

CIÊNCIAS
AGRÁRIAS



A coleção
Cadernos Acadêmicos da UFGD
tem como objetivo divulgar
o material produzido
pelos docentes da universidade,
para uso didático nas atividades
de ensino e extensão.



**TÉCNICAS LABORATORIAIS
NA ANÁLISE DE ALIMENTOS**

Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes
Hellen Leles Lima



Universidade Federal da Grande Dourados

COED
Editora UFGD

Coordenador Editorial : Edvaldo Cesar Moretti
Técnico de apoio: Givaldo Ramos da Silva Filho
Redatora: Raquel Correia de Oliveira
Programadora Visual: Marise Massen Frainer
e-mail: editora@ufgd.edu.br

Conselho Editorial - 2009/2010
Edvaldo Cesar Moretti | Presidente
Wedson Desidério Fernandes | Vice-Reitor
Paulo Roberto Cimó Queiroz
Guilherme Augusto Biscaro
Rita de Cássia Aparecida Pacheco Limberti
Rozanna Marques Muzzi
Fábio Edir dos Santos Costa

Revisão: Raquel Correia de Oliveira
Projeto gráfico e capa: Marise Massen Frainer
Impressão: Gráfica Centro Imagem | Campo Grande | MS

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

636.0855 Goes, Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli
G598t Técnicas laboratoriais na análise de alimentos. /
Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli Goes,
Hellen Leles Lima. – Dourados, MS: Ed.UFGD,
2010.
52p . – (Cadernos acadêmicos UFGD. Ciências
agrárias).

ISBN
973-85-61228-66-8

1. Nutrição animal – Análise. 2. Alimentos - Aná-
lise. I Lima, Hellen Leles. II. Título.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Amostragem na Bromatologia	9
Coleta e cuidados com a amostra	
Cuidados a serem realizados na amostragem/coleta da amostra	
Preparação da amostra	
Amostragem de fezes e urina	
Grãos	
Roteiro para coleta de amostras de produtos a granel	
Roteiro para coleta de amostras de produtos ensacados	
Considerações gerais	
3. Composição Centesimal	20
Matéria seca (MS) e umidade	
Matéria seca parcial ou pré-secagem (ASA)	
Matéria seca total ou secagem definitiva (ASE)	
Matéria mineral ou cinza	
Proteína bruta (PB) ou nitrogênio total	
Fibra bruta (FB)	
O método de Van Soest na determinação da qualidade de forrageiras	
Determinação de fibra em detergente neutro	
Determinação da fibra em detergente ácido	
Determinação de lignina	
Gordura ou extrato etéreo	
4. Avaliação da Digestibilidade “IN VITRO” da Matéria Seca	40
Digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) usando o instrumento “daisy”	
(<i>in vitro true digestibility- ivtd</i>)	
Segundo Estágio (Pepsina + HCl 6N)	
Cálculos	
Procedimentos de coleta, preparo e incubação do inócuo	
5. Bibliografia	50



1. Introdução

Esse manual tem como objetivo facilitar o acesso de estudantes de graduação em Zootecnia e profissionais ligados à área de avaliação de alimentos para animais, seguindo as metodologias mais utilizadas em laboratórios de análise de alimentos.

A produção animal é uma área voltada principalmente para o fornecimento de alimentos e outros produtos de origem animal para atendimento das necessidades do homem. O objetivo prático da avaliação de alimentos é aperfeiçoar a sua eficiência de utilização, oferecendo assim uma resposta mais confiável em relação à produção animal e proporcionando retorno financeiro mais adequado ao produtor (BERCHIELLI, 2006).

A análise de alimentos a serem utilizados para rações animais, forrageiras e outros alimentos é de muita importância para todos os pesquisadores. O objetivo principal destas análises é conhecer a composição química, além de verificar a identidade e pureza, sejam elas de natureza orgânica ou inorgânica, do material analisado. Um estudo mais completo desses alimentos e dessas forragens conterá propriedades como: aroma, aspecto, sabor, alterações, estruturas microscópicas e a digestibilidade – que interessa especialmente ao zootecnista – que irá determinar o valor nutritivo deste alimento, ou seja, a parte do alimento que estaria disponível para o animal.

É importante saber que essas análises não representam compostos quimicamente definidos, mas sim grupos de compostos químicos. A proteína, por exemplo, não só abrange vários compostos químicos e compostos de nitrogênio, como o extrato etéreo; ela inclui também os triglicerídeos, outros compostos solúveis em éter, como pigmentos e ceras.

O método normalmente usado para as análises é chamado de

“Weende”. Por este método é que se tem a análise aproximativa dos alimentos, desde 1864, com exceção do nitrogênio, que é feito pelo método KJELDAHL (A.O.A.C.,1984).

As análises clássicas comumente feitas visam obter informações sobre Matéria Seca, Proteína Bruta, Gordura ou Extrato Etéreo, Fibra Bruta, Extrato Não Nitrogenado e Cinza ou Matéria Mineral.

O método descrito por VAN SOEST (1967) foi usado de forma complementar para se obter maiores informações sobre a forrageira estudada, por ser mais preciso nas informações de carboidratos, separando a fibra bruta em fibra em detergente neutro e detergente ácido.

Procurou-se a forma mais prática e fácil de construir este material, para corresponder às principais necessidades de estudo ligadas à nutrição animal e análise de alimentos, buscando as técnicas mais recentes e visando atender aos novos e mais dinâmicos conceitos dessa área científica.

2. Amostragem na Bromatologia

2.1. Coleta e cuidados com a amostra

A coleta tem por finalidade obter amostras representativas da média do material e ser analisado. Deve ser realizada da forma mais cuidadosa possível para obter uma amostra que, mediante sua análise, indique com precisão a qualidade real do lote, transferência e propriedade, saída ou nas inspeções que porventura ocorram. Deve-se retirar numerosa quantidade de amostras parciais, colhidas em diferentes pontos e locais de interesse: campo, fabricação, depósito, transporte, sacaria, etc. Desta amostra às vezes volumosa, após homogeneizada, podem ser retiradas amostras parciais, antes que sejam enviadas ao laboratório.

Após a coleta a amostra deve ser armazenada de forma correta, a fim de se preservar o valor nutritivo, e ao mesmo tempo deve ser identificada corretamente (selada ou rotulada), para finalmente ser transportada ao laboratório.

Uma amostragem deficiente resultará sempre em valores errôneos em análises posteriores, impossibilitando o estabelecimento de manejo adequado para a perfeita estocagem e conservação dos alimentos.

2.2. Cuidados a serem realizados na amostragem /coleta da amostra

- Amostragem deve ser ao acaso
- Número de amostras (variável)

≥ 4 (sempre)	
≤ 100 recipientes	10% a coletar (mínimo 5)
101-200 recipientes	5% a coletar (mínimo 10)
201-2000	3% a coletar (mínimo 25)
> 2000	1% a coletar (mínimo 50)

-
- Quantidade de amostra (a quantidade deve ser suficiente para se realizar todas as análises propostas).
 - Embalagem (preservar o alimento contra alterações entre o local de coleta e o laboratório)
 - Rotulagem (identificação da amostra)
 - Produto, local da coleta, data da coleta (horário, se pertinente), observação.
 - Transporte (imediatamente para o laboratório, evitar alterações, refrigeração – amostras deterioráveis).

2.3. Preparação da amostra

Durante a preparação da amostra no laboratório deve-se assegurar a homogeneização, de tal forma que qualquer porção utilizada possa ser representativa de um todo.

As amostras que se necessite ao chegar devem ser cortadas em pequenos pedaços com faca inoxidável, para posterior homogeneização. Após esta tritura prévia, o material deve ser identificado e colocado em saco de papel previamente pesado e levado à balança (com precisão de duas casas decimais). O peso total (amostra mais saco de papel) deve ser anotado no formulário próprio. Antes de levar o material para a estufa de secagem com ventilação forçada, deve-se perfurar o saco de papel, para permitir melhor circulação de ar.

2.3.1. Forrageiras – pastagens

Devem ser coletadas amostras em “zig zag”, no mínimo 15. Logo em seguida devem ser homogeneizadas e misturadas, retirando uma sub-amostra para posterior análise. Acondicioná-las em sacos plásticos, alocadas em caixa de isopor ou refrigeradas para que não ocorra uma perda de umidade.

Tão logo as amostras sejam colhidas deverão ser embaladas e enviadas ao laboratório com rapidez, a fim de se evitar perdas de umidade e a ocorrência de fermentações indesejáveis. Muitas vezes a amostra encaminhada tem sua origem de amostras parciais, colhidas em diferentes pontos do local de interesse. A manipulação da amostra, até o momento de sua análise, deverá ser tão cuidadosa quanto possível, para evitar a ocorrência de alterações nos princípios nutritivos existentes (SILVA e QUEIROZ, 2002).

Ao coletar amostras rentes ao solo, deve-se ter cuidado para que não haja contaminação de material morto e/ou terra.

2.3.2. Silagens, feno e outras amostras

Para fenos a amostra deve ser retirada de acordo com o tamanho do experimento, utilizando-se o bom senso. Por exemplo: em lotes de um (1) a 10 fardos, todos devem ser avaliados; em lotes com 10 a 100 fardos retira-se uma amostragem de 10 fardos ao acaso e em lotes com mais de 100 fardos pode-se amostrar 10% dos fardos ao acaso.

