

MARCÍLIA MEDRADO BARBOSA

VARIAÇÕES EM PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA  
AVALIAÇÃO DOS TEORES DE FIBRA INSOLÚVEL EM DETERGENTE  
NEUTRO E DE EXTRATO ETÉREO EM ALIMENTOS E FEZES DE  
RUMINANTES

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

B238v  
2013  
Barbosa, Marcília Medrado, 1988-  
Variações em procedimentos laboratoriais para avaliação  
dos teores de fibra insolúvel em detergente neutro e de extrato  
etéreo em alimentos e fezes de ruminantes / Marcília Medrado  
Barbosa. – Viçosa, MG, 2013.  
x, 56 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Edenio Detmann.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Alfa-amilase. 3. Fibras - Análise.  
4. Alimentos - Análise. 5. Gordura. 6. Fibras na nutrição animal.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

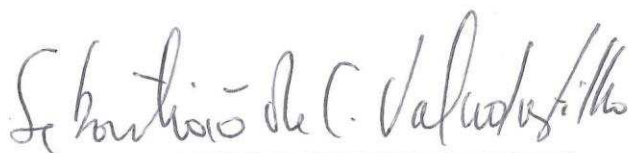
CDD 22 ed. 572.7

MARCÍLIA MEDRADO BARBOSA

VARIAÇÕES EM PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA  
AVALIAÇÃO DOS TEORES DE FIBRA INSOLÚVEL EM  
DETERGENTE NEUTRO E DE EXTRATO ETÉREO EM ALIMENTOS  
E FEZES DE RUMINANTES

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de dezembro de 2013.



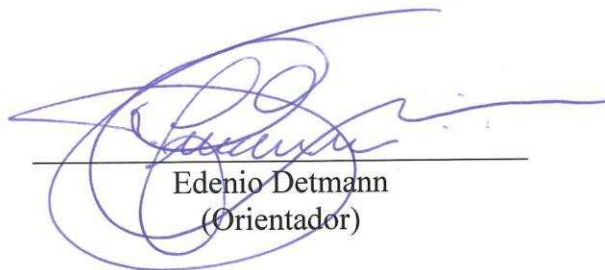
Sebastião de Campos Valadares Filho  
(Coorientador)



Cláudia Batista Sampaio



Mirton José Frota Monrez



Edenio Detmann  
(Orientador)

A Deus, Pai celestial, o louvor a honra e a glória para sempre.

Ao meu pai, Marcílio Pedro Barbosa, exemplo de força, honestidade e alegria.

À minha mãe, Darcy Medrado, pelo amor incondicional, trabalho e humanidade.

Aos meus queridos irmãos, em especial Angélica Cristina, por serem meu refúgio e exemplo de coração puro.

À Katrina Morgana, pela força.

A meu companheiro amado Paulo Roberto, homem trabalhador e de fé.

“Oh, pessoas ajudem as pessoas  
E se você tem saudades de casa,  
Me dê a mão e eu vou segurá-la.  
Nada vai te deixar para baixo...  
...Deus sabe o que está se escondendo,  
Naqueles fracos e embriagados corações  
Ninguém precisa ficar sozinho.”

*Birdy*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-Ciência Animal), CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para a realização do trabalho.

Ao Professor Edenio Detmann, pela orientação e ensinamentos, os quais muito contribuíram para minha formação profissional e, principalmente, por ser exemplo de generosidade, responsabilidade e coração do bem. Graça e paz!

Aos Professores Sebastião de Campos Valadares Filho e Augusto César de Queiroz, pela coorientação.

Aos Professores Pedro Veiga Rodrigues Paulino, Mario Fonseca Paulino, Rogério de Paula Lana, George Kling de Moraes, Luciana Navajas Rennó e Juarez Lopes Donzele, pelos ensinamentos.

Aos meus eternos companheiros de sangue Geilson Alves e Micaela Barbosa, meu obrigada. São vocês que me dão a alegria de continuar.

Aos amigos do coração Márcia de Oliveira Franco, Erick Darlisson Batista, Luana Marta Rufino, pelo companheirismo, colaboração, conversas e principalmente aconselhamentos.

Ao GVM, parceiros para toda vida, e Fráteres CMM, por ser minha fonte de conhecimento e amor pelo seguimento à humanidade de Jesus.

A Philipe Amorim, Madson William, Leandro Martins, Sidnei Antônio e Gabriel Rocha, pelo auxílio nas coletas e pelo apoio.

Aos amigos e parceiros Dayana Alves, Astrid Selene, Victor Sales, Ana Paula Cornélio, Gabriela Santistevan, Daniele Baffa, Gabriela Câmara, Taiane Martins, Rafael Mezzomo, Uyara Xisto, David Contreras, Luiz Pereira, Juliana Soares, Emília Lisboa, Iana Mara, Bárbara Vilela e Monique, pela presteza e partilha do amor de Deus.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal Monteiro, Mário, Vera, Wellington, Fernando, Plínio e Valdir, e do Departamento de Zootecnia Fernanda, Joécio, Pum e Edson, pela amizade e pela colaboração. Deus abençoe vocês!

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste sonho e que desejaram que este momento tão importante em minha vida se concretizasse. Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

MARCÍLIA MEDRADO BARBOSA, filha de Marcílio Pedro Barbosa e Darcy Medrado, nasceu em Janaúba, Minas Gerais, em 1º de junho de 1988.

Em março de 2007, ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros, no curso de Zootecnia, colando grau em 22 de dezembro de 2011.

Em março de 2012, iniciou o curso de mestrado em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 18 de dezembro de 2013.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4

### **Variações em procedimentos laboratoriais para avaliação do teor de fibra insolúvel em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes de ruminantes**

Resumo.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados.....	17
Discussão.....	18
Conclusões.....	24
Referências Bibliográficas.....	24

### **Avaliação de métodos de quantificação dos teores de extrato etéreo em forragens e fezes de ruminantes**

Resumo.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	44
Discussão.....	46
Conclusões.....	49
Referências Bibliográficas.....	49

## RESUMO

BARBOSA, Marcília Medrado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro, de 2013. **Variações em procedimentos laboratoriais para avaliação dos teores de fibra insolúvel em detergente neutro e de extrato etéreo em alimentos e fezes de ruminantes.** Orientador: Edenio Detmann. Coorientadores: Augusto Cezar de Queiroz e Sebastião de Campos Valadares Filho.

