico para bezerros jovens de 38 a 39,5 ° C obtido por termômetro clínico foi extrapolado (Nascimento et al. 2019).

As temperaturas retais ou auriculares são consideradas padrões de temperatura *core* em mamíferos, sendo utilizadas como referência para o desenvolvimento de métodos alternativos de medição. (Adams et al., 2013; Lee et al., 2016; Iwasaki et al., 2019; Woodrum Setser et al., 2020). Conforme mostrado em Taylor et al. (2014), há interferência do local de medição na avaliação da temperatura *core*, na da pele e na do tecido corporal, em humanos. Observamos o mesmo para bezerros jovens e, independentemente do local do implante do microchip, as temperaturas do microchip foram inferiores à TR obtida por um termômetro clínico.

Iwasaki et al. (2019) também apresentaram valores menores para as medidas obtidas pelos microchips, quando comparados à temperatura retal (35,73 vs. 36,68 ° C). Reid et al. (2012) relataram maiores diferenças entre TR (usando termômetro clínico) e temperatura dos implantes de microchips subcutâneos na base da orelha (1,7 ° C) e abaixo da prega umbilical (2,6 ° C) em bovinos. O sensor de contato colocado na base da cauda apresentou temperatura de 2 a 3 ° C menor que a temperatura retal em estudo realizado por Nogami et al. (2013). Diferenças entre TR e microchips implantados na orelha (2,73 ° C) também foram demonstradas por Giro et al. (2019) em bovinos de corte. Em nossos resultados, a diferença entre a temperatura média retal foi de  $0,73 \pm 1,53$  ° C, sugerindo limites estreitos de concordância entre os limites superior e inferior de concordância de 95%.

Os altos valores de SD para o microchip, em comparação com os dados do termômetro clínico, podem ser explicados pela menor precisão do biossensor e devido à alta influência de fatores externos como o contato das partes anatômicas com a cama de areia. Um SD mais alto para dados de microchip (0,93 e 1,12), em comparação com a temperatura retal (0,44 e 0,47) , também foi relatado por Iwasaki et al. (2019) e Giro et al. 2019 respectivamente.



#### 4.2. Correlação entre a temperatura retal e as medidas do microchips

As temperaturas do pescoço e da base da cauda apresentaram as mesmas correlações com a TR (0,60). Assim, como a base da cauda é mais superficial do que o pescoço, aquele é um local promissor para implantação de microchip, garantindo um processo de implantação e extração menos invasivo. Reid et al. (2012) relataram menores valores de  $r$  entre o TR e a temperatura dos implantes de microchips subcutâneos na base da orelha (0,21), linha média posterior à marrafa (0,16) e na base da prega umbilical (0,16). Além disso, Woodrum Setser et al., (2020) mostraram que a temperatura retal não foi correlacionada com a orelha, na escápula superior, no pescoço. Esses autores concluíram que a medida das temperaturas dos microchips depende do local do implante.

A variabilidade observada nas correlações das variáveis ambientais e temperaturas dos chips com a temperatura retal entre os animais pode ser um indicador de que outras características dos animais são relevantes para estimar a temperatura *core*. Embora os bezerros usados neste estudo fossem homogêneos, sugerimos uma investigação mais aprofundada das características morfológicas e estudos com maior variabilidade e caracterização de possíveis aspectos relevantes, como vento e atividade dos bezerros, para melhor entender a variabilidade entre os animais. A maior variabilidade observada para orelha e umbigo pode estar claramente associada à maior exposição física aos fatores ambientais. Animais com maiores correlações de temperatura retal com variáveis ambientais parecem também ter maiores correlações com temperaturas de chip, independentemente do local de amostragem (por exemplo, animais 1, 3, 4 e 5; Figura 4). O oposto também é válido para os animais 9, 11 e 15, que apresentaram correlações mais baixas para as variáveis ambientais e temperaturas do chip com as temperaturas retais (Figura 4). Essa consistência entre as variáveis dentro dos animais deve ser investigada em estudos futuros. Embora com valores observados mais baixos, Woodrum Setser et al. (2020) também observaram uma variabilidade representativa entre os animais para correlações da temperatura do chip com as temperaturas retais. Os autores também destacam que a variação individual deve ser considerada para melhorar as tecnologias de previsão de temperatura.

Diferentes temperaturas podem ser encontradas no corpo principalmente nos tecidos musculares que apresentam maior ou menor movimento como o músculo gracillis e o músculo cleidocefálico. Os tecidos em regiões superficiais são provavelmente mais afetados por TA e UR. Por outro lado, em nosso estudo, aqueles localizados mais profundamente como o pescoço, por exemplo, são afetados pelo metabolismo local e

influenciados pelo alto fluxo sanguíneo através do músculo e principalmente pela proximidade dos grandes vasos sanguíneos, ocorrendo mudanças de temperatura por dissipação de calor para e da periferia (Taylor et al., 2014). Woodrum Setser et al. (2020) relataram alta correlação entre as leituras dos microchips no pescoço e na orelha em bezerros, sugerindo que as temperaturas estavam relacionadas em locais próximos. Em nosso estudo, a localização próxima da base da cauda e do reto pode explicar a correlação desses locais de implantação ( $r = 0,60$ ). Correlações mais altas foram relatadas por Iwasaki et al., (2019), em que foram avaliados dez locais de implante (sete subcutâneos e três endocelíacos) em vacas leiteiras. Esses autores relataram alta correlação entre implantes endocelíacos e TR (0,74 a 0,76). Porém, para os implantes subcutâneos as correlações foram menores (-0,22 a 0,62), mas o microchip utilizado foi diferente do utilizado no presente estudo e por Woodrum Setser et al. (2020).

#### **4.3 Estudo de Regressão entre as temperaturas retais e as obtidas pelos microchips**

Os valores de  $r_c$  dos modelos aumentaram 21,2, 21,0 e 21,7% quando TA, UR ou ITU foram adicionados como variáveis preditivas. Para os locais do implante com os maiores valores de  $r_c$  (pescoço e base da cauda), a melhoria da precisão foi de 15 e 16% respectivamente; enquanto, para o umbigo foi de 30%, provavelmente devido à maior susceptibilidade à influência de fatores externos neste local. Para os locais com menores  $r_c$ , a inclusão de TA, UR e ITU como variáveis preditivas parece ser mais importante. Além disso, quando o ITU foi incluído como variável preditiva nos modelos, observou-se apenas 3% de melhora do  $r_c$ , em comparação com os modelos que incluem TA e UR como variáveis preditivas (21,0 vs 21,7%). Embora a inclusão de variáveis climáticas nos modelos seja importante, existem poucas diferenças sobre quais usar (TA, UR ou ITU).

Os modelos que incluem ou não TA, UR e ITU como variáveis preditivas apresentaram  $C_b$  acima de 0,8. A inclusão de TA, UR ou ITU como uma variável preditiva melhora a precisão do modelo em cerca de 10,0 a 10,4%, mas com menor magnitude em comparação com a melhoria da precisão em cerca de 21,0 a 21,7%. A maior melhora foi observada para a perna e umbigo (12 e 16% respectivamente), comparar ainda os efeitos da inclusão de TA e UR com o ITU como variável preditiva. A inclusão do ITU no modelo melhora a precisão de apenas 2%, quando comparado aos modelos com TA e UR. Os implantes da base do pescoço e cauda apresentaram os maiores valores de CCC, métricas que avaliam exatidão e precisão. A inclusão de TA, UR e ITU como variáveis preditivas aumentou os valores de CCC em 28,8%, 28,9% e 29,7%, enfatizando a importância de

incluí-los nos modelos de predição. A inclusão de TA, UR e ITU como variáveis preditivas reduziu o MAE em aproximadamente 20%. As diferenças entre os modelos ocorrem principalmente na redução da variância residual sobre os valores previstos devido à estabilidade dos resíduos juntamente com a previsão da temperatura retal (Figura 5).

Com base nas métricas de eficiência dos modelos (Tabela 4), os locais de implante de microchip mais promissores foram o pescoço e a base da cauda. A predição com base na temperatura do microchip da base da cauda, incluindo TA, UR e ITU como variável preditiva, era precisa e exata como as predições do pescoço, um local mais interno do corpo. A base da cauda é uma região mais superficial, fator que facilita a implantação e extração do dispositivo. De acordo com os resultados do presente trabalho, Iwasaki et al. (2019) e Nagomi et al. (2013) também apontaram a base da cauda como um local promissor para implantar ou usar um sensor de contato para monitorar a temperatura central em vacas e bezerros respectivamente. Além disso, em alguns países, a oclusão total da ampola retal é adotada como processo padronizado durante o abate. Por exemplo, no Brasil a base da cauda, incluindo a ampola retal, é direcionada ao toalete em frigoríficos, procedimento recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Brasil (Brasil, 1971). Esse procedimento pode ser importante para evitar a contaminação da carcaça e dos produtos cárneos com peças de microchip. Outra vantagem é um local de alto potencial para implantação de microchip para rastreabilidade e monitoramento da temperatura dos bezerros.

Os resultados do presente estudo mostraram o potencial de monitoramento da temperatura *core* de bezerros por meio de implantes de microchip com sensores de temperatura. No entanto, o uso comercial de implantes de microchip ainda apresenta limitações de uso para animais de fazenda. Assim, novos estudos voltados para o processo de retirada do dispositivo, migração do microchip no corpo e riscos de contaminação da carcaça devem ser realizados.

#### 4 CONCLUSÃO

As predições da temperatura *core* de bezerros por microchip apresentam alta acurácia e precisão moderada independentemente do local do implante. A inclusão da temperatura do ar, umidade relativa ou índice de temperatura e umidade como variáveis preditivas melhora a exatidão e precisão dos modelos. A maior exatidão e a precisão de predição da temperatura central via microchip foram obtidas na base da cauda e no

pescoço. O implante na base da cauda é menos invasivo e pode facilitar a implantação e a remoção do microchip durante o processo de abate.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores declaram não ter conflitos de interesses. Os autores agradecem à Agência Federal de Educação de Pós-Graduação (CAPES) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo financiamento e apoio.

## 6 REFERÊNCIAS

ADAMS, A.E., OLEA-POPELKA, F.J., ROMAN-MUNIZ, I.N. Using temperature-sensing reticular boluses to aid in the detection of production diseases in dairy cows. **Journal Dairy Science**, 2013.

AUCLAIR-RONZAUD, J., BENOIST, S., DUBOIS, C., FREJAVILLE, M., JOUSSET, T., JAFFRÉZIC, F., WIMEL, L., & CHAVATTE-PALMER, P. No-Contact Microchip Monitoring of Body Temperature in Yearling Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, 86, 102892, (2020).

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Exportação, 2007. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/empresario/copy\\_of\\_TOMODEBOVINO.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/empresario/copy_of_TOMODEBOVINO.pdf)

BURFEIND, O., VON KEYSERLINGK, M. A. G., WEARY, D. M., VEIRA, D. M., & HEUWIESER, W. Short communication: Repeatability of measures of rectal temperature in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, (2010).