Na avaliação de silagens, geralmente 10 a 15 amostras são coletas de locais diferentes do silo, dependendo este número do tipo e tamanho do silo. O material deve ser devidamente ensacado, com etiqueta escrita a lápis. O ar deve ser retirado e devem constar na ficha de encaminhamento das amostras informações sobre o período de armazenamento, condições do clima no momento da ensilagem, aditivos utilizados e a data de plantio e colheita. O material deve ser mantido no freezer antes de ser encaminhado ao laboratório.

2.4. Amostragem de fezes e urina

Amostras de fezes, geralmente coletadas para ensaios de digestibilidade, devem ser bem homogeneizadas e corresponder entre um (1) e 5% da quantidade produzida diariamente, ao longo de sete (7) dias de

coleta. O material deve ser congelado. Já a coleta da urina deve ser efetuada uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos. Ao final as amostras devem ser bem misturadas, dando origem a pelo menos duas amostras representativas. O material deve ser conservado a 10°C.

2.5. Grãos

2.5.1. Equipamentos utilizados

Os seguintes equipamentos são usados na amostragem de grãos sob diferentes circunstâncias e na manutenção da representatividade da amostra durante o período necessário.

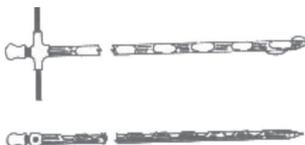
2.5.2. Caladores simples

São extratores metálicos utilizados para a retirada de amostras em sacaria de aniagem ou algodão através de simples furação dos sacos.



2.5.3. Caladores (sondas manuais)

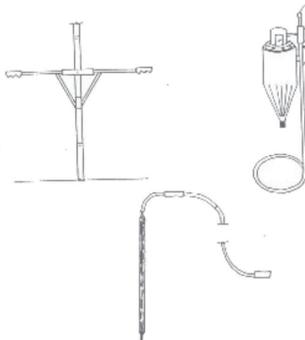
São extratores metálicos utilizados na amostragem de grãos a granel, possuem divisões (septos) no seu interior, permitindo a retirada de muitas pequenas amostras de uma só vez, em várias profundidades.



2.5.4. Sondas Pneumáticas

São equipamentos que retiram as amostras através de sucção dos grãos. Deve-se observar que o uso desses equipamentos na recepção de grãos não é permitido já que pode causar erros na amostragem devido à retirada de mais quantidades de impurezas leves do que deveria e

menos impurezas pesadas do que realmente possa existir. Poderá ser utilizada em fábricas que recebam produtos limpos e secos.



2.5.5. Sondas Torpedo

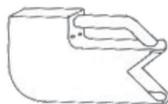
São extratores utilizados para coleta de amostras de produtos a granel a grandes profundidades e dotados de varetas auxiliares que vão se encaixando uma à outra pelo sistema de roscas, possuindo ainda um terminal para facilitar a sua introdução no interior da massa de grãos. Tais equipamentos são próprios para o controle de armazenagem ou verificação parcial da qualidade de um silo ou graneleiro.



2.5.6. Pelicanos

São coletores de amostras de produtos a granel em queda livre (dutos de descarga) ou na saída dos transportadores, como correias transportadoras, elevadores de caneca, roscas sem fim. Devem ser utilizados baldes para depósito das pequenas amostras à medida que elas vão sendo retiradas, visando posterior homogeneização.

Tais equipamentos são adotados como padrão na coleta de amostras de produtos descarregados em nossas moegas, não podendo em hipótese alguma serem utilizados outros equipamentos.



2.6. Roteiro para coleta de amostras de produtos a granel

2.6.1. Épocas de coleta

a) Antes de efetuar a pesagem do veículo pré-amostragem dos grãos, seja ainda na fila de espera ou já no pátio do armazém. Essa operação dará informações sobre a qualidade do produto, através de determinações de sua sanidade, teor de umidade e de impurezas, permitindo escolher o local e/ou moega onde será descarregado ou optar pela rejeição do mesmo.

Tal procedimento, além de facilitar a secagem devido à separação de produtos de mesma umidade, agiliza o recebimento na unidade. O equipamento indicado para a pré-amostragem é o calador.

b) Durante a descarga nas moegas, será feita a amostragem oficial utilizando-se o pelicano. A partir dessas amostras, depois de homogeneizadas, é feita a determinação da qualidade dos grãos.

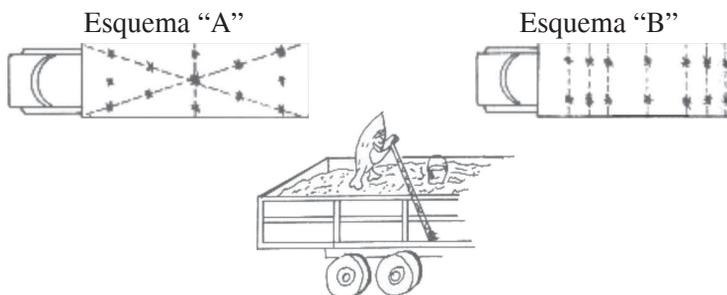
c) No decorrer do período de armazenamento deverão ser realizadas amostragens da massa de grãos a título de inspeção, a fim de se verificar o estado qualitativo e fitossanitário do produto estocado. Para esta atividade deverão ser utilizadas sondas torpedo na coleta de amostras superficial e o pelicano na coleta de amostras pelas bocas de descarga.

d) Por ocasião da expedição do produto, deverão ser reti-

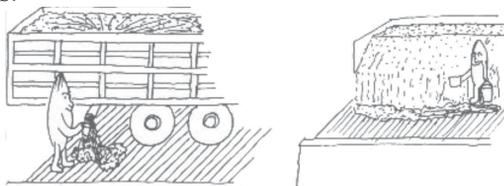
radas amostras para sanar as dúvidas quanto à natureza e características do produto expedido. Pode-se utilizar o pelicano durante o carregamento, todavia o calador é o mais indicado.

2.6.2. Procedimento operacional propriamente dito

a) Na coleta de amostras realizada com introdução em posição oblíqua do calador na massa de grãos, o esquema de coleta a ser utilizado será determinado pelo classificador que poderá alternar para cada operação.

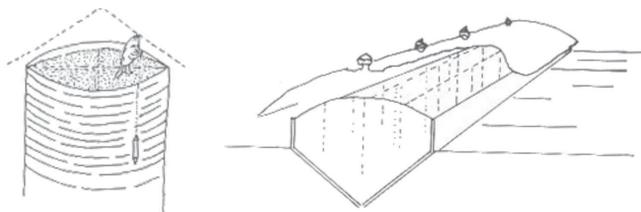


b) As amostras relativas à entrada do produto na unidade de armazenagem deverão ser coletadas com uso de pelicanos. Tal coleta se dá durante toda a descarga, com no mínimo três giros no caminhão (um no início, um no meio e outro no fim da descarga). Nos caminhões basculantes a coleta é semelhante à realizada nos caminhões convencionais.



c) No caso de silos pode-se estabelecer para coleta de amostras os quatro pontos cardeais e o centro da massa a

alturas pré-determinadas da massa de grãos, como mostra e esquema abaixo:



- As amostras podem ser coletadas com sonda pneumática, sonda torpedo ou mesmo caladores. Neste tipo de amostragem, as amostras devem ser analisadas separadamente, segundo as diferentes alturas em que forem coletadas para verificação da existência de possíveis “bolsas” de calor ou umidade.

Para armazéns graneleiros ou piscinas o procedimento é semelhante, devendo-se aumentar o número de pontos de coleta e distribuí-los de acordo com o dimensionamento das estruturas armazenadoras em questão.

2.7. Roteiro para coleta de amostras de produtos ensacados

2.7.1. Épocas de coleta

A operação deverá ser realizada por ocasião do recebimento e expedição do produto, bem como em casos de transferência de propriedade, visando à determinação de seu percentual de umidade e de impurezas.

No recebimento da mercadoria, deve-se avaliar as condições em que os grãos se apresentam. Averiguar a necessidade de equipamentos de secagem e/ou limpeza ou da opção pelo seu armazenamento imediato quando as características de teor de umidade e impurezas assim o permitirem.

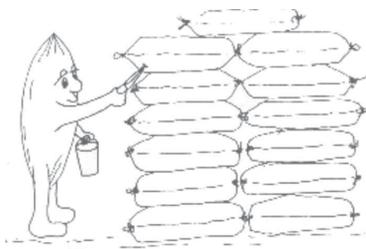
No decorrer do período de armazenagem, amostragens poderão ser realizadas a título de inspeção sempre que houver indícios de infestação por insetos ou de deterioração no produto estocado.

2.7.2. Quantidades a extrair

a) Nos lotes de produtos ensacados, proceder retirado de amostras em no mínimo 10% do total de sacas, numa proporção mínima de 30 gramas de cada saca.

2.7.3. Procedimento operacional propriamente dito

As amostras são obtidas através da furação dos volumes (sacas) com caladores simples. A operação consiste em introduzir o calador no sentido de baixo para cima, promovendo-se o movimento vai e vem para facilitar o deslizamento do produto.