A presente dissertação foi baseada em dois artigos científicos. No primeiro artigo, objetivou-se comparar as estimativas do teor de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) obtidas pelo método oficial *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC; método 2002.04) e por métodos modificados baseados no uso de ambientes pressurizados ou com a utilização direta de  $\alpha$ -amilase termoestável industrial em amostras de forragens, alimentos concentrados e fezes de ruminantes. As variações estudadas foram: aplicação do método AOAC 2002.04 substituindo-se o equipamento de refluxo por autoclave ou por extrator Ankom<sup>220</sup>® e sacos filtrantes F57; e aplicação do método AOAC 2002.04 substituindo-se os procedimentos de padronização e utilização da solução de  $\alpha$ -amilase por adição única de 250  $\mu$ L de solução industrial de Termamyl 2X previamente ao aquecimento da solução de detergente neutro. Foram avaliadas 39 amostras de fezes de animais ruminantes, 37 amostras de forragem e 30 amostras de concentrados. Os valores obtidos por cada variação foram comparados aos valores obtidos pelo método AOAC 2002.04 por intermédio do ajustamento de equação de regressão linear simples. Considerando-se amostras fecais e de forragens, as variações baseadas no uso de autoclave e na modificação da utilização de  $\alpha$ -amilase propiciaram resultados similares ( $P > 0,05$ ) aos obtidos com o método AOAC 2002.04. Resultados superestimados ( $P < 0,01$ ) foram obtidos com a utilização de extrator Ankom<sup>220</sup>®. Para amostras de concentrados, verificou-se para as variações baseadas no uso de autoclave e do extrator Ankom<sup>220</sup>® a ocorrência de erro sistemático positivo ( $P < 0,01$ ) com valores estimados de +23,4 e +96,7 g/kg de matéria seca, respectivamente. A variação baseada no uso de  $\alpha$ -amilase industrial incorreu em vício constante e vício de recuperação dos teores de FDN em amostras de concentrados ( $P < 0,01$ ) a despeito da grande proximidade com os valores obtidos com o método AOAC 2002.04. No segundo artigo objetivou-se comparar as estimativas da concentração de extrato etéreo (EE) obtidas pelo método de *Randall* e pelo método de alta temperatura recomendado pela *American Oil Chemist's Society* (AOCS; método Am 5-04). Foram realizados quatro experimentos utilizando amostras de forragens ( $n = 20$ ) e fezes de ruminantes ( $n = 15$ ). No primeiro experimento quantificou-se o teor de EE de todas as amostras utilizando-se a

combinação entre os métodos de extração de *Randall* e método de alta temperatura AOCS e sacos filtrantes XT4 e cartuchos de papel de filtro qualitativo (80 g/m<sup>2</sup>) como recipientes para acondicionamento das amostras. No segundo experimento avaliou-se a perda de partículas considerando-se os dois recipientes avaliados. No terceiro experimento avaliou-se a concentração de clorofila residual no material remanescente da extração considerando-se as combinações entre método e recipiente utilizadas no primeiro experimento. No quarto experimento avaliou-se a recuperação de proteína e minerais no material submetido à extração por ambos os métodos. Em todos os experimentos o éter de petróleo foi utilizado como extrator. Em nenhum experimento foram verificadas influências ( $P>0,05$ ) dos diferentes recipientes. Foi observada interação significativa ( $P<0,01$ ) entre método de extração e material avaliado sobre as concentrações de EE. O desdobramento deste efeito indicou maiores estimativas ( $P<0,01$ ) de concentração de EE utilizando-se o método AOCS, sendo a diferença entre métodos mais proeminente em amostras de forragens. Não foram verificadas perda de partículas com os diferentes recipientes ( $P>0,05$ ). O teor de clorofila nos resíduos não foi afetado pelo método de extração em amostras fecais, mas foi menor utilizando-se o método AOCS ( $P<0,05$ ) em amostras de forragens. Observou-se recuperação completa ( $P>0,05$ ) de proteína e minerais no material após extração. Os resultados indicam que o método AOCS produz maiores estimativas de concentração de EE possivelmente por propiciar maior extração de material não graxo.

## ABSTRACT

BARBOSA, Marcília Medrado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2013. **Variations in laboratory procedures to evaluate the neutral detergent fiber and ether extract contents in animal feeds and ruminant feces.** Adviser: Edenio Detmann. Co-Advisers: Augusto Cezar de Queiroz and Sebastião de Campos Valadares Filho.

This thesis consists of two different scientific articles. The first one aimed to compare the estimates of the neutral detergent fiber content (NDF) obtained by the official method of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, method 2002.04) and by modified methods based on the use of pressurized environments or by direct using of industrial thermo stable  $\alpha$ -amylase in forage, concentrate feed and ruminant feces samples. The modified methods were: application of AOAC method 2002.04 replacing the refluxing equipment by an autoclave or the Ankom220<sup>®</sup> fiber analyzer with F57 filter bags, and application of AOAC method 2002.04 replacing the standardized procedures and using  $\alpha$ -amylase solution by single addition of 250  $\mu$ L of a industrial Termamyl 2X solution prior to heating the solution of neutral detergent. Thirty nine ruminants feces samples, 37 forage samples and 30 samples of concentrates were evaluated. The values obtained for each modified method were compared to the values obtained by the AOAC 2002.04 method through the adjustment of a simple linear regression equation. Considering only forage and fecal samples, variations methods based on the use of autoclave and the modified use of  $\alpha$ -amylase provided similar values ( $P>0.05$ ) to those obtained with the AOAC method 2002.04. Overestimated NDF contents ( $P<0.01$ ) were obtained with the use of Ankom220<sup>®</sup> analyzer. For concentrate samples, using modified methods based on the use of autoclave or Ankom220<sup>®</sup> fiber analyzer produced positive systematic errors ( $P<0.01$ ) of +23.4 and +96.7 g/kg of dry matter, respectively. The method based on industrial  $\alpha$ -amylase incurred in constant bias and recovering bias on NDF contents in samples of concentrate ( $P<0.01$ ) despite of the similarity with the values obtained using the AOAC method 2002.04. In the second paper it was objectified to compare the estimates of ether extract (EE) contents obtained by the *Randall* method and by the method of high temperature recommended by the *American Oil Chemist's Society* (AOCS, Method Am 5-04). Four experiments were accomplished using forage samples ( $n = 20$ ) and ruminants feces ( $n = 15$ ). In the first experiment it was quantified the EE content in all samples using a combination between *Randall* extraction method or AOCS with high temperature, and filter bags XT4 or containers of qualitative paper (80 g/m<sup>2</sup>). In the second experiment, it was evaluated the

loss of particles by considering the two previously described containers. In the third experiment, it was evaluated the residual concentration of chlorophyll in the remaining material after extraction considering the combinations of container and methods used in the first experiment. The fourth experiment was carried out to evaluate the recovery of protein and minerals in the material submitted to extraction by both methods. In all experiments, the petroleum ether was used as extractor. None effect of the containers ( $P>0.05$ ) was observed in any experiment. A significant interaction ( $P<0.01$ ) between extraction method and material was observed on the EE contents. For all materials, greater EE contents ( $P<0.01$ ) were obtained with AOCS method. Despite this, the difference between methods was most prominent when considering forage samples. No loss of particles was observed ( $P>0.05$ ) using the different containers. The chlorophyll content in the residual material was not affected by extraction method in fecal samples ( $P>0.05$ ), but it was lower using the AOCS method ( $P<0.05$ ) in forage samples. Complete recovery of protein and minerals was observed ( $P>0.05$ ) in the material after ether extraction. The results indicate that the AOCS method produces greater estimates of EE contents, possibly by providing greater extraction of non-fatty material.

## INTRODUÇÃO GERAL

Métodos precisos e acurados são necessários para o conhecimento exato da composição dos alimentos e para a formulação adequada de dietas para animais (Van Soest et al., 1991; Detmann et al., 2008).

Para animais ruminantes, o conhecimento dos componentes fibrosos dos alimentos possui importância principalmente devido à sua capacidade de disponibilizar energia por intermédio dos processos fermentativos e sua associação direta com o efeito de enchimento do trato gastrointestinal (Detmann et al., 2008).

Por outro lado, a gordura bruta ou extrato etéreo (EE), embora apresentando concentrações extremamente inferiores aos demais componentes na maioria dos alimentos, possui posição central na obtenção de estimativas do teor energético, em razão de sua elevada densidade calórica (Detmann et al., 2006).