COLLIER, R. J., DAHL, G. E., & VANBAALE, M. J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 89(4), 1244–1253, 2006.

DIRKSEN G. Sistema digestivo. In: Dirksen G, Grunder Hd, Stober M, editor. Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos Rio de Janeiro: Guanabara–Koogan; p. 167–169, 1993.

GALECKI, A. T. General class of covariance structures for two or more repeated factors in longitudinal data analysis. **Communications in Statistics - Theory and Methods**, 1994.

GIRO, A., BERNARDI, A.C. de C., BARIONI JUNIOR, W., LEMES, A.P., BOTTA, D., ROMANELLO, N., BARRETO, A. do N., GARCIA, A.R. Application of microchip and infrared thermography for monitoring body temperature of beef cattle kept on pasture. **Journal Thermal Biology**, 2019.

HILL, T. M., BATEMAN, H. G., SUAREZ-MENA, F. X., DENNIS, T. S., & SCHLOTTERBECK, R. L. Short communication: Changes in body temperature of calves

up to 2 months of age as affected by time of day, age, and ambient temperature. **Journal of Dairy Science**, 99(11), 8867–8870, 2016.

INGRAHAM, R.H., GILLETTE, D.D., WAGNER, W.D., Relationship of Temperature and Humidity to Conception Rate of Holstein Cows in Subtropical Climate. **Journal of Dairy Science**, 57, 476–481, 1974.

IWASAKI, W., ISHIDA, S., KONDO, D., ITO, Y., TATENO, J., TOMIOKA, M. Monitoring of the core body temperature of cows using implantable wireless thermometers. **Computation Electronic Agricultural**, 2019.

LEE, Y., BOK, J.D., LEE, H.J., LEE, H.G., KIM, D., LEE, I., KANG, S.K., CHOI, Y.J., Body temperature monitoring using subcutaneously implanted thermo-loggers from holstein steers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 29, 299–306, 2016.

Lin, L. I.-K. *A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility*. **Biometrics** 1989.

NASCIMENTO, F.G. de O., AGUIAR, H.C.P., RODRIGUES, G.M., GUIMARÃES, E.C., NASCIMENTO, M.R.B. de M., What is the best temperature-humidity index equation to indicate heat stress in crossbred dairy calves in a tropical environment? **Ciência Rural** 49, 2019.

NOGAMI, H., OKADA, H., MIYAMOTO, T., MAEDA, R., ITOH, T., Wearable and Compact Wireless Sensor Nodes for Measuring the Temperature of the Base of a Calf's Tail, **Sensors and Materials**, 2013.

QUIMBY, J. M., OLEA-POPELKA, F., & LAPPIN, M. R. Comparison of digital rectal and microchip transponder thermometry in cats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 2009.

REID, E.D., FRIED, K., VELASCO, J.M., DAHL, G.E. Correlation of rectal temperature and peripheral temperature from implantable radio-frequency microchips in holstein steers challenged with lipopolysaccharide under thermoneutral and high ambient temperatures. **Journal of Animal Science**, 2012.

TAYLOR, N.A.S., TIPTON, M.J., KENNY, G.P. Considerations for the measurement of core, skin and mean body temperatures. **Journal of Thermal Biology**, 2014.

TEIXEIRA, V.A., COELHO, S.G., TOMICH, T.R., PACHECO RODRIGUES, J.P., CAMPOS, M.M., MACHADO, F.S., GUALBERTO BARBOSA DA SILVA, M.V., MONTEIRO, G.A., RIBEIRO PEREIRA, L.G. Reproductive characteristics of bulls from two breed compositions and their correlations with infrared thermography. **Journal of Thermal Biology**, 2019.

THOM, E.C. *The Discomfort Index*. Weatherwise, 1959

TORRAO, N. A., HETEM, R. S., MEYER, L. C. R., & FICK, L. G. Assessment of the use of temperature-sensitive microchips to determine core body temperature in goats. **Veterinary Record**, 168(12), 328, 2011.

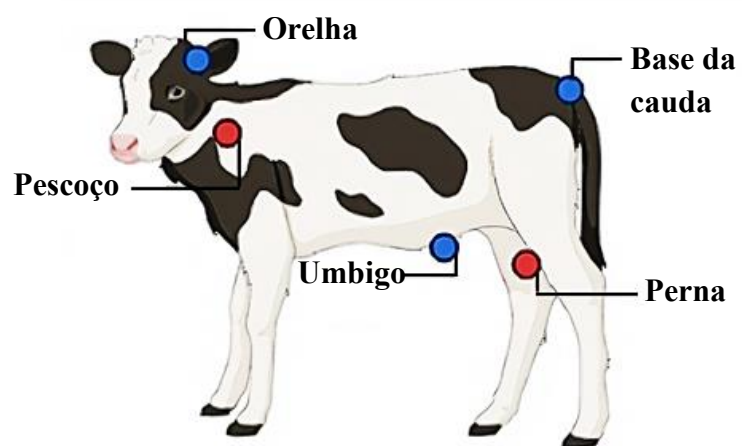


Figura 1. Subcutâneo (●) e intramuscular (●) locais de implantes do microchip

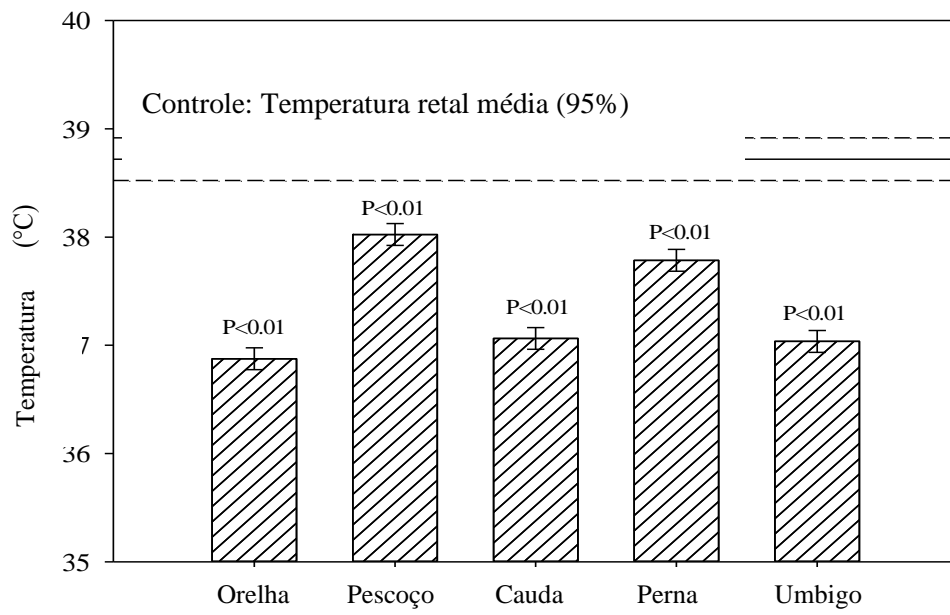


Figura 2. Comparação entre a temperatura observada no reto e nos diferentes locais de implante do microchip Bio-Thermo

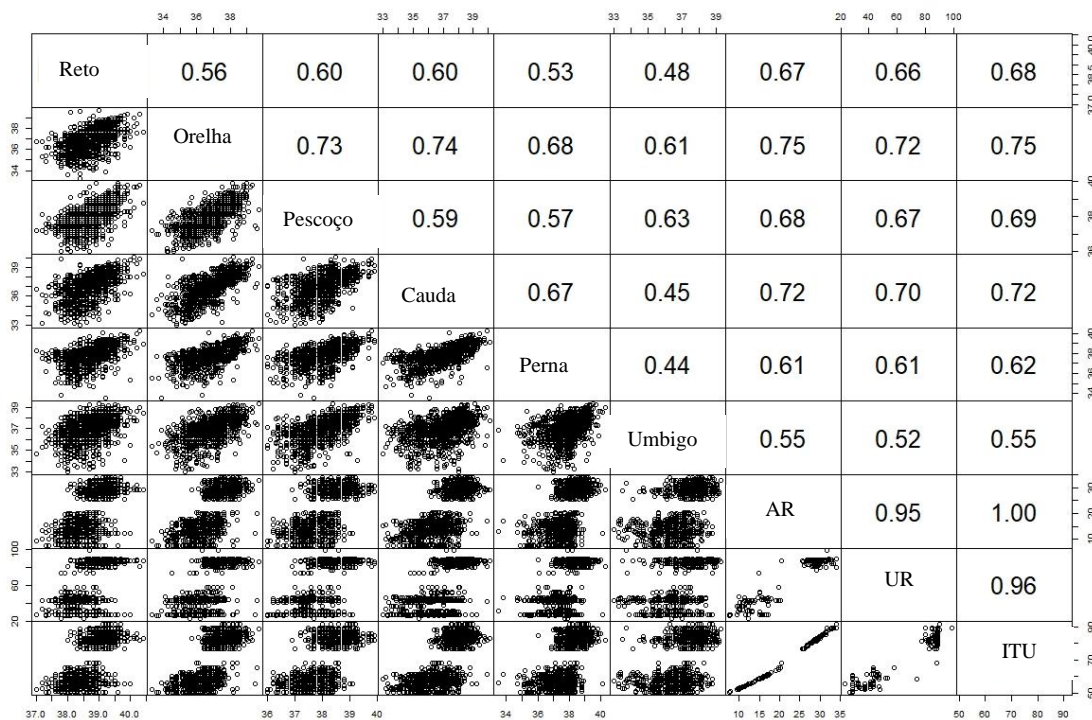


Figura 3. Correlação entre as temperaturas do reto, orelha, pescoço, cauda, perna e umbigo, medidas pelo microchip Bio-Thermo em bezerros e temperatura do ar, umidade relativa (UR) e índices de temperatura e umidade relativa (ITU).