2.8. Considerações gerais

De acordo com Silva e Queiroz (2002), a maioria das amostras se encontram em uma das seguintes categorias: (1) suficientemente secas para serem finamente moídas e analisadas imediatamente (amostra com mais de 90% de matéria seca); (2) suficientemente secas para serem grosseiramente moídas (peneira de 3-6 mm), mas ainda muito úmidas, que precisem ser pré-secas ou parcialmente secas antes de finamente

serem moídas (amostra com mais ou menos 85% de matéria seca); e (3) amostras que precisam ser pré-secas antes de serem grosseiramente moídas (peneiras de 4-6 mm) e finamente moídas (amostra com baixo teor de matéria seca).

Estas categorias de amostras devem ser manejadas diferentemente, isto é, necessitam de tritura prévia, moagem preliminar ou moagem final.

Tritura prévia – a primeira tritura de amostras feitas com tesouras ou facas, que geralmente ocorre com as forragens verdes, raízes, tubérculos e etc. que necessitam ser cortados antes da secagem final. Os grãos são grosseiramente triturados em moinhos adequados, enquanto as forragens ensiladas e as rações fareladas não necessitam dessa tritura.

Moagem preliminar – ocorre após a trituração prévia em amostras com 85 % ou mais de matéria seca (rações fareladas) ou em amostras com menos de 85% de MS (forragens verdes) que já foram pré-secas, de acordo com a Figura 1.

Moagem final – nessa etapa mói-se as amostras até obter um pó bem fino, usando-se moinho de facas ou ciclone com peneiras de 1 mm. É realizada após a moagem prévia e preliminar com amostras.

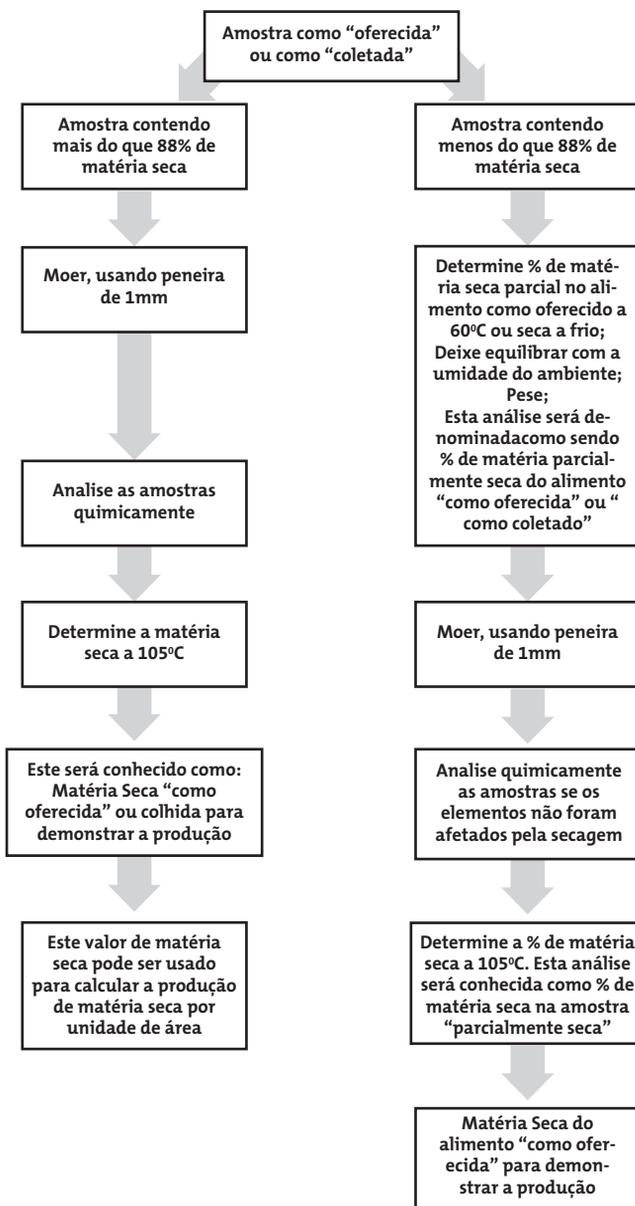


Figura 1- Fluxograma de preparo das amostras enviadas ao laboratório de nutrição animal

3. Composição centesimal

3.1. Matéria seca (MS) e umidade

É o ponto de partida para análise de alimentos, tanto no aspecto de conservação como no de comparação do valor nutritivo dos alimentos.

Pode ser dividido em matéria seca parcial ou pré-secagem e secagem definitiva para então se determinar a matéria seca total.

3.2. Matéria seca parcial ou pré-secagem (ASA)

A umidade é evaporada da amostra e a matéria parcialmente seca é determinada como resíduo remanescente após a secagem em estufa.

Realizada quando as amostras contem alto teor de umidade (gramíneas, silagens, etc.), em estufa de circulação forçada de ar com temperatura de 55° C por 16 / 24 horas para se evitar perdas por volatilização ou alteração dos nutrientes.

O tempo de secagem pode variar de acordo com a umidade da amostra e pode durar até três dias ou quando a amostra estiver em aspecto quebradiço, permitindo a moagem perfeita. A perda de água deve ser computada no cálculo da umidade final, portanto o material deve ser pesado antes de ser colocado na estufa. Deve-se pesar o material em que serão acondicionadas as amostras (sacos de papéis, plásticos, etc...)

Feito isso, leva-se o saco com amostra para a estufa com circulação de ar forçado, a uma temperatura de 60° ± 5° C por 72 horas para pré-secagem (atingir aspecto quebradiço / ponto de feno, aproximadamente 18% de matéria seca). Após este período, o material deve ser retirado da estufa e colocado sobre um balcão por 1 hora, para que a umidade da amostra entre em equilíbrio com a umidade do ambiente. Este material é chamado de amostra seca ao ar (ASA).

Após resfriado, faz-se pesagem do saco contendo a amostra seca ao ar (ASA). A seguir, a ASA deve ser processada em moinho contendo peneira de 30 “mesh”, ou seja, 30 furos por polegada linear (1mm). A fração moída deve ser recolhida em um frasco de vidro escuro com tampa de polietileno, que deve ser etiquetado e armazenado para posteriores análises.

Exemplo: Amostra de Braquiária do brejo (B. arrecta)

Tara (saco de papel): 9,32g

Tara mais amostra verde: 446,00g

Tara mais ASA: 200,27g

Amostra verde: 436,68g

ASA = 200,27 – 9,32 = 190,95

%ASA = = 43,7276

3.3. Matéria seca total ou secagem definitiva (ASE)

Usadas em amostras submetidas à pré-secagem ou que contenham mais de 80% de MS (rações fareladas, grãos, farelos, etc...)

A determinação da matéria seca (MS) é o ponto de partida da análise de alimentos, pois possibilita a comparação dos dados encontrados com outros afins (independente de época, local ou região). A análise de MS é feita retirando-se a água livre do material a ser analisado, que é a maior fração de água existente nos alimentos. As demais formas de água encontradas nas forrageiras e alimentos concentrados são denominadas de estrutura e de constituição, que apesar da importância sob o aspecto físico-químico não apresentam valores no aspecto prático, pelos baixos teores com que estão presentes.

A determinação de umidade pode ser feita por dois processos: direto e indireto. De um modo geral, o procedimento constitui-se de duas

fases: secagem prévia (ASA), e secagem definitiva conhecida como Amostra Seca em Estufa (ASE).

O método indireto consiste na determinação da MS, considerada por diferença de peso, sendo que esta correspondente à perda de água – na realidade ocorrem perdas de outras substâncias voláteis, além de água, que acabam sendo consideradas como água, levando a um erro que é considerado uma desvantagem deste método.

A umidade é eliminada da amostra pela secagem em estufa a uma temperatura de 135°C por duas horas, ou 100°C por 24 horas, ou 105°C por 16 horas (uma noite).

Procedimento:

A secagem definitiva é realizada a partir do material coletado, em duplicata, cada uma pesando aproximadamente 2g. Pese as amostras em um pesa filtro ou placa de petri com tampa, previamente secos e tarados, fazendo a secagem em estufa a 105.°C durante uma noite.

Depois retire os pesa filtros da estufa, colocando-os em dessecador durante 1 hora para esfriar, quando forem pesados. Nesses procedimentos, realize as pesagens para determinação da MS realizadas em balança analítica com precisão de 0,0001g. O material assim obtido é chamado de amostra seca em estufa (ASE).

Cálculo percentual da Amostra Seca na Estufa (ASE)

$$\% ASE = \frac{ASE(g)}{ASA(g)} * 100$$

A determinação de matéria seca total (MST) é obtida através da seguinte expressão:

$$\% MST = \frac{\% ASA * \% ASE}{100}$$

A determinação da umidade total é calculada subtraindo-se de 100 g a percentagem de matéria seca.

$$\text{Umidade} = 100 - \text{MST}$$

Quadro 1. Determinação da Secagem Definitiva.