Considerando que tanto a fibra (Undersander et al., 1993) como o EE (Palmquist & Jenkins, 2003) são definidos pelo método de análise, deve estar claro que qualquer modificação nos métodos utilizados possui o potencial para definir novos valores de fibra ou EE que não seriam comparáveis com aqueles produzido pelos métodos originais.

O método para análise de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) proposto e avaliado por intermédio de estudo colaborativo por Mertens (2002) foi oficializado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC; método 2002.04). Neste método ressaltam-se quatro pontos principais no tocante aos procedimentos de análise: o uso de sistema de refluxo com condensadores para extração do conteúdo celular; a filtração e retenção do resíduo insolúvel em cadinhos filtrantes; o uso de  $\alpha$ -amilase termoestável para auxiliar na retirada do amido; e a expressão do resíduo insolúvel na base orgânica, excluindo-se a contaminação mineral.

A despeito de tais definições, diferentes equipamentos e recipientes de filtração encontram-se disponíveis para realização de análises de componentes fibrosos insolúveis, os quais se destacam pelo uso de ambientes pressurizados e/ou adoção de sacos filtrantes em detrimento aos cadinhos para separação do resíduo insolúvel. Parte destas modificações tornaram-se mais regularmente utilizadas com o surgimento do sistema Ankom® baseado na extração sob pressão e uso de sacos filtrantes F57® (Vogel et al., 1999; Berchielli et al., 2001; Fay et al., 2009; Valente et al., 2011a; Gomes et al., 2011a). Adicionalmente, Gomes et al. (2011b) e Detmann et al. (2012) descreveram método baseado no uso de ambiente pressurizado para análises de fibra em coletores universais individuais por amostra e utilizando a autoclave como ambiente pressurizado, mas preservando-se o uso de cadinhos filtrantes.

Uma limitação inerente à análise de FDN refere-se à gelatinização do amido presente nas amostras e fezes durante o procedimento de extração por calor, sem que ocorra a solubilização pelo detergente (Mertens, 2002), o que superestima o teor de FDN. Tal comportamento demanda a ação adjuvante de enzima  $\alpha$ -amilase durante o procedimento de extração com detergente neutro (Mascarenhas Ferreira et al., 1983; Van Soest et al., 1991; Valente et al., 2011b).

A forma de utilização da  $\alpha$ -amilase termoestável proposta por Mertens (2002) e adotada pela AOAC requer procedimento de padronização da  $\alpha$ -amilase industrial, o qual deve ser realizada a cada partida. Esta padronização demanda tempo e possui características parcialmente subjetivas. Procedimento alternativo e simplificado envolvendo a utilização direta de enzimas industriais foi proposto por Detmann et al. (2012) e Gomes et al. (2013).

Entre os métodos gravimétricos de avaliação da concentração de EE, o método da submersão, também conhecido como *Soxtec* ou método de *Randall* tem sido recomendado

para avaliação de alimentos para animais (Thiex et al., 2003; Detmann et al., 2012). Este método se baseia na extração da fração apolar do alimento em três etapas (submersão, lavagem e secagem) e foi inicialmente proposto para reduzir o tempo de análise e aumentar a eficiência operacional em relação ao método de *Soxhlet* (Palmquist & Jenkins, 2003). A exatidão e a rusticidade deste método foram avaliadas por Thiex et al. (2003), os quais propuseram em seu estudo procedimentos que culminaram na adoção do método de *Randall* como método oficial da AOAC.

De forma mais recente, a *American Oil Chemist's Society* (AOCS) tornou oficial método analítico para avaliação das concentrações de EE em alimentos utilizando sacos filtrantes e sistema de extração sob alta temperatura e pressão. Este método se caracteriza pela rapidez e alta capacidade operacional.

Contudo, em recente estudo, Silva et al. (2011) compararam as estimativas de EE obtidas com o método oficial proposto pela AOCS e o método de extração por gotejamento de *Goldfish* e concluíram que o método AOCS superestima a concentração de EE em amostras de fezes e forragens como possível reflexo da maior extração de material não graxo. Contudo, avaliações são ainda necessárias para se elucidar as causas das maiores estimativas obtidas com o método AOCS.

Assim definiu-se como objetivos gerais nesta dissertação:

1. comparar as estimativas do teor de fibra insolúvel em detergente neutro obtidas pelo método AOAC 2002.04 e por métodos modificados baseados no uso de ambientes pressurizados ou com a utilização direta de  $\alpha$ -amilase termoestável industrial em amostras de forragens, alimentos concentrados e fezes de animais ruminantes; e
2. comparar as estimativas de concentração de extrato etéreo obtidas pelo método de *Randall* e pelo método de alta temperatura recomendado pela AOCS em amostras de forragens e fezes de ruminantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berchielli, T.T.; Sader, A.P.O.; Tonani, F.L.; Paziani, S.F.; Andrade, P. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema Ankom. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1572-1578, 2001.
- Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Pina, D.S.; Campos, J.M.S.; Paulino, M.F.; Oliveira, A.S.; Silva, P.A. Estimation of ether extract digestibility in diets of ruminants: a model under Brazilian conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1469-1478, 2006.
- Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- Detmann, E.; Souza, M.A.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Berchielli, T.T.; Saliba, E.O.S.; Cabral, L.S.; Pina, D.S.; Ladeira, M.M.; Azevedo, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- Fay, J.P.; Guaita, M.S.; Danelón, J.L.; Chifflet, S.; Wawrzckiewicz, M.; Díaz, C.; Ross, D.A.; Fernández, H.M. Variability among four laboratories of the filter bag technique to determine acid and neutral detergent fiber contents in ruminant feeds from Argentina. **Journal of AOAC International**, v.92, p. 371-374, 2009.
- Gomes, D.I.; Detmann, E.; Valente, T.N.P.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C. Avaliação laboratorial de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas sob diferentes ambientes físicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.522-525, 2011a.
- Gomes, D.I.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Fukushima, R.S.; Souza, M.A.; Valente, T.N.P.; Paulino, M.F.; Queiroz, A.C. Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v.168, p.206-222, 2011b.
- Gomes, D.I.; Sampaio, C.B.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Mezzomo, R.; Regadas Filho, J.G.L. Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro em amostras com alto teor de amido. **Semina**, 2013 (submitted).

- Mertens, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- Mascarenhas-Ferreira, A.; Kerstens, J.; Gast, C.H. The study of several modifications of the neutral detergent fiber procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v.9, p.19-28, 1983.
- Palmquist, D.L.; Jenkins, T.C. Challenges with fats and fatty acid methods. **Journal of Animal Science**, v.81, p.3250-3254, 2003.
- Silva, P.T.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Detmann, K.S.C.; Barros, L.V.; Martins, S.C.V.; Morais, L.E.; Costa, V.A.C. Evaluation of total and non-fatty ether extract in feeds and cattle feces using two analytical methods. **Animal Feed Science and Technology**, v.163, p.111-117, 2011.
- Thiex, N.J.; Anderson, S.; Gildemeister, B. Crude fat, diethyl ether extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): collaborative Study **Journal of AOAC International**, v.86, p.888-898, 2003.
- Undersander, D.; Mertens, D.R.; Thiex, N. **Forage analyses procedures**. Omaha: National Forage Testing Association, 1993. 139p.
- Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Sampaio, C.B.; Gomes, D.I. Avaliação dos teores de fibra em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes bovinas moídas em diferentes tamanhos e em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1184-1154, 2011a.
- Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Paulino, M.F.; Figueiras, J.F.; Souza, M.A. Simulation of variations in the composition of samples in the evaluation of neutral detergent fiber contents by using cellulose standard in filter bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1596-1602, 2011b.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A.S. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.
- Vogel, K.P.; Pedersen, J.F.; Masterson, S.D.; Toy, J.J. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. **Crop Science**, v.39, p.276-279, 1999.