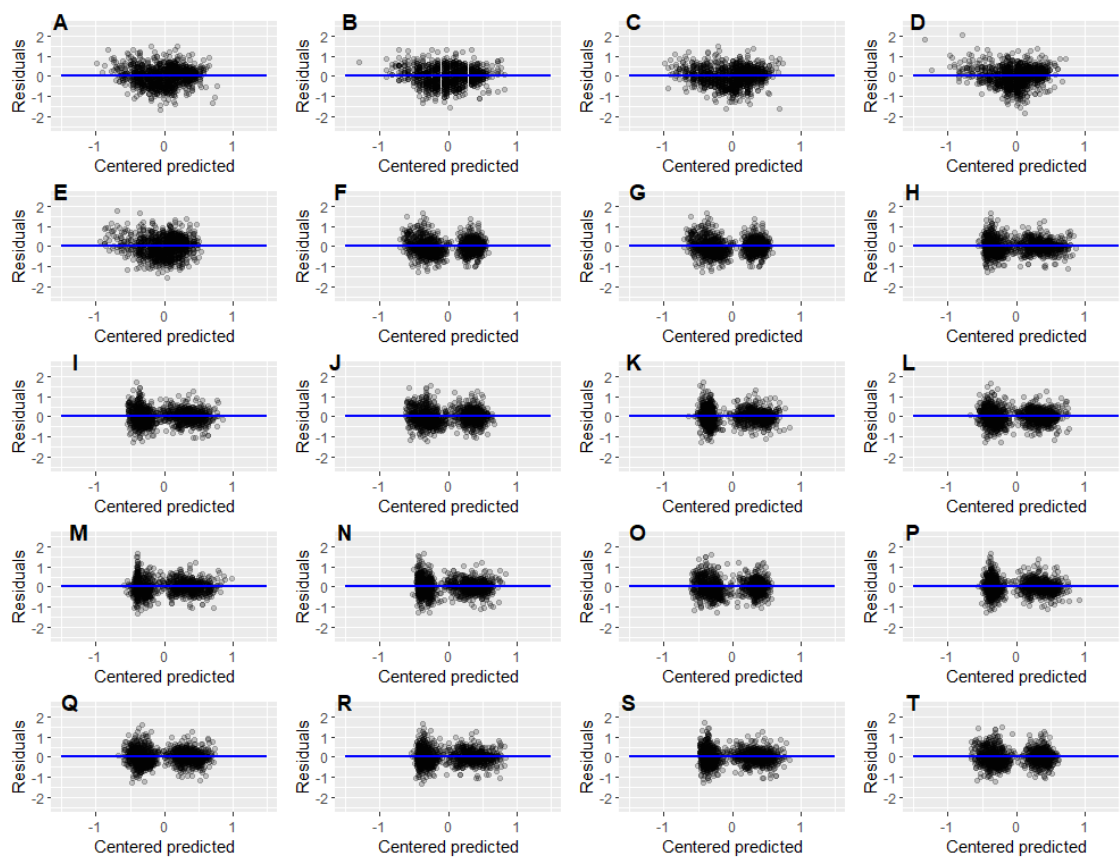


Figura 4. Resíduos (observados - previstos) em função dos valores preditos da temperatura retal em bezerros leiteiros para diferentes modelos avaliados combinando locais de microchip (orelha, pescoço, cauda, perna ou umbigo) e medidas ambientais (temperatura do ar, umidade relativa ou índice de temperatura e umidade). A descrição dos preditores para cada modelo (de A a T) é mostrada na Tabela 2

**Tabela 1.** Temperaturas obtidas em diferentes locais dos bezerros e medidas das variáveis ambientais

Locais	N	Médias	Mínimo	Máximo	SD
<i>Temperaturas (°C)</i>					
Reto	2034	38.7	37.00	40.50	0.534
Orelha*	1804	36.9	33.30	39.70	1.066
Pescoço*	1908	38.0	34.90	40.20	0.755
Cauda*	1793	37.0	33.00	40.30	1.303
Perna*	1906	38.0	33.00	40.70	0.985
Umbigo*	1861	37.0	33.00	39.30	1.067
<i>Variáveis ambientais and ITU**</i>					
Temperatura do ar, °C	1854	21.93	7.60	34.40	8.431
Umidade Relativa, %	1854	62.07	17.50	99.00	25.341
Índice de temperatura e umidade	1854	70.10	50.58	91.52	13.299

\*Temperaturas medidas usando microchip Bio-Thermo. \*\*Medido ao mesmo tempo das medições de temperatura retal e de microchips.

**Tabela 2.** Equações preditivas de temperatura retal ( $^{\circ}$  C) usando dados do microchip Bio-thermo implantado em diferentes locais com ou sem temperatura do ar (TA,  $^{\circ}$  C), umidade relativa (UR, %) ou índice de temperatura-umidade (ITU) como variáveis preditivas.

Referência	Preditores	Int.	SE	Inc. Chip	SE	Inc. Variáveis ambientais	SE	Inc. Interação	SE	$r_c$	Cb	CCC	RMSE	MAE
A	Orelha	28.65	0.419	0.273	0.0113	-	-	-	-	0.562	0.854	0.480	0.440	0.348
B	Pescoço	21.95	0.631	0.441	0.0166	-	-	-	-	0.600	0.883	0.530	0.425	0.340
C	Cauda	29.73	0.341	0.242	0.0092	-	-	-	-	0.597	0.881	0.526	0.426	0.335
D	Perna	27.24	0.519	0.303	0.0137	-	-	-	-	0.530	0.827	0.438	0.451	0.355
E	Umbigo	30.02	0.444	0.235	0.0120	-	-	-	-	0.485	0.785	0.381	0.465	0.374
F	Orelha; TA	44.46	1.144	-0.178	0.0315	-0.434	0.0538	0.013	0.0015	0.700	0.940	0.658	0.379	0.293
G	Pescoço; TA	37.99	1.794	0.001	0.0476	-0.332	0.0804	0.010	0.0021	0.706	0.942	0.665	0.377	0.295
H	Cauda; TA	42.08	0.912	-0.109	0.0249	-0.417	0.0483	0.012	0.0013	0.716	0.947	0.678	0.371	0.286
I	Perna; TA	43.17	1.300	-0.137	0.0346	-0.456	0.0628	0.013	0.0016	0.706	0.942	0.665	0.377	0.289
J	Umbigo; TA	37.20	1.085	0.020	0.0296	-0.082	0.0516	0.003	0.0014	0.688	0.934	0.643	0.386	0.299
K	Orelha; UR	45.73	1.800	-0.211	0.0325	-0.183	0.0191	0.005	0.0005	0.701	0.940	0.659	0.379	0.292
L	Pescoço; UR	38.12	1.822	-0.001	0.0483	-0.126	0.0281	0.004	0.0007	0.701	0.940	0.659	0.380	0.296
M	Cauda; UR	43.30	0.923	-0.141	0.0252	-0.173	0.0167	0.005	0.0004	0.720	0.948	0.683	0.369	0.282
N	Perna; UR	44.90	1.304	-0.182	0.0347	-0.194	0.0216	0.005	0.0006	0.706	0.942	0.665	0.377	0.287
O	Umbigo; UR	36.57	1.093	-0.038	0.0298	-0.024	0.0177	0.001	0.0005	0.681	0.931	0.634	0.390	0.301
P	Orelha; ITU	52.00	2.346	-0.403	0.0637	-0.236	0.0351	0.007	0.0009	0.705	0.942	0.664	0.377	0.290
Q	Pescoço; ITU	42.58	3.561	-0.138	0.0939	-0.159	0.0514	0.005	0.0013	0.711	0.945	0.672	0.374	0.292
R	Cauda; ITU	50.08	2.023	-0.341	0.0544	-0.238	0.0319	0.007	0.0008	0.719	0.948	0.682	0.370	0.284
S	Perna; ITU	52.03	2.689	-0.391	0.0709	-0.260	0.0403	0.007	0.0011	0.711	0.945	0.672	0.374	0.287
T	Umbigo; ITU	34.32	0.404	0.075	0.0118	0.023	0.0009	ns	ns	0.697	0.938	0.654	0.381	0.295

<sup>1</sup>Gráficos de resíduos (observados - preditos) como uma função de valores preditos centrados são mostrados na Figura 4.  $r_c$  = Correlação entre os valores observados e preditos,  $C_b$  = fator de correção de viés, Coeficiente de correlação de concordância CCC, RMSE = erro quadrático médio, MAE = erro absoluto médio.

## V - CAPÍTULO II

### **Avaliação da técnica de máscara facial para mensuração de metano entérico em vacas em lactação**

**Resumo Simples:** Mensurações de curta duração têm sido utilizadas para verificar a produção de metano entérico em ruminantes. No entanto, a acurácia e a precisão dessas técnicas ainda não são completamente definidas. O estudo de modelos lineares nesse trabalho mostrou que a avaliação das emissões de metano, quatro horas após o fornecimento da alimentação aos animais, teve baixa eficiência preditiva. No entanto, ao avaliar a relação da produção diária de metano na câmara respirométrica com subamostragens, em horários que melhor se correlacionaram com a média diária de emissão na câmara respirométrica, foi possível observar pontos promissores para avaliação na máscara facial. Estudos futuros, focados no horário mais promissor (10h após a alimentação matinal) encontrado no presente estudo, devem ser realizados a fim de se implementar um protocolo padrão para utilização da máscara facial como metodologia para mensuração das emissões de gases de efeito estufa produzidos pelos ruminantes.

**Resumo:** O uso do método da máscara facial (MF) para mensuração de CH<sub>4</sub> entérico em ruminantes pode ser uma opção prática e mais barata em relação à câmara respirométrica (CR), método referência. Foi avaliado *i*) o potencial de utilização da MF quatro horas após a alimentação matinal e *ii*) buscou-se identificar os horários mais promissores para mensuração de CH<sub>4</sub> na MF, com base em subamostragens na CR. A emissão de CH<sub>4</sub> de 109 vacas leiteiras (551.3 ±150 kg) foi obtida por CR e MF. Avaliaram-se dados de CMS (consumo de matéria seca), produção diária, rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub>. O CMS foi diferente entre CR e MF. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e coeficiente de correlação e concordância (CCC) foi 0.2 e 0.45 respectivamente. Avaliaram-se subamostragens na CR. As correlações foram altas e positivas ( $\rho > 0.82$ ) entre os valores

obtidos nas subamostragens. Os valores de  $R^2$  variaram de 0.35 a 0.67. O CCC máximo para as subamostragens da CR foi de 0.80. O horário mais adequado para avaliações pela MF foi o de 10h após a alimentação matinal e novos estudos devem ser realizados para que seja avaliada a capacidade da técnica para fenotipagem de alto desempenho.

**Palavras-chave:** calorimetria, mudança climática, metano, ensaio de respirometria

## Introdução

A agricultura é responsável por aproximadamente 14,5% dos gases de efeito estufa (GEE) de origem antropogênica [1]. As emissões desses gases pelos bovinos representam 65%. Além disso, as emissões de gases pelos animais representam perda de energia para manutenção e produção. O desenvolvimento de estratégias para diferentes sistemas de produção animal para mitigação de GEE depende da disponibilidade, da precisão e do preço das técnicas utilizadas na avaliação das trocas gasosas [2].

A técnica de medição de metano ( $\text{CH}_4$ ), reconhecida como padrão ouro em bovinos, é a câmara respirométrica (CR) [3]. Essa metodologia permite medir a emissão de gases pelos animais em condições similares ao seu ambiente de produção natural. A CR tem sido utilizada em estudos para avaliar as emissões de metano em ruminantes [4,5]. No entanto, são necessários estrutura de laboratório e alto investimento em equipamentos que não podem ser utilizados para avaliações em sistemas de pastejo.

As técnicas de medição de curta duração (*short term measurements*) podem ser uma alternativa aos métodos tradicionais. Como exemplo, a técnica de máscara facial (MF) tem o princípio semelhante à CR em termos de medição das trocas gasosas. Essa técnica tem a vantagem de poder avaliar um grupo de animais em menor tempo e com um custo relativamente baixo. Oss et al., [4] relataram que a MF pode ser usada para avaliar as emissões de metano, pois observaram resultados semelhantes com outras duas técnicas convencionais (CR e gás traçador ( $\text{SF}_6$ )). Silveira et al. [6] utilizaram a técnica da máscara facial, quatro horas após a alimentação, em estudo que comparava os efeitos da substituição de farinha de soja pela torta de soja em bovinos leiteiros. Eles observaram que a MF foi acurada para a predição da emissão de metano, comparando com os resultados obtidos pela câmara respirométrica. No entanto, os autores sugerem formulação de equações que melhor predizem o comportamento da produção de  $\text{CH}_4$ .