	Nº PF	Pesa Filtro (g)	Pesa Filtro + ASA (g)	Pesa Filtro + ASE (g)	ASA (g)	ASE (g)	ASE %	ASA %	MST %	Umidade %
1	148	35,533	37,743	37,5053	2,210	1,9520	87,8883	43,7276	38,4314	61,5686
2	83	34,2210	36,2696	36,0215	2,0486	1,8005	87,8892	43,7276	38,4318	61,5682
	Média						87,8888	42,7276	38,4316	61,5684

Resumindo:

$$ASA (\%) = \frac{\text{AMOSTRA}}{\text{ASA}} \times 100$$

$$ASE (\%) = \frac{\text{ASA}}{\text{peso amostra seca}} * 100$$

$$\%MST = \frac{100}{\%ASA} * \%ASE$$

$$\%U = 100 - MST (\%)$$

$$MST\% = 100 - U\%$$

3.4. Matéria mineral ou cinza

Cinza ou resíduo mineral é o produto que se obtém após o aquecimento de uma amostra, à temperatura de 500 a 600°C, até o aquecimento ao rubro, porém não superior a 600°C, durante quatro horas ou até a combustão total da matéria orgânica. Por meio de aquecimento em temperatura elevada, todas as substâncias voláteis que se decompõem pelo calor são eliminadas, e a matéria orgânica é toda transformada em CO₂, H₂O, etc.

A cinza, nos alimentos, contém principalmente os seguintes cátions: cálcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cobre, cobalto, alumínio; e ânions: sulfato, cloreto, silicato, fosfato, etc.

A determinação da cinza é feita muitas vezes apenas para se conhecer o extrato não nitrogenado (ENN), e/ou matéria orgânica de determinadas amostras, sem a preocupação do teor de minerais. Assim sendo, pode-se fazer a determinação da matéria mineral, dependendo do objetivo do pesquisador em seu trabalho e

também do tipo de alimento a ser analisado. Por exemplo, quando analisamos produtos como farinha de ossos ou produtos de origem marinha, o teor de cinzas pode permitir uma boa estimativa da riqueza de cálcio e fósforo, no entanto, quando analisamos produtos vegetais, a determinação da cinza tem relativamente pouco valor, isto porque seus componentes minerais são muito variáveis.

Forrageiras ricas em sílica resultam em valor elevado de cinzas, porém essa não apresenta nenhum benefício nutricional ao animal.

Existem dois métodos para se determinar as cinzas: incineração simples e incineração dupla (não mais usado pelos inconvenientes que apresenta na prática).

Na determinação da matéria mineral são usados cadinhos de porcelana limpos, colocados na mufla por 15 minutos à temperatura de 550°C. Em seguida são resfriados em dessecador e pesados. Dentro dos cadinhos será colocada uma quantidade de aproximadamente um (1) grama. Os cadinhos com as amostras são colocados na mufla, que é ligada em seguida. A elevação da temperatura deve ser lenta inicialmente, para evitar que a queima da amostra seja violenta, provocando perdas indesejáveis.

Por ocasião da colocação dos cadinhos na mufla, recomenda-se pingar umas gotas de ácido nítrico por cima das amostras, facilitando a oxidação do carbono e sua conseqüente volatilização. O resultado final da análise não é alterado porque o ácido nítrico também é volatilizado. Uma vez queimadas as amostras são retiradas da mufla, esfriadas em dessecador e pesadas.

Calculo:

A - peso do cadinho + cinzas

B - peso do cadinho

C - peso da amostra parcialmente seca (ASA)

$$\% \text{ CINZAS} = \left(\frac{A-B}{C} \right) * 100$$

Quadro 2. Determinação da Análise de Matéria Mineral.

Amostra	Cad.nº	Peso Cad. (g)	Cad. + ASA (g)	ASA (g)	Cad.+ Cinza (g)	Peso da Cinza (g)	Cinza ASA %	ASE %	Cinza MS %	Cinza MN %
1	20	27,7951	30,0115	2,2164	27,9604	0,1653	7,4580	87,8888	8,4858	3,2613
2	D1	24,5375	26,5579	2,0204	24,6751	0,1376	6,8105	87,8888	7,7490	2,9781
Média							7,1343		8,1174	3,1197

3.5. Proteína bruta (PB) ou nitrogênio total

O termo Proteína Bruta (PB) envolve um grande grupo de substâncias com estruturas semelhantes, porém com funções fisiológicas diferentes. Baseado no fato das proteínas terem porcentagem de nitrogênio quase constante (em torno de 16%), o que se faz é determinar o nitrogênio e por meio de um fator de conversão – a porcentagem de proteína bruta é obtida pela multiplicação desta porcentagem de nitrogênio no alimento pelo fator de conversão 6,25 – transformando o resultado em Proteína Bruta.

O método de Kjeldahl (1883) é o mais utilizado, principalmente em forragens, e vem sendo usado nos laboratórios de nutrição animal por mais de 120 anos. Este método determina o nitrogênio contido na matéria orgânica, incluindo o nitrogênio protéico propriamente dito e outros compostos nitrogenados não protéicos, como: aminas, amidas, lecitinas, nitrilas e aminoácidos.

O método Kjeldahl se baseia numa digestão ácida, na qual o nitrogênio da amostra é transformado em amônio (NH_4^+), sendo posteriormente separado por destilação e finalmente dosado pela titulação.

O método está baseado em três etapas:

1) Digestão - Nitrogênio orgânico foi transformado em amônia que reage com o H_2SO_4 , formando sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e os compostos orgânicos são convertidos em CO_2 , H_2O etc.

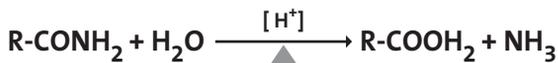
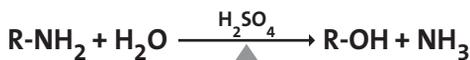
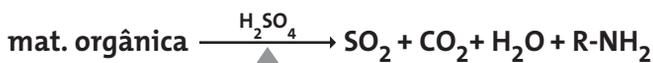
2) Destilação - A amônia é separada e recolhida em uma solução receptora (H_3BO_3 + indicador).

3) Titulação - Determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora.

Na determinação do nitrogênio são pesadas duas amostras de ASA de aproximadamente 200 mg cada e introduzidas em tubos abertos, onde recebem aproximadamente 2 gramas de mistura digestora ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Se}$) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura digestora serve para aumentar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico, acelerando a digestão ácida.

Durante a digestão ácida a temperatura deve ser elevada gradativamente até atingir 350°C . No final da digestão, o material fica completamente claro indicando a produção de sulfato de amônia. Próximo à fase final da digestão, deve-se agitar o balão de modo a uniformizar o material em digestão, para obter total combustão (não deixar que o material parcialmente oxidado se fixe nas paredes do balão). Em seguida, esfria-se o balão naturalmente colocando um pouco de água destilada.

⇒ Durante a fase de digestão são observadas as seguintes reações:



Salienta-se que o **índice ácido** regula a perda do nitrogênio, e para isso uma quantidade específica de ácido deve estar presente durante a digestão, a fim de evitar perda de nitrogênio.

Efetuada a digestão ácida, o tubo é levado para que o material resultante sofra destilação. Assim que esfriar transfira imediatamente o tubo para o conjunto de destilação, balão ou tubo digestor, e num erlenmeyer de 125 mL adicionar 20-50 mL de ácido bórico a 4% + indicador misto (ou volume estimado de ácido sulfúrico 0,2 N de acordo com a porcentagem de proteína estimada e duas gotas de solução de vermelho metila 0,1%). Adapte o erlenmeyer ao conjunto destilador para receber amônia. A ponta do condensador deve ser introduzida na solução, a fim de evitar perda de amônia. Destile por arraste, mantendo a ponta do condensador na solução ate que toda a amônia seja liberada, o volume destilado é aproximadamente 75 mL. Retire o elernmeyer lave a ponta do condensador com água destilada, assim como as paredes superiores do elernmeyer.

Durante esta etapa o $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ formado na digestão sofre adição de NaOH, formando $\text{NH}_4\text{OH} + \text{Na}_2\text{SO}_4$ em presença de aquecimento, sendo então o produto destilado para o erlenmeyer contendo um composto de cor verde (ácido bórico) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$.



Obtém-se, então, cerca de 75 ml deste composto, titula-se o mesmo com HCl de normalidade conhecida (0,005N ou 0,1N) com fator conhecido até viragem do indicador.

Para se evitar perdas de NH_4 , a saída do condensador deve ficar imersa no ácido bórico.



Durante a titulação com HCl o indicador adquire uma cor de verde para rosa, se a titulação for realizada com solução de hidróxido de sódio 0,2 N a viragem do indicador, será de vermelho para amarelo.

É aconselhável fazer um teste em branco com o objetivo de eliminar qualquer interferência do papel e/ou de reagente. A quantidade de HCl gasta na titulação da amostra em branco é subtraída da quantidade gasta na titulação da amostra.

Obs: Todos os reagentes para esta marcha são obrigatoriamente (P. A.).

O cálculo da % de Nitrogênio é obtido através da fórmula:

$$\% \text{ de N} = \frac{V \times N \times f \times 14 \times 100}{\text{peso da amostra (mg)}}$$

% de N x 6,25 = % de proteína bruta,

Quadro 3 - Determinação de nitrogênio e da Proteína bruta.