## **Variações em procedimentos laboratoriais para avaliação do teor de fibra insolúvel em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes de ruminantes**

### **Resumo**

Objetivou-se comparar as estimativas do teor de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) obtidas pelo método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC; método 2002.04) e por métodos modificados baseados no uso de ambientes pressurizados ou com a utilização direta de  $\alpha$ -amilase termoestável industrial em amostras de forragens, alimentos concentrados e fezes de ruminantes. As variações estudadas foram: aplicação do método AOAC 2002.04 substituindo-se o equipamento de refluxo por autoclave ou por extrator Ankom<sup>220</sup>® e sacos filtrantes F57; e aplicação do método AOAC 2002.04 substituindo-se os procedimentos de padronização e utilização da solução de  $\alpha$ -amilase por adição única de 250  $\mu$ L de solução industrial de Termamyl 2X previamente ao aquecimento da solução de detergente neutro. Foram avaliadas 39 amostras de fezes de animais ruminantes, 37 amostras de forragem e 30 amostras de concentrados. Os valores obtidos por cada variação foram comparados aos valores obtidos pelo método AOAC 2002.04 por intermédio do ajustamento de equação de regressão linear simples. Considerando-se amostras fecais e de forragens, as variações baseadas no uso de autoclave e na modificação da utilização de  $\alpha$ -amilase propiciaram resultados similares ( $P > 0,05$ ) aos obtidos com o método AOAC 2002.04. Resultados superestimados ( $P < 0,01$ ) foram obtidos com a utilização de extrator Ankom<sup>220</sup>®. Para amostras de concentrados, verificou-se para as variações baseadas no uso de autoclave e do extrator Ankom<sup>220</sup>® a ocorrência de erro sistemático positivo ( $P < 0,01$ ) com valores estimados de +23,4 e +96,7 g/kg de matéria seca, respectivamente. A variação baseada no uso de  $\alpha$ -amilase industrial incorreu em vício

constante e vício de recuperação dos teores de FDN em amostras de concentrados ( $P < 0,01$ ) a despeito da grande proximidade com os valores obtidos com o método AOAC 2002.04.

**Palavras chave:** análise de fibra,  $\alpha$ -amilase termoestável, fibra insolúvel, instrumentação em análise de fibra

## 1. Introdução

Os conceitos de fibra empregados na nutrição animal são essencialmente empíricos e definidos pelo método (Undersander et al., 1993; Mertens, 2003). Desta forma, a relevância das estimativas dos teores de fibra em alimentos obtidas por um método laboratorial será dependente do estabelecimento de uma associação funcional com algum conceito ou característica nutricional (Detmann, 2010).

O método para análise de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) proposto e avaliado por intermédio de estudo colaborativo por Mertens (2002) foi oficializado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC; método 2002.04). Neste método ressaltam-se quatro pontos principais no tocante aos procedimentos de análise: o uso de sistema de refluxo com condensadores para extração do conteúdo celular; a filtração e retenção do resíduo insolúvel em cadinhos filtrantes; o uso de  $\alpha$ -amilase termoestável para auxiliar na retirada do amido; e a expressão do resíduo insolúvel na base orgânica, excluindo-se a contaminação mineral.

A despeito de tais definições, diferentes equipamentos e recipientes de filtração encontram-se disponíveis para realização de análises de componentes fibrosos insolúveis, os quais se destacam pelo uso de ambientes pressurizados e/ou adoção de sacos filtrantes em detrimento aos cadinhos filtrantes para separação do resíduo insolúvel. Parte destas

modificações tornaram-se mais regularmente utilizadas com o surgimento do sistema Ankom® baseado em extração sob pressão e uso de sacos filtrantes F57® (Vogel et al., 1999; Berchielli et al., 2001; Fay et al., 2009; Valente et al., 2011a; Gomes et al., 2011a). Adicionalmente, Gomes et al. (2011b) e Detmann et al. (2012) descreveram método baseado no uso de ambiente pressurizado para análises de fibra em coletores universais individuais por amostra e utilizando a autoclave como ambiente pressurizado, mas preservando-se o uso de cadinhos filtrantes.

Uma limitação inerente à análise de FDN refere-se à gelatinização do amido presente nas amostras durante o procedimento de extração por calor, sem que ocorra a solubilização pelo detergente (Mertens, 2002; Hall, 2007), o que superestima o teor de FDN. Tal comportamento demanda a ação adjuvante de enzima  $\alpha$ -amilase durante o procedimento de extração com detergente neutro (Mascarenhas Ferreira et al., 1983; Van Soest et al., 1991; Valente et al., 2011b).

A forma de utilização da  $\alpha$ -amilase termoestável proposta por Mertens (2002) e adotada pela AOAC requer procedimento de padronização da  $\alpha$ -amilase industrial, o qual e ser realizado periodicamente. Esta padronização demanda tempo e possui características parcialmente subjetivas. Procedimento alternativo e simplificado envolvendo a utilização direta de enzimas industriais foi proposto por Detmann et al. (2012) e Gomes et al. (2013).

Contudo não foram encontradas referências na literatura que propiciem sustentação adequada à utilização das modificações aqui descritas no tocante ao ambiente físico de extração e/ou filtração e na simplificação do uso de  $\alpha$ -amilase em relação ao método oficial adotado pela AOAC para análise dos teores de FDN (método 2002.04).

Assim, objetivou-se comparar as estimativas do teor de fibra insolúvel em detergente neutro obtidas pelo método AOAC 2002.04 e por métodos modificados baseados no uso de ambientes pressurizados ou com a utilização direta de  $\alpha$ -amilase

termoestável industrial em amostras de forragens, alimentos concentrados e fezes de animais ruminantes.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Localização e amostras

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

As amostras de forragem frescas e conservadas foram obtidas no Setor de Forragicultura e no Laboratório de Animais do DZO. Foram avaliadas as seguintes forragens: *Brachiaria decumbens* (n = 4), *Brachiaria humidicola*, *Brachiaria brizanta* cv. Marandu (n = 7), *Brachiaria brizanta* cv. Piatã, *Panicum maximum* cv. Tanzânia, *Pennisetum purpureum* cv. Napier (n = 2), capim Tifton 85 (*Cynodon* sp.), estilosantes Campo Grande (*Stylosantes capitata* + *Stylosantes macrocephala*), estilosantes mineirão (*Stylosantes capitata*, *S. guianensis* e *S. macrocephala*), cana-de-açúcar *in natura* (*Saccharum* sp.) (n = 2), silagem de milho (*Zea mays*) (n = 5), silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), silagem de leguminosa (*Stylosantes* sp.) e fenos de baixa (*Brachiaria decumbens*) (n = 3) e de alta qualidade (*Cynodon* sp.). As forragens frescas foram coletadas em março de 2012 por corte rente ao solo. Foram adicionadas do grupo de amostras de forragens cinco amostras de sobras de dietas completas oferecidas a animais ruminantes, perfazendo o total de 37 amostras. Todas as amostras com alto teor de umidade foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C) e, em conjunto com as demais amostras, processadas em moinho de facas (1 mm).