Para Hristov et al., [7] e Hristov et al., [8], técnicas que utilizam avaliações de curto prazo para medir as emissões de  $\text{CH}_4$  em ruminantes, apesar de economicamente

viáveis, apresentam limitações, como o melhor momento e quantas medições diárias são necessárias para se obter resultados precisos [9]. Os objetivos da presente pesquisa foram: *i)* comparar as metodologias de avaliação de CH<sub>4</sub> entérico por CR durante 20h de avaliação e com o método da MF durante 30 minutos, quatro horas após a alimentação; *ii)* avaliar o potencial de utilização das subamostragens na CR (240, 260, 640, 660 e 680min após a alimentação) para encontrar o horário mais apropriado para utilização da MF.

## **Materiais e Métodos**

### *Banco de dados, animais e variáveis avaliadas*

O banco de dados continha informações de quatro (A, B, C e D) experimentos realizados no Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária da Embrapa em Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. Esses experimentos resultaram em dados de emissão de CH<sub>4</sub> provenientes da avaliação na CR e na MF. Foram utilizadas 109 vacas leiteiras (Holandês, Gir e Girolando; 592 ± 183 kg de peso vivo) nos experimentos, utilizando as técnicas de CR e MF para mensurar a produção do gás metano CH<sub>4</sub>. As informações gerais do banco de dados e os protocolos adotados com os animais, conforme a Comissão de ética no uso de animais da Embrapa Gado de Leite estão descritos na Tabela 1.

O alimento fornecido e as sobras foram mensurados para determinar o consumo de matéria seca (CMS). O rendimento de metano (CH<sub>4</sub> g/kg MS) foi calculado com base no CMS e na produção de CH<sub>4</sub> e a intensidade de metano (CH<sub>4</sub> g/kg leite produzido) calculada a partir da relação entre a produção de leite dos animais e a quantidade de CH<sub>4</sub> emitida.

### *Mensuração na câmara respirométrica*

Quatro câmaras respirométricas foram usadas de acordo com as especificações e procedimentos descritos por Machado et al., [10] e Oss et al., [4]. As vacas foram mantidas dentro das câmaras por dois dias consecutivos, por aproximadamente 20 horas em cada dia de mensuração dos gases. Antes das mensurações iniciarem, os animais foram alimentados com 50% da dieta total do dia. Após o fechamento da câmara, os procedimentos analíticos foram iniciados. No turno vespertino, momento em que acontece a segunda ordenha do dia, o sistema de leitura das produções de gases era

pausado. Após o término da ordenha, as vacas retornavam às câmaras. Nesse ponto, eram fornecidos os 50% restantes da dieta de acordo com seus requerimentos para produção de leite e em seguida as análises eram restabelecidas. Foram utilizadas duas mensurações de 20h por animal.

A emissão de CH<sub>4</sub> entérico pelas vacas foi calculada pelas diferenças das concentrações gasosas (VCH<sub>4</sub>) no ar de entrada (ar externo) e saída das câmaras e pelo fluxo de ar utilizado conforme descrito por Machado et al., [10] usando a equação proposta por Lighton [11]:

$$VCH_4 = FR \times \frac{[(FeCH_4 - FiCH_4) + FiCH_4 \times (FiO_2) + FiCH_4 \times (FeCO_2)]}{(1 + FiCH_4)} \quad (1)$$

Onde: FR = taxa de fluxo; Fe = concentração de saída; Fi = concentração de entrada.

#### *Mensuração na Máscara Facial*

A mensuração na MF ocorreu em dias diferentes das coletas realizadas na CR. A máscara facial foi utilizada de acordo com as especificações e procedimentos estabelecidos por Oss et al., [4]. Os mesmos animais que tiveram a produção de gás mensurada na câmara foram submetidos às coletas na MF. O período de duas semanas de adaptação dos animais à MF foi necessário para que as coletas se iniciassem. A emissão de CH<sub>4</sub> foi medida duas vezes (dias 1 e 2) subsequentes à CR usando a MF quatro horas após alimentação (ponto escolhido de acordo com as estratégias de manejo utilizadas na estação experimental). As medições individuais foram realizadas durante 30 minutos. A MF foi construída no Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária da Embrapa Gado de Leite e adaptada segundo Oss et al, [4].

Foi utilizado um garrafão de polietileno (10 litros de capacidade) com abertura de 30 centímetros para possibilitar o encaixe da boca e do nariz do animal (Figuras 2 e 3). Na parte externa do garrafão de polietileno foi instalada a câmara de ar com dimensões de 3.25 × 6cm. A câmara foi adaptada para promover pressão de forma a possibilitar o encaixe entre a máscara e a cabeça do animal, mantendo a vedação do sistema e impedindo a saída de gás através dessa abertura. Na parte central externa da máscara (Figura 2), quatro flanges de 25 × ¾ (Figura 1) foram adaptadas para permitir a instalação

de válvulas (Valves non-rebreathing Era® Mask, Austrália) para garantir a entrada do ar externo dentro da MF e não permitir a saída do ar exalado.

Na porção afunilada da MF foi acoplada a flange de 50mm e um adaptador que foi utilizado para conectar uma tubulação flexível (Kanaflex 2”S / A Indústria de Plásticos, SP, BR) que fazia a conexão direta a um recipiente plástico com capacidade de 100 litros, o que permitia observar o comportamento dos movimentos de expiração e inspiração do animal. Outro tubo flexível (Kanaflex 2” S/A Indústria de plásticos, SP, BR) foi conectado ao sistema que interligava o recipiente plástico a um fluxômetro de massa (FK500, 75-500 L/min, Sable Systems, Henderson, NV, USA). A tubulação de saída do recipiente de PVC foi acoplada a uma estrutura em forma de T, feita de material plástico rígido (800 mm de comprimento x 50 mm de diâmetro), disposta no sentido longitudinal (Figura 2), contribuindo para a homogeneidade do ar interno do recipiente.

O cálculo da taxa de produção de CH<sub>4</sub> foi realizado conforme descrito por Machado et al., [10]. Os volumes diários em litros por dia (L / dia) foram calculados multiplicando os volumes de CH<sub>4</sub> por 1440 (total de segundos por dia). A Figura 1 representa um dos animais sendo avaliado pelo método da coleta *spot* de curta duração via MF, o desenho esquemático da MF (Figura 2) e o sistema utilizado para coleta dos gases (Figura 3).

#### *Procedimentos estatísticos*

Os valores de produção CH<sub>4</sub> obtidos pela CR ao longo das 20h de avaliação totalizaram 60 pontos para cada medida, estes chamados de pontos parciais. Em seguida, cada ponto parcial foi extrapolado gerando um valor de produção diária. Esses pontos foram assumidos como características diferentes no modelo a fim de avaliar qual seria o momento, durante as 20h. , que apresentaria maior correlação com a produção total diária. Modelos de regressão aleatória via polinômios de Legendre têm sido comumente utilizados para um melhor ajuste da variação fenotípica e genética de características economicamente importantes [12, 13]. Foi utilizado um modelo de regressão aleatória, ajustando-se o intercepto para a produção total, e intercepto e coeficientes de regressão (linear e quadrático) para as medidas parciais. O modelo estatístico foi descrito da seguinte forma:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Q}_t(\mathbf{Z}_t\mathbf{a}) + \mathbf{e}, \quad (2)$$



onde  $\mathbf{y}$  é o vetor das observações (parciais e totais para as emissões de CH<sub>4</sub>);  $\mathbf{b}$  é um vetor de efeitos fixos [experimento (n= 4 níveis) para ambas as técnicas e dia (n=2 níveis) somente para as medidas parciais];  $\mathbf{Q}t$  é a matriz dos polinômios de Legendre de primeira ordem para o período de tempo padronizado no intervalo de -1 a 1, que corresponde a um intervalo de 20 a 1200 [qt0 = 1 e qt1 = x, em que t indica o período de tempo e x = - 1 + 2 (THI - 20) / (1200 - 20)];  $\mathbf{a}$  é um vetor de coeficientes de regressão aleatórios para o efeito de animal;  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Z}$  são matrizes de incidência que atribuem observações a efeitos;  $\mathbf{e}$  é o vetor de resíduos.

A estrutura da covariância foi a seguinte:

$$\text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{I} \otimes \mathbf{K}_a & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{R} \end{bmatrix}, \quad (3)$$

onde  $\otimes$  é o produto Kronecker;  $\mathbf{I}$  é a matriz identidade;  $\mathbf{K}_a$  é uma matriz de coeficientes da função de covariância no período de tempo padronizado  $t$  responsável por ambas as variáveis (total e parcial);  $\mathbf{R}$  é uma matriz de covariância. Então,

$$\mathbf{K}_a = \begin{bmatrix} \sigma_{b_{0,1}}^2 & 0 & 0 & \sigma_{b_{0,1},b_{0,2}} & \sigma_{b_{0,1},b_{1,2}} & \sigma_{b_{0,1},b_{2,2}} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \sigma_{b_{0,1},b_{0,2}} & 0 & 0 & \sigma_{b_{0,2}}^2 & \sigma_{b_{0,2},b_{1,2}} & \sigma_{b_{0,2},b_{2,2}} \\ \sigma_{b_{0,1},b_{1,2}} & 0 & 0 & \sigma_{b_{0,2},b_{1,2}} & \sigma_{b_{1,2}}^2 & \sigma_{b_{1,2},b_{2,2}} \\ \sigma_{b_{0,1},b_{2,2}} & 0 & 0 & \sigma_{b_{0,2},b_{2,2}} & \sigma_{b_{1,2},b_{2,2}} & \sigma_{b_{2,2}}^2 \end{bmatrix}, \quad (4)$$

em que,  $\sigma_{b_{0,1}}^2$  and  $\sigma_{b_{0,2}}^2$  são variâncias de intercepto para mensurações total (1) e parcial (2) respectivamente;  $\sigma_{b_{1,2}}^2$  e  $\sigma_{b_{2,2}}^2$  são inclinação e variâncias quadráticas para as medidas parciais respectivamente;  $\sigma_{b_{0,1},b_{0,2}}$ ,  $\sigma_{b_{0,1},b_{1,2}}$ ,  $\sigma_{b_{0,1},b_{2,2}}$ ,  $\sigma_{b_{0,2},b_{1,2}}$ ,  $\sigma_{b_{0,2},b_{2,2}}$ ,  $\sigma_{b_{1,2},b_{2,2}}$  são covariâncias (duas a duas) entre os termos de interceptação (b<sub>0</sub>), inclinação (b<sub>1</sub>) e quadrático (b<sub>2</sub>) termos para as medidas totais (1) e parciais (2) para as duas características estudadas CH<sub>4</sub>. Os componentes da variância foram estimados utilizando-se o modelo da máxima verossimilhança restrita via programa REMLF90 [14].