Amostra	ASA (g)	HCl(ml) Br Vr Vt	Cte	N(%)	PB ASA (%)	ASE (%)	PB MS (%)	PB MN (%)
1	0,2847	0,2 0,40 9,60	27,45	0,8732	5,4574	87,8888	6,2095	2,3864
2	0,2966	0,2 0,40 9,60	27,45	0,3782	5,4574	87,8888	6,2095	2,3864
Média					5,4574		6,2095	2,3864

Vt : volume total

Br: Branco

Vr: Volume real = Vt - Br

Cte: (N*F*14*100) = 27,45

N = 0,02

F = 0,9804

Nitrogênio: Média = 0,8732 %

O cálculo da porcentagem de Proteína é feito multiplicando-se o percentual de nitrogênio pelo fator 6,25, que se originou da constância nos teores de proteína na maioria dos produtos, que está em torno de 16%.

3.6. Fibra bruta (FB)

Representa o resíduo de substância da parede celular. Na fibra bruta encontram-se como constituintes frações de celulose e de lignina insolúvel em álcali, que é estimada através do método de Wendee. A FB é a parte dos carboidratos resistentes ao tratamento sucessivo com ácido e base diluídos, e representa a grande parte da fração fibrosa dos alimentos.

Constitui-se como uma amostra livre de umidade e após a extração por éter, é digerida inicialmente com uma solução

de ácido fraco e posteriormente com uma solução ácida fraca. O resíduo orgânico é coletado num cadinho filtrante, e a perda de peso após a filtração é denominada Fibra Bruta.

Procedimento para determinação da fibra bruta:

Pese 2-3 gramas da amostra seca ao ar, desengordurada ou não, dependendo do seu teor de gordura (>1%).

Digestão ácida

Coloque a amostra em um béquer de 600 ml, próprio para ser ajustado ao digestor, adicione 200 ml da solução de ácido sulfúrico a 1,25%, fervente. Coloque no aparelho digestor, pode-se adicionar também algumas gotas de anti espumante. Deixe ferver por trinta minutos, após o início da ebulição. Filtre em funil de Buchner com tela de náilon, fazendo lavagens sucessivas com água destilada quente ou fervente até a neutralização do material, que é verificado com papel de tornassol azul.

Digestão básica

O resíduo retido na tela é quantitativamente transferido para o béquer de 600 ml, utilizando-se para transferência 200 ml da solução de NaOH a 1,25%, fervente, e algumas gotas de anti espumante. Coloque o béquer no digestor. Proceda a digestão básica por trinta minutos após o início da ebulição.

Transfira o resíduo (fibras + minerais), com o auxílio de água quente para o cadinho filtrante (previamente seco em estufa de 105° C por duas horas) e lave até a neutralização do material – use o papel de tornassol azul. Após a filtração lave o material com álcool (20 ml) e posteriormente com éter (acetona) (20 ml) a fim de facilitar a secagem.

Faça a secagem dos cadinhos durante uma noite em estufa a 105°C (4-6 horas) e leve-os ao dessecador para esfriar e equilibrar com a temperatura ambiente. Pese e registre os pesos.

Coloque os cadinhos filtrantes com resíduos na mufla a 500°C, durante duas horas, desligue a mufla e espere a temperatura baixar a 250°C. Coloque no dessecador e espere até que a temperatura se equilibre com o meio exterior. Pese e registre o peso – a diferença de peso antes e após a queima nos fornece o peso da fibra bruta das amostras.

A pesagem nos fornece o peso do cadinho, da fibra bruta e dos minerais.

Cálculo:

P2 - peso final do cadinho mais fibra

P1 - peso do cadinho

A - quantidade de amostra

$$\% \text{ de Fibra Bruta} = \frac{p2-p1}{A} \times 100$$

3.7. O MÉTODO DE VAN SOEST NA DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE DE FORRAGEIRAS

O método de VAN SOEST se baseia na separação das diversas frações constituintes da forrageira, por meio de reagentes específicos, denominados detergentes. Este método apresenta vantagens em relação a outros em virtude de sua maior precisão, além de fornecer informações sobre importantes componentes – FDN, FDA, celulose, lignina, cinza, sílica, etc.

Por meio do Detergente Neutro, é possível separar o conteúdo celular (parte das forragens solúveis no detergente neutro) constituí-

do de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis em água, da parede celular, também chamada Fibra em Detergente Neutro (FDN), que é constituída basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada.

A fim de solubilizar o conteúdo celular e a hemicelulose, além da maior parte da proteína insolúvel, VAN SOEST propôs um detergente ácido específico. Após a digestão por este detergente, o produto resultante será quase que na sua maioria lignina e celulose (lignocelulose), sendo este produto conhecido como Fibra em Detergente Ácido (FDA).

Conhecendo-se a porcentagem dos constituintes da parede celular (FDN) e da FDA do material analisado, é possível calcular a fração de hemicelulose, apenas pela diferença entre aquelas frações.

3.8. Determinação de fibra em detergente neutro

O método Weende não parece satisfatório para se obter informações sobre os carboidratos, pois inclui no grupo da fibra bruta a celulose e somente a lignina insolúvel em álcali. Parte da lignina passa a fazer parte do extrato não nitrogenado, calculado por diferença, além de subestimar a fibra bruta. Por outro lado, no grupo dos extratos não nitrogenados encontram-se frações de naturezas diversas como: amido, hemicelulose, pectina, lignina solúvel em álcali e os carboidratos solúveis em água (amilose, frutanas).

Esta divisão pode ser insatisfatória sob o ponto de vista nutricional, visto que a hemicelulose, pectina e lignina solúvel em álcali não apresentam as mesmas características nutricionais dos outros componentes sob o termo de extratos não nitrogenados.

O detergente neutro separa o conteúdo celular composto pelas proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros componen-

tes solúveis em água presentes na parede celular (parte da forragem insolúvel em detergente neutro), também chamado de Fibra em Detergente Neutro (FDN).

Uma solução em detergente neutra é usada para dissolver substâncias (pectinas) facilmente digeridas e o conteúdo celular das plantas (proteínas, açúcares e lipídios), deixando um resíduo fibroso (FDN).

O detergente é usado para solubilizar as proteínas e o sulfito de sódio e ajuda também a remover alguns compostos nitrogenados.

3.8.1. Procedimento para amostras com baixo teor de amido

Pese cerca de 0,5 / 1,0 g de amostra seca ao ar, previamente trituradas em moinhos com peneiras de 1 mm, coloque em béquer de 600 ml, adicione 100 ml do detergente neutro (temperatura ambiente). Aqueça até ferver (cerca de 5 minutos), reduzindo a temperatura para evitar a formação de espuma, deixe em digestão durante 60 minutos, logo em seguida faça a filtragem em cadinho filtrante, previamente pesado, por sucção a vácuo. Lave com água quente o material dentro do cadinho filtrante e repita essa operação, certificando que todo material passou para o cadinho. Lave igualmente o cadinho, tomando cuidado de quebrar a crosta formada com ajuda de um bastão de vidro, facilitando a lavagem e removendo todo complexo gelatinoso formado.

Lave uma vez com 30 ml de acetona, leve os cadinhos para a estufa de 105°C e deixe secar por uma noite ou por 8 horas à temperatura de 105°C. Esfrie em dessecador e proceda a pesagem.

Considere fibra em detergente neutro a percentagem dos constituintes da parede celular, calculada pela diferença entre as pesagens.

3.8.2. Procedimento para alimentos com alto teor de amido

O procedimento para a análise é o mesmo para amostras com baixo teor de amido, o que muda é que as amostras passam por um pré-

tratamento e por pequenas alterações no procedimento: as amostras são tratadas inicialmente com 30 ml de solução de uréia 8M e 50 μ de amilase, estável ao calor. Devem ser bem misturadas e aquecidas em banho-maria a 90°C por cinco minutos, e levadas ao dessecador por quatro horas. A mistura deve ser diluída com 100 ml em detergente neutro, e na seqüência seguir o procedimento norma para estimar FDA.

3.9. Determinação da fibra em detergente ácido

A FDA é a porção menos digestível da parede celular das forrageiras pelos microorganismos do rúmem. Constitui-se na sua quase totalidade por lignina e celulose.

Para a determinação da fibra em detergente ácido pode-se utilizar o método sequencial aproveitando os resíduos da determinação de fibra em detergente neutro, por ser mais rápido e permitir que se determine mais de uma fração com uma mesma amostra.

Adicione 100 ml de solução de detergente ácido, levando os copos ao aparelho, deixando-os aquecer por cinco minutos a uma temperatura branda para evitar a formação de espuma. Após iniciada a fervura, é marcado o tempo de 60 min. para digestão. Após este período, faça filtragem imediatamente em cadinho filtrante de vidro, previamente pesado, por sucção a vácuo. Lave com água quente o material dentro do copo certificando que todo material passou para o cadinho e também lave dentro do cadinho. Lave igualmente com acetona, levando, após este procedimento, os cadinhos para estufa a 105°C por 8 horas, deixando esfriar em dessecador, e depois pese os cadinhos.