As amostras de alimentos concentrados (n = 30) foram obtidas na Fábrica de Ração do DZO, sendo estas: milho grão (n = 4), sorgo grão (n = 2), farelo de algodão (n = 2),

farelo de soja (n = 7), casca de soja (n = 2), farelo de trigo e misturas concentradas completas (n = 13) utilizadas em experimentos para diferentes espécies (frangos de corte, galinhas poedeiras, suínos e bovinos confinados e em pastejo). Todas as amostras foram processadas em moinho de facas (1 mm).

As amostras de fezes de ruminantes foram coletadas em experimentos com bovinos de corte em cria, recria e terminação (confinados ou em pastejo) e com vacas e cabras em lactação, totalizando 39 amostras. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C) e processadas em moinho de facas (1 mm).

## 2.2. Análises laboratoriais

### 2.2.1. Análises químicas

Todas as amostras foram quantificadas quanto aos teores de matéria seca (método INCT-CA G-003/1), proteína bruta (método INCT-CA N-001/1), matéria mineral (método INCT-CA M-003/1) e extrato etéreo (método INCT-CA G-005/1), segundo métodos descritos em Detmann et al. (2012) (Tabela 1).

### 2.2.2. Análises de fibra em detergente neutro

Para comparação das estimativas de concentração de FDN foram conduzidas análises segundo o método oficial AOAC (2002.04) utilizando-se ambiente físico não pressurizado (aparelho de refluxo) e por intermédio de variações envolvendo ambientes pressurizados. Duas destas variações seguiram exatamente os procedimentos descritos no método AOAC (2002.04), mas empregando-se extrator Ankom<sup>220®</sup> e sacos filtrantes F57® ou autoclave e cadinhos filtrantes. Uma terceira variação foi avaliada na qual o método AOAC (2002.04) foi aplicado, modificando-se, contudo, o procedimento de uso da  $\alpha$ -

amilase, adotando-se a utilização de enzima industrial previamente ao aquecimento da solução de detergente neutro (SDN) conforme método INCT-CA F-002/1 (Detmann et al., 2012).

Para que a comparação entre métodos pudesse se restringir às características físicas do processo de extração ou à forma de utilização da  $\alpha$ -amilase, em todas as variações foram utilizadas a SDN, utilização de sulfito de sódio e a correção para cinzas contaminantes propostas por Mertens (2002).

A SDN foi composta por: 990 mL de água destilada; 4,0 g NaOH; 14,6 g EDTA; 4,6 g fosfato de sódio bibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 6,8 g borato de sódio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ); 30 g sulfato láurico de sódio; 10 mL de trietileno glicol. O pH final ficou entre 6,95 e 7,05. O sulfito de sódio foi adicionado no momento da análise na proporção de 10 g/L.

#### 2.2.2.1. Padronização da solução de $\alpha$ -amilase

Os procedimentos de padronização da solução de  $\alpha$ -amilase termoestável seguiram as descrições do método AOAC 2002.04 (Mertens, 2002) e foram realizados utilizando-se a enzima Termamyl 2X (Novozymes®).

Foram adicionados em seis béqueres (600 mL) 500 mg de milho degerminado e 50 mL de SDN, excluindo-se o sulfito de sódio. O extrator de fibras (Marconi® MA450) foi aquecido por 5 a 10 minutos. Adicionalmente, foram utilizadas duas alíquotas em “branco” contendo somente a SDN para diferenciação da cor encontrada quando utilizada a enzima industrial.

Após a preparação, os copos, exceto os “brancos”, foram inseridos no extrator de fibras em intervalos de 1 minuto. Depois de iniciada a ebulição do detergente, foram adicionados volumes crescentes da enzima industrial (0; 0,025; 0,05; 0,10; 0,20; e 0,40

mL, sendo um béquer para cada volume da enzima). Os béqueres foram então mantidos sob refluxo por 10 minutos. Em sequência, os béqueres foram removidos e foi realizada a segunda adição de enzima, seguindo-se as doses da primeira adição. Após a adição da  $\alpha$ -amilase, as partículas da amostra aderidas à parede do béquer foram resuspensas por aspersão com SDN, e em seguida, aguardando-se o tempo de 1 minuto para decantação das partículas. Nas alíquotas em “branco” adicionou-se, respectivamente, 0,05 e 0,10 mL de solução de  $\alpha$ -amilase industrial. Na sequência, o conteúdo de cada béquer foi transferido para outro béquer (100 mL) identificado. A transferência foi realizada com filtração por camada dupla de gaze. Posteriormente, os béqueres contendo cada volume de enzima (com exceção dos “brancos”) foram colocados em banho de gelo (temperatura inferior a 1°C) durante 5 minutos, com temperatura de retirada próxima a 21°C. Em seguida, os béqueres foram condicionados em banho-maria a 20°C por mais 5 minutos. Decorrido este tempo, os béqueres foram organizados em ordem crescente de acordo com a concentração da enzima  $\alpha$ -amilase sobre uma folha de papel branca. Adicionou-se 500  $\mu$ L de solução de iodo de Burke (20 g KI e 1 g I<sub>2</sub>/L; solução mantida em vidro âmbar) em cada béquer.

Após 90 segundos, visualizou-se a parte superior de cada béquer sobre o fundo branco e classificou-se, em 30 segundos, a cor de cada um dos béqueres segundo a escala não paramétrica:

- Púrpura: o volume da enzima adicionada não está adequado;
- Rosa âmbar ou âmbar: o volume da enzima adicionada não está adequado;
- Amarelo pálido: o volume da enzima está adequado.

Foi realizada a comparação entre o béquer contendo o volume da enzima adequado (ou que apresentou a cor amarelo pálido) com o béquer “branco” para se evitar o confundimento da coloração marrom obtida com a coloração âmbar ou rosa âmbar do “branco” (Mertens, 2002). O menor volume de concentração de enzima utilizado que

apresentou a cor amarelo pálido foi definido como a dose padrão, a qual foi diluída em água (q.s.p 2 mL).

Os volumes de enzima e água destilada necessários para a preparação da solução de trabalho são dados por:

$$VTE = n \times 2 \times Vc \quad (1);$$

$$VTA = n \times [4 - 2 \times (Vc)] \quad (2);$$

em que: VTE = volume total da solução comercial de enzima (mL); n = número de amostras a serem analisadas no período máximo de 5 dias; Vc = volume de  $\alpha$ -amilase correspondente à coloração amarelo pálido (mL); e VTA = volume total de água destilada (mL).

Depois de estabelecidos os volumes necessários, a solução de trabalho foi preparada e mantida sob refrigeração (4°C).

#### 2.2.2.2. Análise de fibra em detergente neutro segundo o método AOAC 2002.04

Os cadinhos filtrantes de vidro (30 mL; porosidade grossa) foram identificados e mantidos por 16 horas em estufa não ventilada (105°C); após esse período foram acondicionados em dessecador e pesados.

Duas alíquotas de 450-500 mg de cada amostra juntamente com 0,5 g de sulfito de sódio foram acondicionadas em béqueres de 600 mL, adicionando-se, em seguida, 50 mL de SDN. O conteúdo de cada béquer foi homogeneizado por agitação.