Para avaliar qual ponto das curvas de emissão de CH<sub>4</sub> pode ser descrito como o melhor preditor indireto da emissão diária total, as correlações entre cada ponto e a medição total foram calculadas por:

$$r=(b_{0,1}, b_{0,2} + b_{1,2}t + b_{2,2}t^2) \quad (5)$$

Um algoritmo próprio em linguagem octave (<https://www.gnu.org/software/octave/>) foi utilizado para estimar as correlações. O código supracitado pode ser fornecido mediante solicitação.

#### *Comparação entre a Câmara Respirométrica e a Máscara Facial*

O teste de análise de variância (ANOVA) foi aplicado utilizando os pacotes nlme (<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/nlme.pdf>) e lme4 (<https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>) no software R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria) para comparar a mensuração de curta duração (MF) com a câmara respirométrica utilizando todo o banco de dados (n= 109 animais) para as variáveis de CMS, rendimento (g/kg CMS) de CH<sub>4</sub> e intensidade (g/kg leite produzido) de CH<sub>4</sub>.

#### *Acurácia e precisão entre as técnicas*

Para calcular o R<sup>2</sup>, regressões foram testadas para as variáveis (pontos parciais que mostraram altas correlações entre a CR e MF para a produção de CH<sub>4</sub> no software R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria) [15]. Os procedimentos de validação dos valores observados e preditos para produção de CH<sub>4</sub> foram testados. O ajuste do modelo de regressão linear foi feito com base nos valores observados na câmara respirométrica (variável independente) sobre os valores preditos na máscara facial (variáveis dependentes). Para estimar os parâmetros de regressão, a hipótese nula independente foi testada de acordo com Neter [16]:

$$H_0 : \beta_0 = 0 \text{ ou } \beta_1 = 1$$

$$H_a : \text{não } H_0$$

O viés médio (MB) foi calculado de acordo com Cochran e Cox (1957):

$$MB = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - y_i) \quad (6)$$

onde x = valores observados ,y = valores preditos e n é o número de observações.

O coeficiente de correlação e concordância (CCC), que indica a precisão e a acurácia foi calculado de acordo com Lin [17]. A avaliação comparativa da eficiência das

equações de predição foi feita para o erro quadrático médio (MSE) segundo Bandemer [18]:

$$\text{MSE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2 \quad (7)$$

onde x = valores observados y = valores preditos.

Posteriormente, o teste de ANOVA foi aplicado utilizando os pacotes nlme (<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/nlme.pdf>) e lme4 (<https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>) no software R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria) para comparar a mensuração da CR com os pontos de subamostragens selecionados na câmara.

## Resultados

### *Dinâmica de produção de CH<sub>4</sub> e comparação entre Câmara respirométrica e Máscara Facial quatro horas após alimentação*

A dinâmica de produção de CH<sub>4</sub> na câmara respirométrica está representada na Figura 4. Foram utilizados dados de 20 horas de avaliação na CR e as linhas azul e vermelha indicam os valores médios extrapolados para 24h da MF e CR respectivamente. A média de produção total na CR foi de 437.61L de CH<sub>4</sub>/dia (linha vermelha) e a da MF foi de 447.78L de CH<sub>4</sub>/dia (linha azul) (n=109). As setas (Figura 4) indicam o momento do fornecimento da dieta. Nos tempos: 2 horas depois da alimentação da manhã e 2h e 40min depois da alimentação da tarde foram observados os picos de produção de CH<sub>4</sub> pós-prandial.

Os valores de produção de CH<sub>4</sub> foram semelhantes entre as técnicas (P>0.03; Tabela 3). Já o consumo de matéria seca (CMS) diferiu entre as metodologias de CR e MF (P<0.01; Tabela 3). O rendimento (g/kg CMS) de CH<sub>4</sub> foi de 28.76 g/kg CMS para CR e 28.45 g/kg CMS para MF (P=0.6685; Tabela 3). A intensidade (g/kg leite produzido) de CH<sub>4</sub> foi de 18.09 g/kg leite produzido para CR e 19.35 g/kg leite produzido para MF não apresentando diferenças entre as técnicas (P= 0.0724, Tabela 3).

O valor de R<sup>2</sup> entre as técnicas foi baixo (0.20) (Tabela 3). O CCC para emissão de CH<sub>4</sub> foi 0.45 (Tabela 3).

*Avaliação das subamostragens na CR para escolha do melhor horário para coleta spot de metano entérico com MF*

As correlações foram altas e positivas ( $P > 0.82$ ) para todos os pontos de subamostragem (240, 260, 640, 660 e 680min) em relação aos valores de produção total obtidos na CR (Figura 4). Os pontos de subamostragens de 240 e 260min, após a alimentação matinal, foram selecionados para avaliações pela proximidade dos horários de 4h empregado inicialmente no estudo com MF ( $P > 0.97$ ); já os horários de 640, 660 e 680 foram selecionados para estudo mais detalhado, por terem apresentado valores extrapolados mais próximos da produção diária na câmara ( $P > 0.98$ ) (Figura 5).

Não foram observadas diferenças para emissão de  $\text{CH}_4$ , rendimento e intensidade de  $\text{CH}_4$  ( $P > 0.49$ , Tabela 4) entre a CR e cada ponto da subamostragem da CR (240, 260, 640, 660, 680min).

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) mais elevados (0.66, 0.67 e 0.65) foram obtidos para subamostragens próximas a 10 h após a alimentação (640, 660 e 680min respectivamente). O CCC mais baixo (0.58) foi observado no ponto de subamostragem 240 (Tabela 4). Amostragens próximas a 10 h após a alimentação apresentaram CCC acima de 0.79 (Tabela 4).

### **Discussão**

O comportamento da dinâmica de produção de metano caracterizou-se por um rápido aumento na emissão após a alimentação, seguido por queda até a próxima alimentação. Isso ocorreu, provavelmente, devido à disponibilidade de matéria seca no rúmen. A produção diária de  $\text{CH}_4$  normalmente exhibe comportamento padrão entre o tempo de alimentação e o de consumo, o pico e em seguida uma queda linear [19]. Crompton et al. [20] avaliaram o efeito da frequência de alimentação na emissão de  $\text{CH}_4$ , durante o dia em vacas e encontraram valores máximos de 632 L  $\text{CH}_4$ /dia para a maior frequência de alimentação (1 vs. 4 vezes de fornecimento ao dia). O comportamento da produção de  $\text{CH}_4$  observado por esses autores foi semelhante ao do presente trabalho. A dinâmica de produção do  $\text{CH}_4$  está altamente relacionada ao tempo após a alimentação [21].

Baseando-se no horário estratégico da segunda ordenha (turno vespertino), diária no campo experimental e no momento (entre quatro e seis horas após a alimentação) que se observa alta correlação com a média de produção diária de  $\text{CH}_4$ , as coletas realizadas

com a MF foram conduzidas quatro horas após a alimentação [22, 20]. Estudos realizados por Silveira, et al. [6] demonstraram resultados promissores com a técnica da MF, utilizando esse mesmo intervalo de tempo entre a alimentação e as mensurações dos gases. Foi observado que as mensurações de curta duração podem estar fortemente correlacionadas com a emissão diária de CH<sub>4</sub> dependendo do momento após a alimentação, ponto em que são realizadas as coletas de gases [23, 24].

Antes de submeter os animais às coletas na MF, foi realizada adaptação ao uso da máscara por duas semanas. No entanto, foram observadas diferenças para o CMS. Esse fato pode ser explicado pelas características metodológicas da técnica. Não há possibilidade de efetuar a mensuração das produções dos gases na MF no mesmo dia de coleta da CR, pois pode haver efeito de confundimento entre os resultados de CMS. Existem críticas relacionadas à comparação das técnicas de mensuração de curta duração [25] e esse fato pode estar associado à metodologia empregada no presente estudo.

O método de MF possui vantagens como a possibilidade de avaliação em massa de um rebanho, além de ser mais barato e conduzido em tempo mais curto. No entanto, a acurácia e precisão das técnicas de curta duração para mensurar as emissões de CH<sub>4</sub> ainda não foram completamente elucidadas [26]. Quando a análise dos dados é fornecida apenas por regressão linear, os resultados podem apresentar falta de sensibilidade e muitas vezes não fornecem uma interpretação adequada [6]. Sendo assim, o R<sup>2</sup> não deve ser o único critério para avaliar a exatidão e precisão dos dados [27].

O variável rendimento de CH<sub>4</sub> está relacionado com o CMS. A quantidade de CH<sub>4</sub> produzida pelo animal pode ser interpretada pela quantidade de matéria orgânica digerida no rúmen, particularmente a fração de fibra. Os principais determinantes da produção diária de metano são ingestão de matéria seca e composição da dieta: quanto mais alimento consumido e/ou maior o teor de fibra da dieta, maior será a quantidade de metano produzido por dia [28, 29]. O rendimento de CH<sub>4</sub> não apresentou diferenças, indicando a similaridade entre a MF e CR para essa variável, mesmo existindo variação no CMS. Moate et al. [30] encontraram diferenças entre os valores de rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub> em vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de trigo e observaram decréscimo dessas variáveis nos animais que recebiam mais de 30% de trigo na composição da dieta. Resultados semelhantes foram reportados por Oss et al. [4], comparando diferentes técnicas de avaliação de produção de gases: gás traçador SF<sub>6</sub>, MF e CR.

A eficiência preditiva foi baixa ( $CCC = 0.45$ , Tabela 3), apesar de os valores de produção, rendimento e intensidade de  $CH_4$  terem sido semelhantes entre as técnicas. No entanto, o método de MF pode conferir melhor bem-estar ao animal, quando comparado às coletas realizadas na CR, uma vez que os animais são confinados por 30 minutos, permitindo comportamento e atividade normais durante a maior parte do dia. Uma avaliação mais aprofundada sobre a técnica é necessária, visto que não é possível recomendar mensurações de curta duração com MF quatro horas após a alimentação.

As menores correlações observadas nas extremidades do gráfico (Figura 4) devem-se ao número reduzido de observações no início e no final da avaliação. Isso ocorreu porque o horário de início da avaliação na câmara respirométrica difere entre os animais. Esse comportamento é comumente observado quando os polinômios de Legendre são utilizados [12]. Uma crítica comum ao uso dessa metodologia é que no intervalo final os dados são insuficientes, os parâmetros estimados podem não ser precisos, resultando em estimativas incorretas dos componentes de variância [31].

Estudos conduzidos por Oss et al. [4] destacaram valores de CCC de 0.71 ao compararem as técnicas de CR e MF em touros. McGinn et al. [32], ao analisar os efeitos do método de CR com o gás traçador  $SF_6$  para mensuração das emissões de  $CH_4$  em novilhos de corte, também observaram concordância entre as técnicas (CCC de 0.79). Porém, os resultados, com base em mensurações de curta duração para avaliar a produção de  $CH_4$  em ruminantes, ainda apresentam acurácia e precisão variáveis entre os estudos, sendo influenciados pelo método empregado e pelo número de animais [26, 7, 8]. Além disso, de acordo com Silveira et al. [6], métodos estatísticos para validação da técnica da MF para prever com acurácia e precisão a produção diária de  $CH_4$  podem alterar os resultados observados. Recomenda-se a elaboração de um protocolo padronizado para mensuração e cálculo da produção de  $CH_4$ , o que permitirá a implementação da técnica.