A diferença entre FDN e FDA fornece a Hemicelulose.

3.10. Determinação de lignina

Na nutrição animal, a lignina exerce um influência negativa sobre a digestibilidade de outros nutrientes, já que atua como barreira física na digestão dos nutrientes concentrados no interior da célula. A lignina é pouco digerível, e seu conteúdo varia de quatro a 12%, podendo chegar até a 20% da MS das plantas mais fibrosas ou com avançada maturidade. Durante o processo da pré-secagem, a ação do calor pode elevar o teor aparente da lignina. Por isso é importante que a temperatura de pré-secagem não seja superior a 55°C.

Para se determinar a lignina parte-se da fibra em detergente ácido, existindo dois métodos: o do ácido sulfúrico 72% e o do permanganato de potássio.

O método do permanganato possui vantagens sobre o ácido sulfúrico: mais rapidez, é menos corrosivo, menos afetado pelos danos da temperatura ambiente durante a secagem inicial da amostra. Entre as desvantagens cita-se: o tamanho da partícula da amostra deve ser inferior a 1 mm a fim de que haja melhor contato com os reagentes.

Procedimento:

Determinada a fibra em detergente ácido, coloque os cadinhos contendo a fibra em uma bandeja de vidro, contendo água. Adicione 30 ml de solução de permanganato 2:1 em cada cadinho, colocando, em cada, um bastão de vidro, para agitar o conteúdo e permitir que a solução de 2:1 entre em contato com todas as partículas por mais ou menos 15 minutos. Faça filtração por sucção a vácuo. Renove a água da bandeja e coloque a solução 2:1 nos cadinhos, permanecendo então por 1:30 horas. A cor púrpura deve estar presente por todo o processo da oxidação.

Os cadinhos são então novamente succionados a vácuo e colocados em bandeja limpa com água, adicionando-se 30 ml de solução desmineralizadora. Depois de 10 min., succione e renove a solução desmineralizadora, a fim de que a fibra fique de cor clara. Lave os cadinhos com etanol e acetona e deixe-os secar em estufa a 105°C. Calcule o teor de lignina pela diferença de peso.

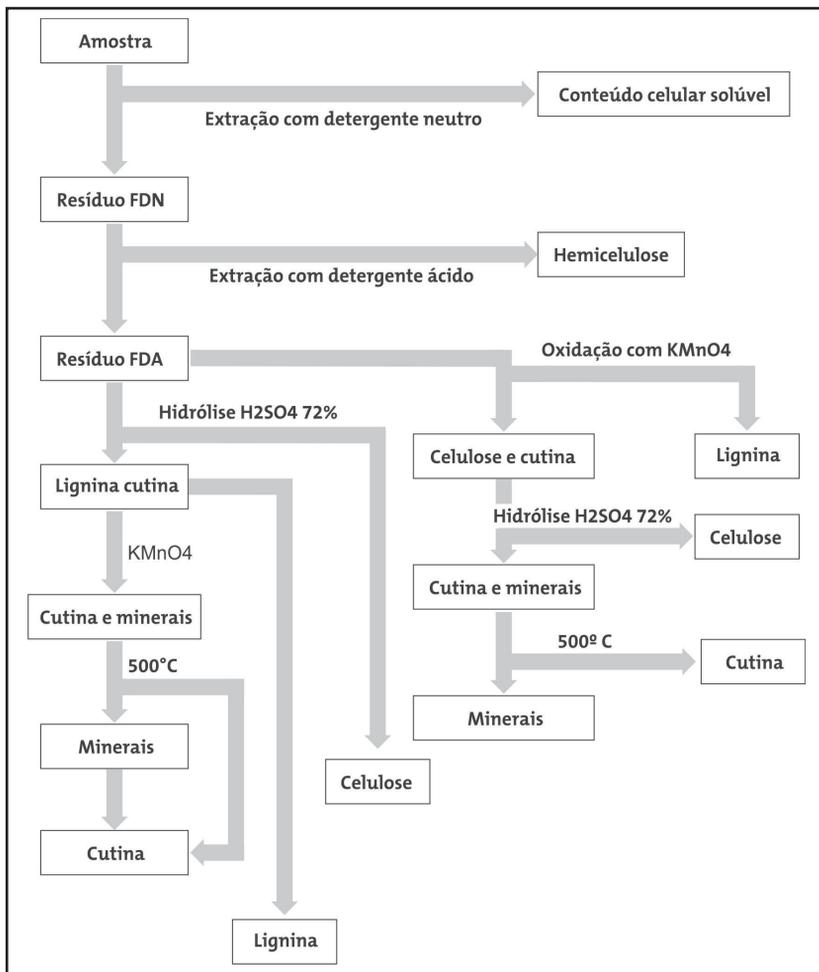


Figura 2: Diagrama do método sequencial na determinação dos componentes da parede celular.

Quadro 4- Determinação dos Constituintes da Parede Celular (C.P.C.)

Amostra	ASA (g)	ASE %	MS (g)	Nº Cad.	Peso Cad. (g)	Cad. + resíduo (g)	Resíduo (g)	CPC MS (%)	MN %
1	0,549	87,8888	0,4825	874	29,913	30,257	0,344	71,2953	27,3999
2	0,515	87,8888	0,4526	834	29,942	30,265	0,323	71,3654	27,4269
Média							0,334	71,3304	27,4134

Conteúdo celular = 100 - FDN = 28.6696.

Quadro 5- Determinação de FDA, Lignina e Celulose

Amostra	ASA (g)	ASE (%)	MS (g)	Peso Cad. (g)	Cad. +FDA (g)	FDA (g)	Cad. + Cel. + Cinza (g)	Lignina (g)	FDA MS (%)	Lignina (%)	Celulose (g)	Celulose (%)
1*	0,549	87,888	0,4825	29,913	30,078	0,165	30,046	0,032	34,1969	6,6321	-	-
2**	0,515	87,888	0,4526	29,942	30,092	0,150	30,033	-	33,1418	-	0,059	13,0358
Média									33,6694	6,6321		13,0358

Hemicelulose = FDN-FDA = 71,3304 – 33,6694 = 37,661

*** método do permanganato**

**** método do ácido sulfúrico 72%**

3.11. Gordura ou extrato etéreo

As gorduras ou lipídios são substâncias insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos chamados extratores, como éter, clorofórmio, benzeno, etc. A gordura constitui a fração mais energética dos alimentos e é composta de carbono, hidrogênio e oxigênio. Além das gorduras existem muitos outros compostos intimamente ligados ou associados, tais como: fosfatídeos, esteróis (colesterol), clorofila, óleos voláteis, resina, etc., que são arrastados na presença destes solventes orgânicos.

Gorduras, óleos, pigmentos e outras substâncias gordurosas solúveis contidas em uma amostra seca são dissolvidos através da extração com éter, que é então evaporado desta solução gordurosa. O resíduo resultante é pesado, sendo chamado de extrato etéreo ou gordura bruta. O éter e as amostras devem ser livres de umidade, para evitar a co-extração de componentes solúveis em águas presentes na amostra, como carboidrato, uréia, ácido láctico, glicerol e etc.

A riqueza em gordura pode influenciar o armazenamento de alguns produtos, uma vez que as gorduras dos alimentos constituem uma fração bastante instável, pois os alimentos ricos em tal substância rancificam facilmente. Os alimentos rancificados perdem grande quantidade de certos nutrientes essenciais, como as pró-vitaminas A e D, caroteno, complexo B, Tc..., e alguns ácidos graxos podem sofrer oxidação oxidativa.

O valor alimentar do extrato etéreo não é constante. Considera-se que um grama de gordura produz 9,35 Kcal de energia bruta, quando medida na bomba calorimétrica, o que corresponde aproximadamente a 9 Kcal de energia metabolizável. Os alimentos com maior teor de gordura têm valores mais altos de NDT, pelo fato de a gordura fornecer 2,25 vezes mais energia que os carboidratos.

Os reagentes usados devem ser puros para análise (P.A.), para evitarmos que haja qualquer tipo de contaminação do material a ser analisado.

Para se fazer a determinação de gordura existem dois métodos, que se diferenciam quanto ao solvente utilizado: **método à frio** (usando éter sulfúrico, cujo ponto de ebulição é de 35° C e extrator “**Soxhlet**”), e **à quente** (usando éter de petróleo, cujo ponto de ebulição é de 60° C). O método a frio leva em torno de 12-24 horas de extração enquanto o método a quente dura em torno de 04-06 horas.

O **método à quente** é mais rápido que o método à frio, e é assim chamado pois a extração é feita com temperatura mais elevada, cujo ponto de ebulição esteja entre 40-65° C.

Procedimento (Extração e Destilação)

Tome amostras de aproximadamente 2 gramas cada de ASA, em papel de filtro e faça cartuchos. Pese os papéis usados antes de pesar a amostra e anote os dados em formulário próprio. Coloque cada amostra em recipiente próprio do aparelho de extração “**Godifish**” ou “**Soxhlet**”.