Após o aparelho de refluxo (Marconi® MA450) ter sido aquecido cada béquer foi inserido em uma unidade do extrator, aguardando-se cerca de cinco minutos para que a SDN entrasse em ebulição. Após a ebulição, adicionou-se 2 mL de solução de trabalho de  $\alpha$ -amilase por amostra. O conteúdo dos béqueres foi novamente homogeneizado e as partículas aderidas à parede do béquer foram re-suspensas por aspersão com SDN. A

unidade condensadora foi acoplada novamente a cada béquer e o sistema de refluxo reestabelecido e mantido em ebulição durante 60 minutos.

Em sequência à extração procedeu-se à filtração. Cada cadinho filtrante foi acoplado à unidade de filtração a vácuo e aquecido por adição de água destilada quente (temperatura superior a 90°C). O conteúdo de cada béquer foi transferido cuidadosamente para o cadinho filtrante submetido a uma pressão mínima de vácuo que foi lavado com uma corrente fina de água quente até a completa retirada de partículas. Após a transferência completa das partículas para o cadinho filtrante, esse foi preenchido com água destilada quente até a metade do seu volume, sendo adicionados 2 mL de solução de trabalho de  $\alpha$ -amilase por amostra. Após 60 segundos, a solução foi filtrada e o resíduo lavado duas vezes com água quente. Em seguida, adicionou-se acetona deixando o resíduo imerso por dois minutos, filtrando-se em sequência.

Os cadinhos com o resíduo fibroso foram mantidos em estufa não ventilada (105°C/16 horas), acondicionados em dessecador e pesados.

Após a obtenção do resíduo fibroso os cadinhos contendo as amostras foram submetidos à incineração para obtenção da contaminação mineral (550°C/ 2 horas; Método INCT-CA M-002/1; Detmann et al., 2012).

### 2.2.2.3. Análise de fibra em detergente neutro com adaptação ao método Ankom®

Para avaliação da variação de acordo como método Ankom®, duas alíquotas de cada amostra com aproximadamente 500 mg foram adicionadas em sacos filtrantes F57, os quais foram selados por calor e acondicionados em extrator Ankom<sup>220</sup>®.

Seguindo-se as relações estabelecidas por Mertens (2002), foram adicionados por amostra cerca de 500 mg de sulfito de sódio e 50 mL de SDN no interior do extrator. Iniciou-se então o aquecimento da solução. Após ebulição, aguardou-se 5 minutos para adição da solução de trabalho de  $\alpha$ -amilase (2 mL/amostra). O equipamento foi então fechado e a temperatura mantida em 100°C por 1 hora. Após este período, o equipamento foi aberto, o detergente drenado e substituído por água destilada quente (temperatura superior a 90°C), sendo então realizada a segunda adição de solução de trabalho de  $\alpha$ -amilase (2 mL/amostra). Os sacos foram sequencialmente lavados com água destilada quente (duas vezes) e acetona. Os sacos foram retirados do extrator, secos em estufa com ventilação forçada (60°C/24 horas) e, sequencialmente, em estufa não ventilada (105°C/2 horas), mantidos em dessecador e pesados.

Para obtenção do valor de cinzas contaminantes, as amostras com os sacos filtrantes foram acondicionadas em cadinhos de porcelana e incineradas em mufla (550°C/2 horas). Sacos F57 foram queimados sem amostra para obtenção da concentração de cinzas no saco.

Previamente aos procedimentos de extração os sacos F57 foram lavados com solução comercial de detergente neutro conforme descrição de Detmann et al. (2012), secos e pesados conforme os procedimentos descritos anteriormente, obtendo-se as taras.

#### 2.2.2.4 Análise de fibra em detergente neutro com adaptação ao método INCT-CA F-002/1

Duas alíquotas de cada amostra com aproximadamente 500 mg foram adicionadas em potes de polietileno (120 mL). Em seguida foram adicionados 50 mL de SDN e 500 mg de sulfito de sódio. Os potes foram fechados e, em seguida, mantidos em autoclave durante 5 minutos em temperatura de 105°C. O aparelho foi desligado e os potes retirados e abertos para adição de 2 mL de solução de trabalho de  $\alpha$ -amilase por pote. Ao final os potes foram novamente tampados, colocados na autoclave e mantidos por 60 minutos à temperatura de 105°C. A segunda adição de solução de  $\alpha$ -amilase, filtragem, pesagem e correção para cinzas foram realizados conforme os procedimentos descritos para o método AOAC 2002.04.

#### 2.2.2.5 Análise de fibra em detergente neutro segundo o método AOAC 2002.04 com modificação no uso da enzima $\alpha$ -amilase

Nesta variação, os procedimentos foram conduzidos como previamente descritos para o método AOAC 2002.04 (Mertens, 2002), excluindo-se, contudo, a utilização da solução padronizada de  $\alpha$ -amilase em duas adições. Este procedimento foi substituído por uma única adição de 250  $\mu$ L de solução industrial da enzima Termamyl 2X (Novozymes®) com mínima atividade de 240 KNU-T/g sobre o detergente em temperatura ambiente previamente ao aquecimento, segundo recomendações de Detmann et al. (2012; método INCT-CA F-002/1) e Gomes et al. (2013).

### 2.3. Análises Estatísticas

Os resultados foram avaliados independentemente para cada grupo de amostras (forragens, concentrados e amostras fecais) por intermédio do ajustamento de equações de

regressão linear simples considerando-se as estimativas obtidas pelo método AOAC 2002.04 como variável independente e as estimativas obtidas pelas diferentes variações como variáveis dependentes. Os resultados foram avaliados por intermédio das seguintes hipóteses de nulidade:

$$H_0 : \beta_0 = 0 \quad (3);$$

$$H_0 : \beta_1 = 1 \quad (4).$$

As avaliações estatísticas foram, portanto, conduzidas sob a pressuposição de o método AOAC 2002.04 produzir estimativas exatas da concentração de FDN para os diferentes tipos de amostras aqui avaliadas. Assim, sob esta pressuposição, a rejeição da hipótese de nulidade (3) indicaria a presença de vício constante ou erro sistemático sobre as estimativas. Adicionalmente, a rejeição da hipótese de nulidade (4) indicaria a presença de vício de recuperação da FDN contida nas amostras. Os resultados obtidos por determinada variação foram considerados similares aos resultados obtidos pelo método AOAC 2002.04 quando ambas as hipóteses de nulidade foram aceitas. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento REG constante no programa SAS (versão 9.2) adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

### **3. Resultados**

De forma geral, os resultados obtidos com amostras fecais foram mais precisos que os resultados obtidos com forragens. As amostras de concentrado exibiram a menor precisão entre os materiais avaliados. Por outro lado, a variação de análise baseada no uso do sistema Ankom propiciou resultados mais precisos em comparação ao método AOAC e as demais variações, as quais foram aproximadamente similares em termos de precisão (Tabela 2).

Considerando-se amostras fecais e de forragens, as variações baseadas no uso de autoclave e na modificação da utilização de  $\alpha$ -amilase (variação AOACa) propiciaram resultados similares ( $P>0,05$ ) aos obtidos com o método AOAC 2002.04 (Tabela 3; Figuras 1 e 2). Neste caso, a aceitação de ambas as hipóteses de nulidade avaliadas (Equações 3 e 4) gera subsídios para se afirmar que os erros sistemáticos (Tabela 2) destas variações são não-significativos.