A baixa eficiência preditiva para avaliação da metodologia da MF quatro horas após a alimentação (Tabela 4) confirma a limitação desse horário para mensuração de curta duração com MF empregada no presente trabalho. Apesar de esse horário ser favorável às condições de manejo na fazenda, por ser próximo ao período de ordenha, os horários para amostragem de curta duração mais apropriados são 10h após a alimentação matinal. Assim, novos estudos devem ser realizados para verificar a viabilidade de utilização da máscara facial nesse horário.

## Conclusão

A avaliação da emissão de CH<sub>4</sub> entérico, usando MF quatro horas após a alimentação, apresentou baixa acurácia e precisão. Em estudo de prospecção para a escolha de melhores horários com base nas subamostragens na CR, comprovou-se que quatro horas após a alimentação não foi o mais adequado para coleta *spot* com MF e que 10h após a alimentação matinal foi o horário que possibilitou predições mais acuradas e precisas. Assim, novos estudos devem ser realizados para verificar a viabilidade de utilização da máscara facial no horário supracitado.

## Referências

1. GERBER, PJ, STEINFELD, HENDERSON, MOTTET, OPIO, DIJKMAN, FALCUCCI, & TEMPIO. A globAl Assessment of emissions And mitigAtion opportunities, 2013.
2. STORM, I. M. L. D., HELLOWING, A. L. F., NIELSEN, N. I., & Madsen, J. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. In *Animals* (Vol. 2, Issue 2, pp. 160–183). **Multidisciplinary Digital Publishing Institute** (MDPI), 2012.
3. BLAXTER, K. L., & CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, 19(1), 511–522, 1965.
4. OSS, D. B., MARCONDES, M. I., MACHADO, F. S., PEREIRA, L. G. R., TOMICH, T. R., RIBEIRO, G. O., CHIZZOTTI, M. L., FERREIRA, A. L., CAMPOS, M. M., MAURÍCIO, R. M., CHAVES, A. V., & MCALLISTER, T. A. An evaluation of the face mask system based on short-term measurements compared with the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer, and respiration chamber techniques for measuring CH<sub>4</sub> emissions. **Animal Feed Science and Technology**, 216, 49–57, 2016.
5. ORNELAS, L. T. C., SILVA, D. C., TOMICH, T. R., CAMPOS, M. M., MACHADO, F. S., FERREIRA, A. L., MAURÍCIO, R. M., & PEREIRA, L. G. R. Differences in methane production, yield and intensity and its effects on metabolism of dairy heifers. **Science of the Total Environment**, 689, 1133–1140, 2019.
6. SILVEIRA, S. R., TERRY, S. A., BIFFIN, T. E., MAURÍCIO, R. M., PEREIRA, L. G. R., FERREIRA, A. L., RIBEIRO, R. S., SACRAMENTO, J. P., TOMICH, T. R., MACHADO, F. S., CAMPOS, M. M., GAMA, M. A. S., & CHAVES, A. V. Replacement of Soybean Meal With Soybean Cake Reduces Methane Emissions in Dairy Cows and an Assessment of a Face-Mask Technique for Methane Measurement. **Frontiers in Veterinary Science**, 6, 295, 2019.
7. HRISTOV, A. N., OH, J., GIALLONGO, F., FREDERICK, T., HARPER, M. T., WEEKS, H., BRANCO, A. F., PRICE, W. J., MOATE, P. J., DEIGHTON, M. H., WILLIAMS, S. R. O., KINDERMANN, M., & DUVAL, S. Short communication: Comparison of the GreenFeed system with the sulfur hexafluoride tracer technique for

- measuring enteric methane emissions from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, *99*(7), 5461–5465, 2016.
8. HRISTOV, A. N., KEBREAB, E., NIU, M., Oh, J., BANNINK, A., BAYAT, A. R., BOLAND, T. M., BRITO, A. F., CASPER, D. P., CROMPTON, L. A., DIJKSTRA, J., EUGÈNE, M., GARNSWORTHY, P. C., HAQUE, N., HELLOWING, A. L. F., HUHTANEN, P., KREUZER, M., Kuhla, B., Lund, P., Yu, Z. Symposium review: Uncertainties in enteric methane inventories, measurement techniques, and prediction models. **Journal of Dairy Science**, *101*(7), 6655–6674, 2018.
  9. HAMMOND, K. J., WAGHORN, G. C., & HEGARTY, R. S. The GreenFeed system for measurement of enteric methane emission from cattle. **Animal Production Science**, *56*(3), 2016.
  10. MACHADO, F., TOMICH, T., FERREIRA, A., CAVALCANTI, L., CAMPOS, M., PAIVA, C., RIBAS, M., & PEREIRA, L. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle. **Journal of Dairy Science**, *99*, 4899–4906, 2016.
  11. Lighton, J. R. B. *Measuring metabolic rates: a manual for scientists*. Oxford University Press, 2008.
  12. MOTA, R. R., MARQUES, L. F. A., LOPES, P. S., DA SILVA, L. P., NETO, F. R. A., DE RESENDE, M. D. V., & Torres, R. A. Genetic evaluation using multi-trait and random regression models in Simmental beef cattle. **Genetics and Molecular Research**, *12*(3), 2465–2480, (2013).
  13. HAMMAMI, H., VANDENPLAS, J., VANROBAYS, M. L., REKIK, B., BASTIN, C., & GENGLER, N. Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, *98*(7), 4956–4968, 2015.
  14. MISZTAL, I., TSURUTA, S., STRABEL, T., AUVRAY, B., DRUET, T., & LEE, D. H. (n.d.). BLUPF90 AND RELATED PROGRAMS (*BGF90*). Retrieved April 29, 2020.
  15. *R: The R Project for Statistical Computing*. (n.d.). Retrieved April 29, 2020, from <https://www.r-project.org/>
  16. NETER, J. (1996). **Applied linear statistical models** (4th ed.). Irwin.
  17. LIN, L. I.-K. (1989). A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility. *Biometrics*.
  18. BANDEMER, H. (1978). BIBBY, J., H. TOUTENBURG: Prediction and improved estimation in linear models. J. Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto 1977. 201 pp., £ 7.95. **Biometrical Journal**, *20*(7–8), 826–826.
  19. HÜNERBERG, M., MCGINN, S. M., BEAUCHEMIN, K. A., ENTZ, T., OKINE, E. K., Harstad, O. M., & MCALLISTER, T. A. Impact of ruminal pH on enteric methane emissions. **Journal of Animal Science**, *93*(4), 1760–1766, 2015.



20. CROMPTON, L. A., MILLS, J. A. N., REYNOLDS, C. K., & FRANCE, J. Fluctuations in methane emission in response to feeding pattern in lactating dairy cows. In *Modelling nutrient digestion and utilisation in farm animals* (pp. 176–180). **Wageningen Academic Publishers**, (2011).
21. BLAISE, Y., ANDRIAMANDROSO, A. L. H., BECKERS, Y., HEINESCH, B., MUÑOZ, E. C., SOYEURT, H., FROIDMONT, E., LEBEAU, F., & BINDELLE, J. The time after feeding alters methane emission kinetics in Holstein dry cows fed with various restricted diets. **Livestock Science**, 217, 99–107, 2018.
22. GRAINGER, C., CLARKE, T., MCGINN, S. M., AULDIST, M. J., BEAUCHEMIN, K. A., HANNAH, M. C., WAGHORN, G. C., CLARK, H., & ECKARD, R. J. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer and chamber techniques. **Journal of Dairy Science**, 90(6), 2755–2766, 2007.
23. PICKERING, N. K., ODDY, V. H., BASARAB, J., CAMMACK, K., HAYES, B., HEGARTY, R. S., LASSEN, J., MCEWAN, J. C., MILLER, S., PINARES-PATINO, C. S., & DE HAAS, Y. Animal board invited review: Genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. **Animal** (Vol. 9, Issue 9, pp. 1431–1440). Cambridge University Press, 2015.
24. ROBINSON, D. L., GOOPY, J. P., HEGARTY, R. S., & ODDY, V. H. Comparison of repeated measurements of methane production in sheep over 5 years and a range of measurement protocols. **Journal of Animal Science**, 93(10), 4637–4650, 2015.
25. HUHTANEN, P., and HRISTOV, A. N. Letter to the Editor: Challenging one sensor method for screening dairy cows for reduced methane emissions. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 101, Issue 11, pp. 9619–9620). **Elsevier** (2018).
26. COTTLE, D. J., VELAZCO, J., HEGARTY, R. S., & MAYER, D. G. Estimating daily methane production in individual cattle with irregular feed intake patterns from short-term methane emission measurements. **Animal**, 9(12), 1949–1957. 2015.
27. TEDESCHI, & ORLINDO, L. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agricultural Systems**, 89(2–3), 225–247, 2006.
28. BEAUCHEMIN, K. A., KREUZER, M., O'MARA, F., & MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 48(2), 21, 2008.
29. KNAPP, J. R., LAUR, G. L., VADAS, P. A., WEISS, W. P., & TRICARICO, J. M. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science** (Vol. 97, Issue 6, pp. 3231–3261). **Elsevier**, 2014.
30. MOATE, P. J., DEIGHTON, M. H., JACOBS, J., RIBAUX, B. E., MORRIS, G. L., HANNAH, M. C., MAPLESON, D., ISLAM, M. S., WALES, W. J., & WILLIAMS, S. R. O. Influence of proportion of wheat in a pasture-based diet on milk yield, methane emissions, methane yield, and ruminal protozoa of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 103(3), 2373–2386, 2020.

31. MEYER, B. K. Estimates of genetic and phenotypic covariance functions for postweaning growth and mature weight of beef cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 116(3), 181–205, (1999).
32. MCGINN, S. M., BEAUCHEMIN, K. A., IWAASA, A. D., & MCALLISTER, T. A. Assessment of the Sulfur Hexafluoride (SF<sub>6</sub>) Tracer Technique for Measuring Enteric Methane Emissions from Cattle. *Journal of Environmental Quality*, 35(5), 1686–1691, 2006.
33. SACRAMENTO, J. P. Máscara facial para mensuração da emissão de metano entérico e produção de calor em vacas lactantes. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Bioengenharia - Universidade Federal de São João Del – Rei, Minas Gerais).
34. SANTOS, M. R. Técnica da máscara facial para mensuração da emissão de metano e produção de calor em vacas girolando no terço final da lactação. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal - Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia).
35. FREIRE, L. D. R. Amilase exógena e óleos essenciais como alternativa à monensina em dietas de vacas em lactação. (2018). **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia.