Em um becker previamente limpo e de peso conhecido, em balança analítica, adicione 40 ml de éter de petróleo (P. A.) e coloque sob o condensador fixando-o ao anel de rosca. Ligue a água do condensador e tome as devidas precauções para evitar o vazamento de éter durante sua fervura e condensação.

O aparelho permanece ligado de 4 - 6 horas, com verificações ocasionais. Após completada a extração, remove a amostra do recipiente e coloque o tubo coletor de éter sob o condensador. O becker é repostado e o éter destilado. Antes que o éter do becker seque, retire do aquecimento e derrame o éter do tubo coletor em frasco apropriado. Complete a secagem do becker em estufa a 105°C por 30 minutos. Após este tempo, retire o becker e o coloque em dessecador para esfriar e posteriormente ser pesado. O peso da gordura extraída é calculado pela diferença do becker vindo do dessecador menos o becker vazio.

Quadro 6 – Determinação da Gordura ou Extrato Etéreo

Amostra	Tara (g)	Tara + ASA (g)	ASA (g)	ASE%	MS (g)	Copo N ^o	Peso Copo (g)	Copo + Gordura (g)	Gordura (g)	EE MS %	EE MN %
03	0,8171	1,9314	2,4048	87,8888	2,1135	03	144,0415	144,0647	0,0232	1,0977	0,4219

4. Avaliação da digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca

Na análise de forragens a digestibilidade pode ser definida como sendo a quantidade de nutrientes consumidos que não aparece nas fezes. A técnica tenta reproduzir em laboratório o que acontece no animal, e consiste em deixar a amostra da forragem em contato com o líquido ruminal (inóculo) em tubo de ensaio ou potes, para tentar reproduzir as condições que predominam no rúmen-retículo, com presença de microorganismos, condição de anaerobiose, temperatura de 39 °C, capacidade tampão, pH 6,9. Procura repetir o que acontece “*in vivo*”, após 24 a 48 horas de digestão microbiana.

Recomenda-se que a dieta do animal doador seja a mesma da amostra que se quer analisar, disponibilidade de animais para coleta e diversidade dos tipos de amostras.

Para se ter confiança nos resultados obtidos, costuma-se fazer análises com uma amostra índice, às quais se conhece os seus valores. Caso haja algum resultado discrepante para a amostra índice, é sinal de que algum problema ocorreu invalidando os resultados obtidos com as amostras analisadas.

Para a avaliação da digestibilidade “*in vivo*”, tem-se a técnica de uma ou duas etapas, dependendo da riqueza em proteína do material a ser utilizado (TILLEY e TERRY, 1963).

1ª Etapa: para a avaliação da digestibilidade pese duas amostras com peso em torno de 1 g de ASA, que foram colocadas em tubos próprios ou potes para ensaio de digestibilidade, adicionando-se aos tubos 40 ml de saliva artificial (solução tampão de Mc Dougall), e 10 ml de inóculo de rúmen. Passe CO₂ sobre a superfície do conteúdo dos tubos – para eliminar o O₂ presente – e imediatamente feche com rolhas de borracha equipada com válvula de Bunse. Incube os tubos por 48 h a 39 °C, em estufa de temperatura controlada sofrendo agitações suaves (3 a 4 vezes ao dia).

2ª Etapa: Após essas 48 h de digestão microbiana, retire os tubos da estufa adicionando aos mesmos 6 ml de ácido clorídrico 20 % v/v, colocados (2 + 2 + 2 ml) para evitar a formação de bolhas de ar, e adicione também 2 ml de solução de pepsina a 5 % p/v. Coloque os tubos (destampados) de volta à estufa para nova incubação durante 48 h a 39 °C, fazendo agitações ocasionais (3 a 4 vezes ao dia) como na 1ª etapa. A pepsina promove uma digestão na segunda etapa, desdobrando a proteína do substrato.

Finalmente, retire os tubos, fazendo a filtração do resíduo, quantitativamente, com a ajuda de água em piseta, para cadinhos filtrantes previamente pesados. Leve os cadinhos à estufa a 105 °C, por uma noite, esfriando-os em dessecador e pesando-os.

È recomendado a inclusão de tubos controles “brancos” em cada procedimento de análise, afim de se conhecer a matéria seca residual do líquido de rúmen utilizado.

A seguir, é apresentada a fórmula de como se calcula a digestibilidade “in vitro” da matéria seca.

Cálculo:

$$\text{DIVMS} = \frac{100 \times \text{g/MS amostra} - (\text{g/MS residual} - \text{g/MS "branco"})}{\text{g/MS amostra}}$$

Os resultados estão no quadro 8.

4.1. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (divms) usando o instrumento “daisy” (*in vitro true digestibility- ivtd*)

4.1.1. Reagentes

solução Tampão A:	g/litro	para 2 jarros (2660 ml)
-------------------	---------	----------------------------

1. KH_2PO_4	10,0	26,600 g
2. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	1,330 g
3. NaCl	0,5	1,330 g
4. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,266 g
5. Uréia (grau de reativo)	0,5	1,330 g

Solução Tampão B:	g/litro	para 2 jarros (532 ml)
-------------------	---------	---------------------------

6. Na_2CO_3	15,0	7,980 g
7. $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1,0	0,532 g

4.1.2. Procedimentos

4.1.2.1. *Preparação das bolsas de filtro e amostras:*

Um dia antes da incubação, pré-enxágüe as bolsas de filtro F 57 ou TNT (ver amostra) com acetona dentro de um recipiente de vidro durante três a cinco minutos, depois escoe a acetona e leve para secar por completo durante dois minutos em estufa com ar seco (55 °C). Retire e faça a marcação das bolsas com caneta permanente (não usar a de retroprojeter) ou lápis preto e coloque na estufa de 105°C até o outro dia (uma noite). O enxágüe em acetona remove um *surfactant* que pode inibir a digestão microbiana.

No dia seguinte coloque as bolsas no dessecador (dentro do recipiente) por 40 minutos. Pese cada bolsa de filtro e registre o peso (W_1), uma a uma, sem tocá-las antes da pesagem. Tare a balança e pese 0,25 g de amostra (W_2), de preferência diretamente na bolsa de filtro.

Sele as bolsas e armazene-as adequadamente para que posteriormente (quando as soluções tampões já estiverem preparadas) sejam colocadas no jarro do Fermentador Artificial de Rúmen (DAISY). São feitas até 25 bolsas por jarro (24 amostras + 1 branco), colocadas equitativamente nos quatro jarros de digestão bem como dentro do jarro ocupar os dois lados. Inclua uma bolsa lacrada vazia (branco) em cada jarro que levará ao fator de correção (W_4). As amostras são feitas em duplicata sempre.

Quando a DAISY está começando a ser utilizada (início de operação) é aconselhável utilizar, além do branco, duas bolsas lacradas com um testemunha (padrão conhecido, valores de digestibilidade tabelados), que dependendo do material a ser analisado pode ser: feno de alfafa moído a 1 mm para volumosos, milho moído a 1 mm para concentrados energéticos e farelo de soja moído a 1 mm para concentrados protéicos). Isto é feito somente para fins de comparação (valor conhecido com valor encontrado).

4.1.2.2. Preparação das Soluções Tampões (para cada 2 jarros da DAISY):

No dia da incubação (DAISY), prepare as soluções tampões A e B, separadamente. O ideal é que enquanto uma pessoa prepara as soluções, outra coleta e prepara o inócuo (líquido ruminal). Enquanto é feito o preparo das soluções, deve-se manter o copo do liquidificador, as provetas graduadas para o inócuo e o funil tudo em banho-maria a 39°C.

Anote os pesos de cada reagente em copos plásticos separados (numere de um a sete os copinhos, um número por reagente, siga a

ordem da marcha). Utilize dois recipientes grandes (solução total com 3,2 litros) para preparar as soluções A e B separadas. Anote em cada recipiente a solução que ali será feita. Adicione os reagentes lavando os copinhos com água destilada morna (39°C), complete com água destilada morna até 2660 ml para a solução A e 532 ml para a B, depois misture bem com o bastão de vidro.

Misture bem as soluções A e B (relação 1:5) e leve ao pHmetro para aferir o pH da mistura, que deverá ser 6,8 a 39°C.

Adicione a solução resultante (A+B) nos jarros (distribua uniformemente entre os dois jarros, com 1600 ml para cada jarro da solução A+B) e também nos outros dois jarros (outro preparo de soluções). Coloque as bolsas com as amostras dentro dos jarros com a solução A+B. Se a DAISY não for utilizada totalmente (100 bolsas, ou menos de 4 jarros), acrescente no(s) jarro(s) sem amostras o mesmo **peso** em água, para que a máquina trabalhe a rotação adequadamente.

Ative os botões de aquecimento e rotação, permitindo que a temperatura nos jarros da DAISY atinja o equilíbrio pelo menos 20 minutos antes da incubação (inócuo + CO₂). Este tempo pode ser usado para o preparo do inócuo.