Por outro lado, ambas as hipóteses de nulidade foram rejeitadas ( $P<0,01$ ) quando amostras de fezes e forragens foram avaliadas utilizando-se a variação baseada no método Ankom (Tabela 3). Neste caso, verificou-se superestimação dos teores de FDN (Figura 3), justificando-se os elevados erros sistemáticos calculados para esta variação dos procedimentos de análise (Tabela 2).

Considerando-se amostras de concentrados, verificou-se para as variações baseadas no uso de autoclave e do sistema Ankom a rejeição ( $P<0,01$ ) da hipótese de nulidade associada ao intercepto e, concomitantemente, aceitação ( $P>0,05$ ) da hipótese de nulidade associada ao coeficiente de inclinação (Tabela 3). Isso indica que a relação quantitativa entre estas variações e o método AOAC 2002.04 é similar, mas ambas exibirão vício constante ou erro sistemático para todas as amostras avaliadas ( $P<0,05$ ), os quais assumem os valores de +23,4 e +96,7 g/kg MS para o uso da autoclave e para o sistema Ankom, respectivamente (Tabela 2).

A avaliação da variação AOACa evidenciou rejeição ( $P<0,01$ ) de ambas as hipóteses de nulidade (Tabela 3; Figura 3), o que indica que a presença de vícios possui estrutura mais complexa quando consideradas amostras de alimentos concentrados.

#### 4. Discussão

Em muitos casos, modificações dos métodos para análise de fibra são desenvolvidas para suprir demandas específicas de uma situação ou projeto. Em outros casos, modificações são realizadas por conveniência ou para ampliar a rapidez do processo analítico. Considerando que a fibra é definida pelo método de análise, deve estar claro que qualquer modificação possui o potencial para definir um novo valor de fibra que não é comparável com aquele produzido pelo método original. Assim, a sensibilidade dos valores de fibra em relação ao método de análise permite sugerir que o método em si deve ser seguido com exatidão para que os resultados sejam reprodutíveis. Para ser considerada aceitável qualquer modificação do método de análise de fibra deve ser avaliada sobre alta gama de amostras de diferentes origens (Undersander et al., 1993).

Existem muitas variações sobre o método de análise de FDN (Van Soest & Robertson, 1985; Mertens, 2002). De forma geral, estas modificações podem ser enquadradas em três categorias: 1. métodos baseados em alterações na base conceitual da FDN; 2. métodos baseados em alterações instrumentais para manipulação e filtração das amostras; e 3. métodos baseados na aplicação de  $\alpha$ -amilases para remoção de amido e melhoria das condições de filtração (Van Soest & Robertson, 1985).

As duas primeiras variações avaliadas neste estudo devem ser enquadradas na segunda categoria apresentada por Van Soest & Robertson (1985), nas quais se buscou preservar todas as condições ditadas pelo método AOAC 2002.04, variando-se somente as condições instrumentais da análise.

A utilização de autoclave nos procedimentos de análise de fibra insolúvel pode ser considerada vantajosa, pois este equipamento é relativamente comum em laboratórios

(Senger et al., 2007), possui fácil operação, baixo custo e menor demanda de investimento para realização da análise, além de possuir maior capacidade operacional em comparação aos equipamentos convencionais com refluxo.

Os resultados obtidos permitem indicar que a alteração do sistema de refluxo (método AOAC 2002.04) pela utilização da autoclave confere resultados similares (Tabela 3; Figura 1) e com precisão similar (Tabela 2) para amostras de fezes e forragens. Estes resultados concordam com Pell & Schofield (1993), que empregaram a autoclave com os mesmos parâmetros físicos adotados neste trabalho (105°C/60 minutos) e verificaram similaridade com os valores obtidos pelo método de refluxo em amostras de forragens.

Contudo, para amostras de concentrados, verificou-se vício ou erro sistemático de aproximadamente +23,4 g FDN/kg MS para a variação baseada no uso da autoclave (Tabela 2). Considerando-se que as condições de temperatura podem ser consideradas similares no método AOAC 2002.04 e com o uso da autoclave, a diferença física predominante entre estes métodos é a alta pressão verificada no interior da autoclave (0,30-0,35 kgf/cm<sup>2</sup>). Com a alta pressão, eleva-se o ponto de ebulição da água, não havendo ebulição ou refluxo da SDN.

Diversos autores têm ressaltado a importância de se manter a SDN sob refluxo durante o processo de extração (Van Soest & Robertson, 1985; Undersander et al., 1993; Mertens, 2002). Van Soest & Robertson (1985) afirmaram que o refluxo deve ser suficiente para promover a convecção das partículas, mas evitando-se excessos que possam causar o deslocamento e aderência das partículas nas paredes do béquer. Segundo estes autores, a deficiência no refluxo conduz à superestimação do resíduo insolúvel em detergente neutro. Apesar destes argumentos, nenhum dos autores aqui citados apresentou justificativa clara do papel do refluxo em si na extração do material solúvel em detergente neutro. Contudo, considerando-se que haja um papel auxiliar na solubilização, a

ausência de refluxo na autoclave justificaria o viés positivo sobre os teores de FDN em amostras de concentrados (Tabelas 2 e 3). Este viés não seria observado em amostras de fezes e forragens, haja vista a menor proporção de material a ser solubilizado pela SDN e a baixa participação de materiais de maior dificuldade de solubilização como, por exemplo, o amido. No entanto, sugere-se que mais estudos sejam conduzidos para comprovação destes argumentos.

Assim, considerando-se os resultados obtidos com forragens e fezes (Tabela 3; Figura 1), a autoclave poderia ser recomendada em substituição ao sistema refluxo para este tipo de amostras. Por outro lado, a presença de vício constante, mas com ausência de vício de recuperação, sobre as estimativas de FDN para amostras de concentrado denota potencial de utilização da autoclave para este tipo de amostra, uma vez que a utilização de um fator de correção constante poderia assegurar a exatidão das estimativas. De acordo com os dados obtidos neste estudo, o fator de correção seria de -23,4 g/kg MS (oposto ao valor do erro sistemático; Tabela 2). Contudo, além da necessidade de maiores estudos ressaltada anteriormente, o banco de dados deste trabalho para amostras de concentrados (n = 30) não deve ser considerado satisfatório para recomendação de fator de correção com alta acurácia.

Comportamento similar ao observado com a autoclave foi verificado com o uso do extrator Ankom para amostras de concentrados (Tabela 3; Figura 2). Ao menos parte deste comportamento pode ser atribuída aos mesmos motivos apresentados para a ocorrência de erro sistemático com o uso da autoclave. A extração no equipamento Ankom ocorre sob pressão, o que impede a ebulição da SDN e, conseqüentemente, o refluxo. Embora o extrator Ankom<sup>220</sup>® seja dotado de mecanismo que tenta simular o refluxo por intermédio da agitação das amostras, este parece não ser completamente efetivo.

Contudo, fatores adicionais parecem atuar sobre as estimativas de concentração de FDN obtidas utilizando-se o extrator Ankom, pois, diferentemente da autoclave, as estimativas obtidas com amostras de forragens e fezes foram diferentes daquelas obtidas com o método AOAC 2002.04 (Tabela 3), havendo superestimação dos resultados (Figura 2). Estes resultados contrariam aqueles obtidos por outros autores (Vogel et al., 1999; Berchielli et al., 2001; Casali et al., 2009), os quais verificaram similaridade quanto aos teores de FDN obtidos sob refluxo e utilizando-se sacos filtrantes e extrator Ankom.