**Tabela 1.** Informações gerais dos experimentos utilizados no banco de dados da pesquisa

Item	Experimento A <sup>1</sup>	Experimento B <sup>2</sup>	Experimento C <sup>3</sup>	Experimento D <sup>4</sup>
<b>Protocolo experimental<sup>5</sup></b>	23/2014	23/2014	29/2015	28/2014
<b>Número de animais</b>	24	28	36	21
<b>Raça</b>	¾ Holandês x ¼ Gir	¾ Holandês x ¼ Gir	5/8 Holandês x Gir	¾ Holandês x Gir
<b>Dieta</b>	Silagem de Milho + Feno de + Tifton + Concentrado	Silagem de Milho + Concentrado	Silagem de Milho + Feno de + Tifton + Concentrado	Silagem de Milho + Concentrado
<b>Relação V:C</b>	520:480 g/kg MS	744:256 g/kg MS	546:454 g/kg MS	530:470 g/kg MS
<b>Produção de leite</b>	21kg/dia	14kg/dia	14kg/dia	20kg/dia
<b>Terço da lactação</b>	Terço médio	Terço Final	Terço Médio	Terço inicial

Experimento A<sup>1</sup>: Sacramento (2017), Experimento B<sup>2</sup>: Santos (2017), Experimento C<sup>3</sup>: Silveira et al., (2019), Experimento D<sup>4</sup>: Freire (2018), Protocolos experimentais<sup>5</sup>: Comissão de ética no uso de animais da Embrapa Gado de Leite, Relação V:C - proporção volumoso e concentrado na dieta.

**Tabela 2.** Estatística descritiva das variáveis avaliadas

Variável	Câmara Respirométrica				Máscara Facial			
	#N	Médias	Min	Max	#N	Médias	Min	Max
<b>CH<sub>4</sub></b>	109	437.61	241.69	621.54	109	447.78	242.15	666.24
<b>CMS</b>	109	15.50	6.76	26.42	109	16.78	6.81	27.96
<b>CH<sub>4</sub> g/Kg CMS</b>	109	28.76	14.95	44.37	109	28.44	12.07	55.24
<b>CH<sub>4</sub> g/Kg leite</b>	109	18.09	8.21	37.39	109	19.35	9.12	61.92

CH<sub>4</sub> (L/d) – metano em litros por dia, CMS(Kg/d) – consumo de matéria seca em quilos por dia, CH<sub>4</sub> g/Kg CMS - metano por consumo de matéria seca, CH<sub>4</sub> g/Kg leite - metano por kg de leite produzido.

**Tabela 3.** Médias experimentais da produção de CH<sub>4</sub> consumo de matéria seca (CMS), rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub> e de eficiência preditiva entre as técnicas da câmara respirométrica e da máscara facial em bovinos leiteiros

Item	Câmara Respirométrica		Máscara Facial	P-value
	<i>Médias</i>			
<b>CH<sub>4</sub> L/dia</b>	437.61		447.78	0.3981
<b>CMS</b>	15.50		16.78	0.007*
<b>CH<sub>4</sub> g/Kg CMS</b>	28.76		28.44	0.6685
<b>CH<sub>4</sub> g/Kg leite</b>	18.09		19.35	0.0724
	<i>Métricas de eficiência preditiva</i>			
	R <sup>2</sup>	MB	CCC	MSE
<b>CH<sub>4</sub> CR (20h) vs MF</b>	0.20	-41.23	0.45	33298.98

CH<sub>4</sub> (L/d) – metano em litros por dia, CMS(Kg/d) - consumo de matéria seca, CH<sub>4</sub> - Produção de metano na câmara respirométrica em L/dia; CH<sub>4</sub> g/Kg MS – rendimento de metano; CH<sub>4</sub> g/Kg leite – intensidade de metano; CH<sub>4</sub> CR (20h) vs MF - produção de metano na câmara respirométrica comparado com a máscara facial;

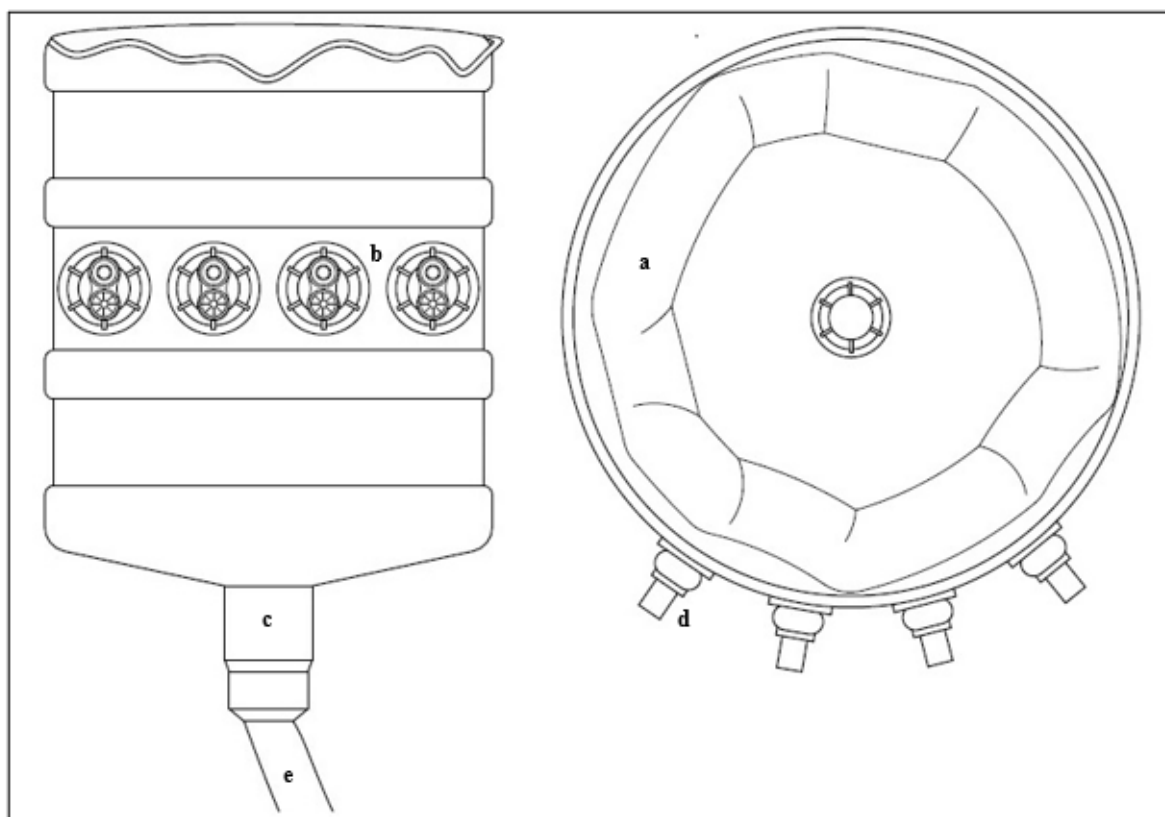
**Tabela 4.** Médias experimentais da produção de CH<sub>4</sub>, rendimento e intensidade de CH<sub>4</sub> em bovinos leiteiros na câmara respirométrica e nos pontos das subamostragens 240, 260, 640, 660, 680min após a alimentação e métricas de eficiência preditiva dos modelos.

Item	Câmara Respirométrica	CR (20h) vs 240	CR (20h) vs 260	CR (20h) vs 640	CR (20h) vs 660	CR (20h) vs 680	
<i>Médias</i>							<i>P-valor</i>
CH <sub>4</sub> L/dia	437.61	437.35	439.48	448.71	445.03	439.04	0.9476
CH <sub>4</sub> g/Kg CMS	28.76	28.89	30.96	30.18	29.83	29.57	0.4985
CH <sub>4</sub> g/Kg leite	18.09	18.88	19.39	18.94	18.71	18.58	0.6872
<i>Métricas de eficiência preditiva</i>							
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>MB</b>	<b>CCC</b>	<b>MSE</b>			
CH <sub>4</sub> CR (20h) vs 240	0.35	-44.71	0.58	32086.81			
CH <sub>4</sub> CR (20h) vs 260	0.38	-95.33	0.59	29346.15			
CH <sub>4</sub> CR (20h) vs 640	0.66	-74.53	0.79	14349.27			
CH <sub>4</sub> CR (20h) vs 660	0.67	-59.43	0.80	13803.91			
CH <sub>4</sub> CR (20h) vs 680	0.65	-46.78	0.79	14613.5			

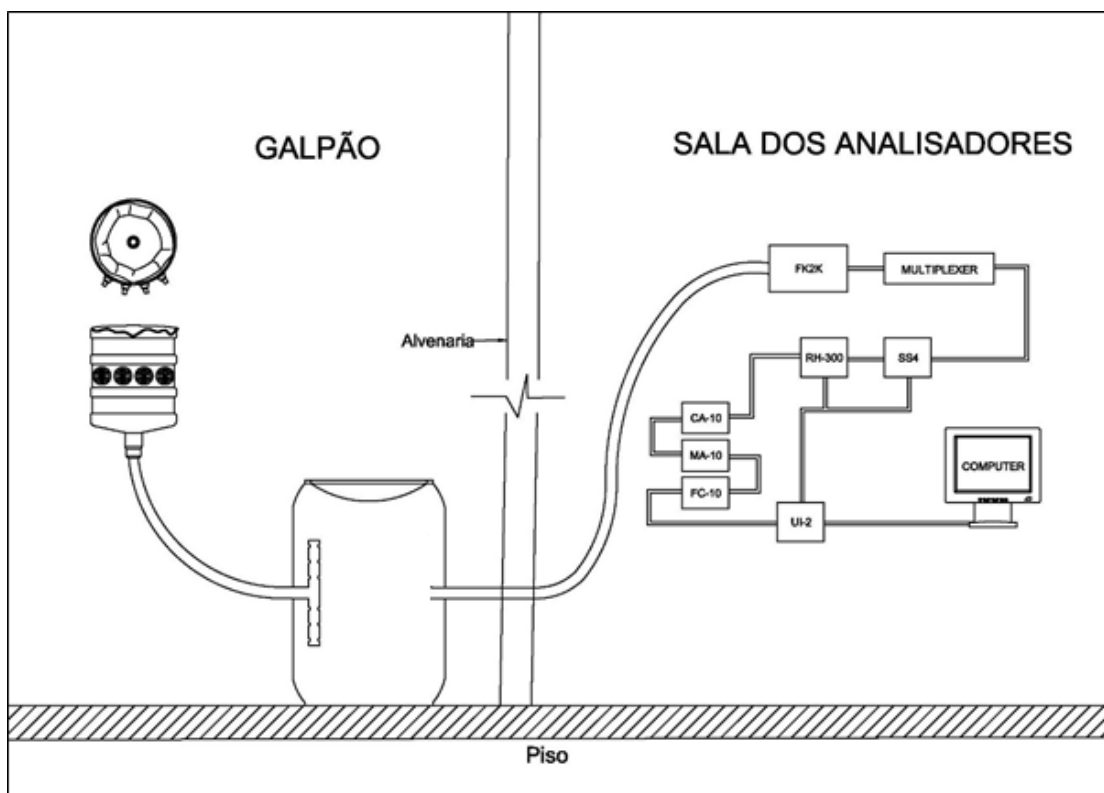
CH<sub>4</sub> – Produção de metano na câmara respirométrica em L/dia; CH<sub>4</sub> g/Kg MS – rendimento de metano; CH<sub>4</sub> g/Kg leite – intensidade de metano; CH<sub>4</sub> CR (20h) vs 240, 260, 640, 660, 680 – pontos na CR com altas correlações com a produção total na CR, R<sup>2</sup>- coeficiente de determinação; MB – viés médio; CCC – coeficiente de correlação e concordância; MSE – erro quadrático médio.