4.1.2.3. Coleta e Preparação do Líquido Ruminal e Incubação

Observações:

MANUTENÇÃO TEMPERATURA 39°C

(MATERIAIS E INÓCUO)

INFUSÃO CONSTANTE DE CO₂, NÃO BORBULHAR

O LÍQUIDO

DUAS PESSOAS (UM SE PREOCUPA SÓ COM CO₂)

Antes da coleta, aqueça tudo com água a 39° C (garrafa térmica com água a esta temperatura e recipiente de coleta aquecido). Prepare a bomba de vácuo (tomada, mangueira do vácuo e mangueira coletora)

e depois abra a fístula, introduzindo a mangueira coletora diretamente na fase líquida do material ruminal. Ligue a bomba até “sugar” cerca de 2/3 da capacidade do recipiente coletor para que não entre líquido no interior da bomba (perigo).

Retire a água a 39°C da garrafa térmica rapidamente e adicione o líquido coletado, juntamente com infusão constante de CO₂ antes, durante e depois dessa adição na garrafa, fechando-a gradativamente com a adição de + CO₂. Repita as operações acima com cuidado até completar o conteúdo da(s) garrafa (s) térmica(s) – será necessário cerca de dois litros de líquido ruminal para cada utilização completa da DAISY (quatro jarros x 400 ml = 1600 ml).

Leve o material coletado na garrafa térmica rapidamente ao laboratório onde já deve estar preparada e aquecida a solução tampão A+B com as amostras nos jarros.

Os materiais utilizados (liquidificador, funil, provetas) para preparar e medir o inócuo devem estar no banho-maria a 39°C. Esvazie então os conteúdos inteiros da(s) garrafa(s) térmica(s) no liquidificador aquecido e com um pouco de CO₂, acrescente rapidamente o CO₂ e misture a uma velocidade alta durante 30 segundos. Espere um segundo para esvaziar o liquidificador no funil (para diminuir espuma formada).

A ação de mistura serve para desalojar os micróbios que se prenderam nas fibras da massa do rúmen e asseguram uma população microbiana adequada para a análise *in vitro*. Durante este tempo retire a proveta e o funil do banho-maria e arrume com o tecido para a filtragem (tecido da amostra dobrado ao meio, não reutilizar, somente um uso). Filtre a quantidade inteira no tecido e aperte com as mãos; se sobrar líquido no liquidificador, infundir CO₂ com ele quase fechado até terminar de filtrar e também na proveta onde está o inócuo.

Meça 400 ml deste líquido filtrado (inócuo) em cilindro graduado (proveta) aquecido e com CO₂ e remova um jarro por vez da DAISY

ainda ligada (rotação e aquecimento), acrescentando este líquido e infundindo CO₂ continuamente durante a colocação até fechar a tampa de forma segura (cerca de trinta segundos com CO₂). Coloque de volta na máquina e repita o procedimento até o último jarro, feche definitivamente a DAISY, abrindo-a ocasionalmente somente para checar rapidamente a rotação.

Incube durante 48 horas para determinar a DIVMS; a DAISY manterá uma temperatura de cerca 39,5°C. Marque o horário exato da incubação para que as próximas etapas (adição da pepsina + HCl, retirada das amostras incubadas e pesagem final das bolsas), sejam feitas neste mesmo horário nos outros dias.

4.2. Segundo Estágio (Pepsina + HCl 6N)

Verifique se há disponibilidade do HCl 6N preparado. Cerca de 40 minutos a 1 hora antes do horário marcado da incubação comece a preparar toda a solução de pepsina em meio ácido a ser usada para os quatro jarros.

Use quatro béqueres de 250 ml, um para cada jarro. Pese quatro vezes 8 gramas de pepsina e dissolva em 35 ml de água destilada misturando bem. Aqueça moderadamente na chapa até ficar morno (dissolução melhora, mas não deixe muito quente a temperatura para não desnaturar a enzima).

De preferência use o agitador magnético após deixar morno. Leve próximo ao pHmetro regulado cada béquer um a um e deixe os outros na chapa (cuidado com temperatura). Pegue uma pipeta pequena plástica para gotejar o HCl 6N. Ajuste o pH até 2,9 a 3,1, e se necessário acrescente gotas do ácido com a pipeta, gota a gota, mensurando o pH até atingir o adequado citado acima. Se o pH passar um pouco, goteje soda cáustica moderadamente.

Volte para a chapa e pegue o outro béquer, repetindo a operação acima até fazer todas as quatro soluções. Espere o horário (o mesmo da incubação) mantendo os béqueres na chapa morna e leve até a DAISY todos eles, acrescentando a solução nos jarros, um a um, e mantendo o funcionamento da DAISY – antes de retornar o jarro à máquina agite-o um pouco. Deixe por mais 24 horas na máquina.

No mesmo horário do outro dia, pegue um recipiente para acomodar as bolsas e remova todos os jarros da DAISY, desligando-a. Descarte o líquido e apóie as bolsas, retirando-as dos jarros, e lave-as até a água ficar clara no recipiente. Remova o excesso de água das bolsas e adicione acetona até cobri-las. Deixe por três a cinco minutos na acetona com um pesinho em cima.

Descarte a acetona e retire o excesso das bolsas. Leve o recipiente com as bolsas para a estufa a 55°C por uns dois minutos e depois coloque na estufa a 105°C por uma noite. No outro dia, no mesmo horário da incubação coloque o recipiente com as amostras no dessecador por 40 minutos (usar luva) e depois desse tempo retire sem tocar nas bolsas (usar a pinça) e pese uma a uma, registrando os pesos finais (W_3). Descarte ou prepare as bolsas para serem reutilizadas (mais duas vezes apenas, porém não aconselhável).

4.3. Cálculos

$$\% \text{ DIVMN} = 100 - [(W_3 - (W_1 \times F)) \times 100 / W_2]$$

Onde:

W_1 → peso da tara da bolsa (vazia)

W_2 → peso das amostras (mais ou menos 0,25 g)

W_3 → peso da bolsa final após 48 horas fermentando e 24 horas de digestão com meio ácido e pepsina

F → correção da bolsa em branco (peso final da bolsa em branco após o processo todo/ W_4) W_4 → peso da bolsa em branco antes da incubação (vazio)

Faça a relação para encontrar o valor em base de MS.

$$\% \text{DIVMS} = 100 - ((W_3 - (W_1 \times F)) \times 100 / (W_2 \times MS))$$

4.4. Procedimentos de coleta, preparo e incubação do inócuo



Figura 8 : Procedimentos de coleta, preparo e incubação do inócuo

Quadro 7 - Digestibilidade “In Vitro” da Matéria Seca

Amostra	N.º tubo	Tubo	ASA (g)	ASE (%)	MS (g)	Tubo + resíduo	Resíduo	Res. - Branco	MS Digerida	MS (%)
Brac. r.	3	32,0335	1,0536	87,8888	0,9260	32,4741	0,4406	0,3992	0,5268	56,89
Brac. r.	4	31,5414	1,0792	87,8888	0,9485	32,0012	0,4598	0,4184	0,5301	55,89
Média									0,5285	56,39
Branco										
1	B-1	33.8280				33.8822	0.0542			
2	B-2	47.7156				47.7505	0.0349			
3	B-3	26.6993				26.7344	0.0351			
F. índice										
1	I-1	36,3802	1,0449	94,84	0,9910	36,8227	0,4425	0,4011	0,5899	59,53
2	I-2	47,2920	1,0328	94,84	0,9795	47,7399	0,4479	0,4065	0,5730	58,50
3	I-3	27,1539	1,1527	94,84	1,0932	27,6379	0,4840	0,4426	0,6506	59,51
Média										59,13

Média do Branco = 0,0414

Bibliografia

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Animal feed. In: **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington, D. C, 1995. v. 1. p. 1-30.

BERCHIELLI, T.T; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 583p.

CAMPOS, F.P; NUSSIO, C.M.B; NUSSIO, L.G; **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135p.

GOERING, H.K.; VAN SOEST., J. **Forage fiber analysis agricultural handbook**, n. 379, 1970.

HALL, M.B; HOOVER, J.P., WEBSTER, T.K.M. A method for partitioning neutral detergent soluble carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 2079-2086, 1999.

LIMA, L. C. de O.; CARVALHO, V. D. et al. **Aulas práticas de bromatologia**. Lavras: UFLA, 1995, 30p.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2002. 239p.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, Oxford, v.18, p.104-111, 1963.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D.R.; THIEX, N. **Forage analysis procedures**, 1993. Disponível em: <http://www.foragetesting.org/index.php?page=lab_procedures>. Acesso em: 15 set. 2009.

VAN SOEST, P.J.; MOORE, L.A. 1966. New chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. In: PROC. IX. INTER. GRASS, São Paulo, 1966, p.783-9

VAN SOEST, P.J.; WINE. R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **J. Assoc. Official Agr. Chem.**, v. 51, p. 780-85, 1968.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in de analysisie of fibrous feeds II: a rapid method for the determination of fiber and lignin. **J.Assoc. Official Agr. Chem**, v. 46, n. 5, p. 829-35, 1963.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applicatiónto forages. **Jornal Animal Science**, v. 26, n.1, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H; MOORE, L.A. 1966. Estimation one the true digestibility of forages by in vitro digestion of cell walls. In: PROC. X. INTER. GRASS, p. 438-441.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, and nonstarch polyssacarides in relations to animal nutrition. **Journal Dairy Science**, v.74, n.10, p. 3583-3597, 1991.