**Figura 1.** Animal sendo avaliado pela técnica da máscara facial

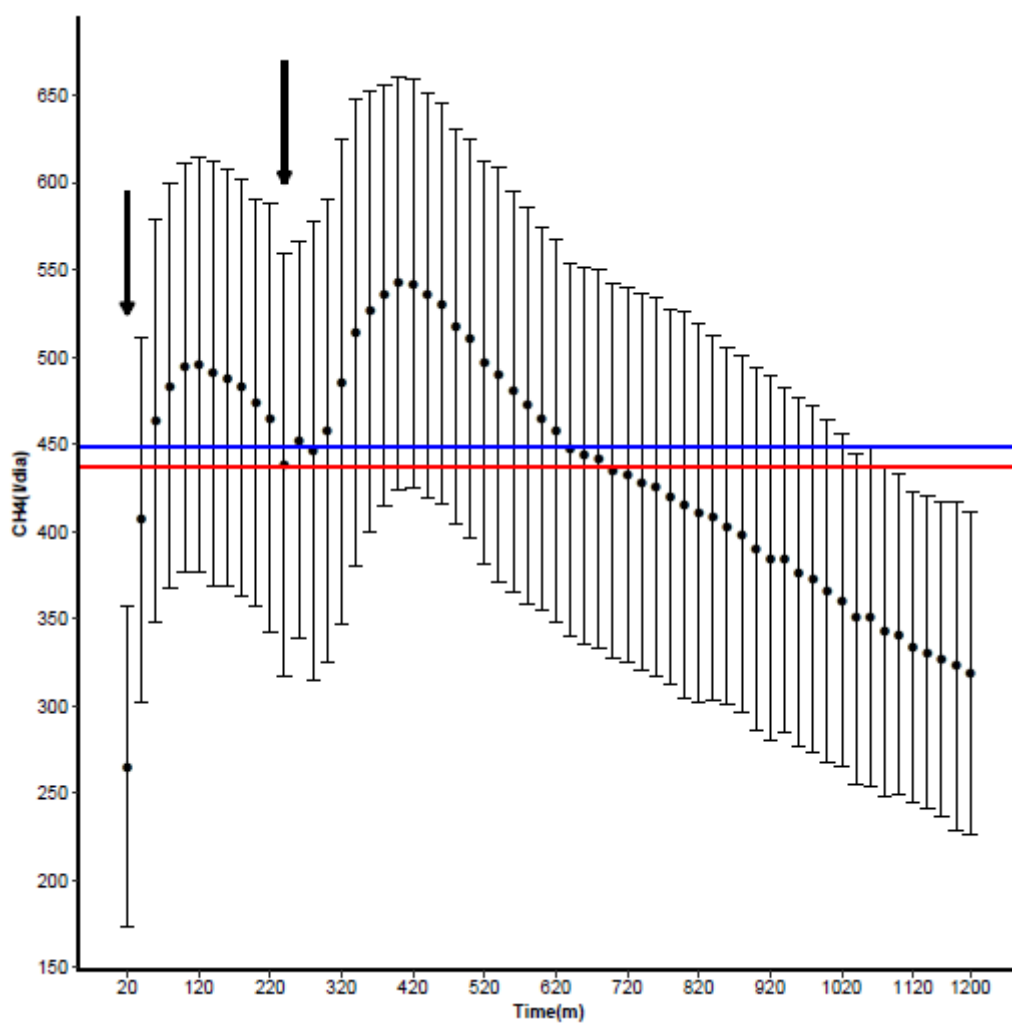


**Figura 2.** Desenho esquemático da máscara facial. **a:** câmara de ar, **b:** flanges, **c:** adaptador para conexão da tubulação, **d:** válvulas para controle da entrada de ar externo, **e:** tubo flexível.

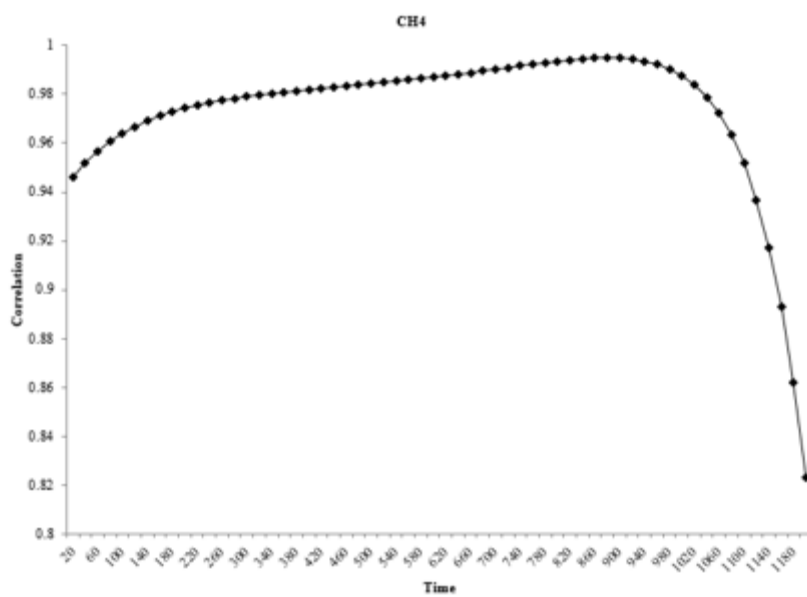


**Figura 3.** Sistema usado para a coleta *spot* na Máscara Facial. SS4 = bomba de subamostragem, RH-300 = analisador de vapor d'água, CA-10 = analisador de CO<sub>2</sub>, MA-10 = analisador de CH<sub>4</sub>, FC-10 = analisador de O<sub>2</sub> e UI-2 = conector universal.

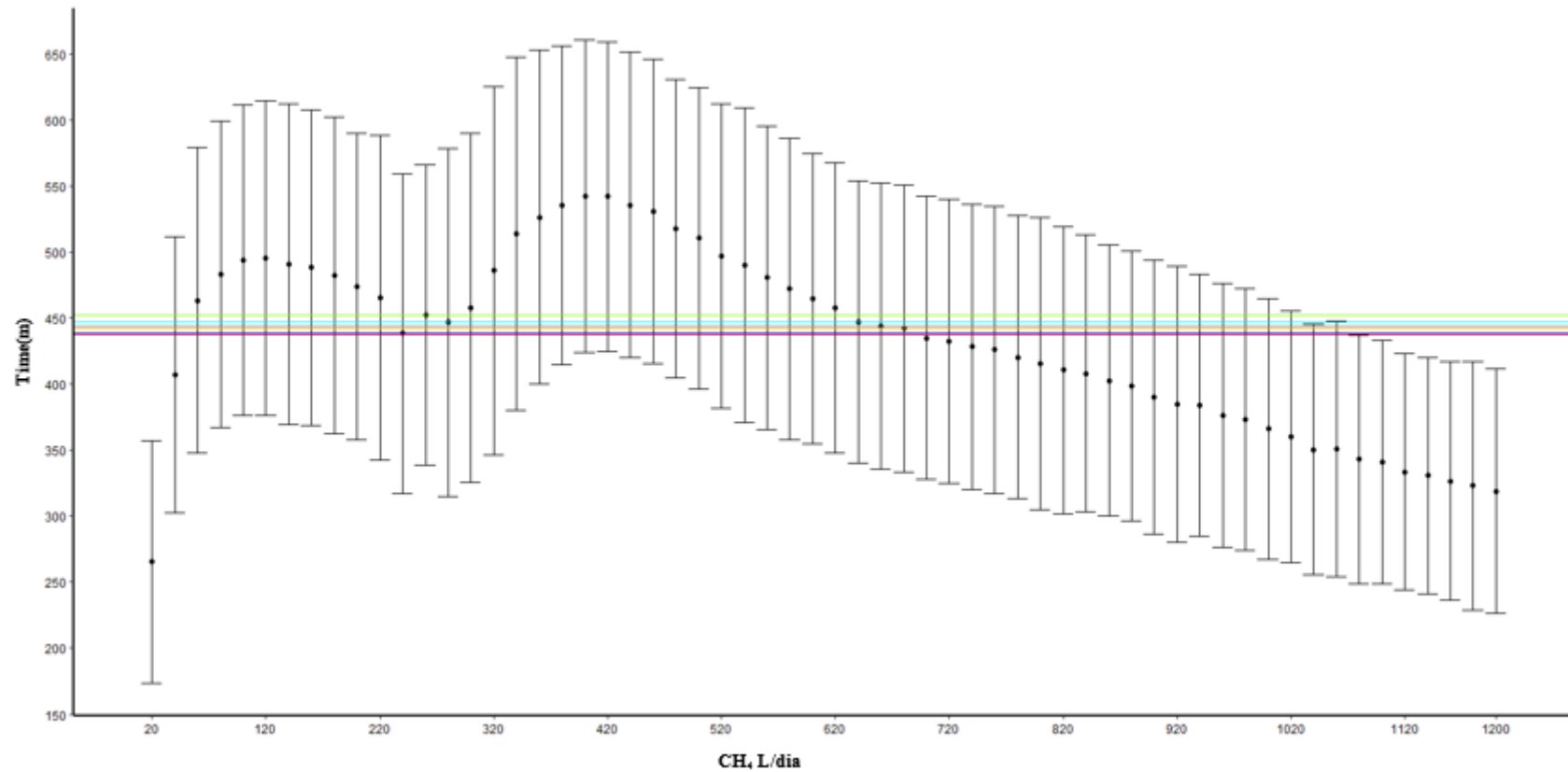




**Figura 4.** Dinâmica de produção de CH<sub>4</sub>/L em bovinos leiteiros da raça Girolando. Linha azul representa a produção diária na Máscara Facial e linha vermelha a produção na Câmara Respirométrica.



**Figura 5.** Correlação entre as mensurações de CH<sub>4</sub> entérico na Câmara Respirométrica e na Máscara Facial.



**Figura 6.** Dinâmica de produção de  $\text{CH}_4/\text{L}$  em bovinos leiteiros da raça Girolando mensurado na câmara respirométrica e as estimativas de produção das subamostragens 240, 260, 640, 660, e 680min após alimentação. Linha vermelha representa a produção diária na Câmara Respirométrica, linha azul marinho representa a estimativa da produção diária na subamostragem 240, linha azul clara representa a estimativa da produção diária na subamostragem 260, linha verde representa a estimativa da produção diária na subamostragem 640, linha laranja representa a estimativa da produção diária na subamostragem 660, linha cinza representa a estimativa da produção diária na subamostragem 680.