Considerando-se que o refluxo parece ser elemento relevante para o processo de extração (Van Soest & Robertson, 1985; Undersander et al., 1993; Mertens, 2002), o acondicionamento das amostras em sacos filtrantes pode comprometer ou reduzir o fluxo de detergente sobre a amostra. O saco filtrante F57 é formado por deposição das fibras sintéticas sem arranjo geométrico regular, conferindo porosidade peculiar voltada à prevenção da perda de partículas fibrosas durante o processo de análise (Casali et al., 2009; Valente et al., 2011a). Diversos autores têm relatado que existe dificuldade de troca de material entre o interior e o exterior de sacos de baixa porosidade (Lindberget al., 1984; Krizsan et al., 2013), incluindo sacos F57 (Valente et al., 2011c; Ramin et al., 2013). Esta característica pode influenciar efetivamente o fluxo de detergente sobre a amostra e, sob certas condições, propiciar a formação de microambiente no interior dos sacos que sejam diferentes das condições necessárias para extração da fração solúvel em detergente neutro.

Adicionalmente, ressalta-se que a extração em equipamento Ankom<sup>220</sup>® é realizada de forma coletiva (e não individualmente para cada amostra/alíquota como no sistema de refluxo ou na autoclave). Isto poderia promover a migração de material extraído de uma amostra para outra, comprometendo a exatidão das estimativas (Tabela 2).

A utilização de enzima  $\alpha$ -amilase termoestável na avaliação da concentração de FDN é procedimento padrão para promover a solubilização do amido em amostras de

alimentos (Van Soest et al., 1991; Mertens, 2002), evitando assim que o amido gelatinize e seja contabilizado como resíduo fibroso, superestimando a concentração de FDN. Contudo, a forma de utilização da  $\alpha$ -amilase termoestável proposta por Mertens (2002) e adotada para o método AOAC 2002.04 requer padronização da  $\alpha$ -amilase industrial, a qual deve ser realizada a cada partida. Esta padronização demanda tempo e possui características parcialmente subjetivas.

Com o intuito de simplificar estes procedimentos (padronização e utilização da  $\alpha$ -amilase), alternativa envolvendo a utilização direta de enzimas industriais foi proposta por Detmann et al. (2012) e Gomes et al. (2013). De acordo com os procedimentos definidos por estes autores, seria necessária apenas uma adição da enzima previamente ao aquecimento da SDN, visando à ativação da enzima em conjunto com a elevação de temperatura da SDN. Por outro lado, a adição da enzima durante a filtração seria considerada desnecessária, haja vista que o contato com o substrato possui duração de aproximadamente 60 segundos (Mertens, 2002), tempo que não propiciaria adequada ativação enzimática.

Segundo procedimentos avaliados por Gomes et al. (2013), seriam necessários apenas 250  $\mu$ L de solução de Termamyl 2X com atividade mínima de 240 KNU-T/g para a correta extração do amido em amostras de grãos. Ressalta-se que a enzima utilizada apresentava, segundo laudo emitido pelo fabricante, atividade de 269 KNU-T/g.

O procedimento alternativo de uso da  $\alpha$ -amilase se mostrou adequado para amostras fecais e de forragens (Tabela 3; Figura 3). Contudo, os resultados obtidos com esta variação foram diferentes daqueles obtidos com o método AOAC 2002.04 para amostras de concentrados (Tabela 3). No entanto, apesar da diferença, observou-se proximidade entre os métodos, pois o erro sistemático foi de baixa magnitude (+9,8 g/kg; Tabela 2) e o desvio da estimativa do intercepto do valor paramétrico 1 foi pequeno (Tabela 3). Com

alguma possibilidade, a diferença entre métodos poderia ser atribuída à diferença na quantidade de enzima utilizada, pois com o procedimento de padronização do método AOAC 2002.04 utilizou-se na primeira adição aproximadamente 0,4 mL de Termamyl 2X por amostra. Contudo, sugere-se a realização de mais avaliações envolvendo amostras de alimentos concentrados para avaliação da ocorrência de diferença entre variações do método e atribuição de causas a esta diferença, caso seja novamente detectada.

## 5. Conclusões

A análise da concentração de fibra em detergente neutro em amostras de forragens e fezes de animais ruminantes pode ser realizada segundo os procedimentos do método AOAC 2002.04 com a substituição de equipamento de refluxo por autoclave. Para amostras de concentrados, contudo, esta substituição gera vício constante sobre as estimativas obtidas. A utilização de extrator de fibras Ankom<sup>220</sup>® gera estimativas da concentração de fibra em detergente neutro viesadas em amostras de forragens, fezes e concentrados, não se recomendando sua utilização.

## 6. Referências

Berchielli, T.T.; Sader, A.P.O.; Tonani, F.L.; Paziani, S.F.; Andrade, P. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema Ankom. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1572-1578, 2001.

Casali, A.O.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Pereira, J.C.; Cunha, M.; Detmann, K.S.C.; Paulino, M.F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.130-138, 2009.

- Detmann, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: Pereira, E.S.; Pimentel, P.G.; Queiroz, A.C.; Mizubuti, I.Y. (Eds.) **Novilhas leiteiras**. Fortaleza: Graphiti, 2010. p.235-302.
- Detmann, E.; Souza, M.A.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Berchielli, T.T.; Saliba, E.O.S.; Cabral, L.S.; Pina, D.S.; Ladeira, M.M.; Azevedo, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- Fay, J.P.; Guaita, M.S.; Danelón, J.L.; Chifflet, S.; Wawrzckiewicz, M.; Díaz, C.; Ross, D.A.; Fernández, H.M.; Variability among four laboratories of the filter bag technique to determine acid and neutral detergent fiber contents in ruminant feeds from Argentina. **Journal of AOAC International**, v.92, p.371-374, 2009.
- Gomes, D.I.; Detmann, E.; Valente, T.N.P.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C. Avaliação laboratorial de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas sob diferentes ambientes físicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.522-525, 2011a.
- Gomes, D.I.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Fukushima, R.S.; Souza, M.A.; Valente, T.N.P.; Paulino, M.F.; Queiroz, A.C. Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v.168, p.206-222, 2011b.
- Gomes, D.I.; Sampaio, C.B.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Mezzomo, R.; Regadas Filho, J.G.L. Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro em amostras com alto teor de amido. **Semina**, 2013 (submitted).
- Hall, M.B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.359-367, 2007.
- Krizan, S.J.; Jancik, F.; Ramin, M.; Huhtanen, P. Comparison of some aspects of the in situ and in vitro methods in evaluation of neutral detergent fiber digestion. **Journal of Animal Science**, v.91, p.838-847, 2013.
- Lindberg, J.E.; Kaspersson, A.; Cizuk, P. Studies on pH, number of protozoa and microbial ATP concentrations in rumen-incubated nylon bags with different pore sizes. **Journal of Agricultural Science**, v.102, p.501-504, 1984.

- Mascarenhas-Ferreira, A.; Kerstens, J.; Gast, C.H. The study of several modifications of the neutral detergent fibre procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v.9, p.19-28, 1983.
- Mertens, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- Mertens, D.R. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. **Journal of Animal Science**, v.81, p.3233-3249, 2003.
- Pell, A.; Schofield, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- Ramin, M.; Krizsan, S.J.; Jancik, F.; Huntanen, P. Measurements of methane emissions from feed samples in filter bags or dispersed in the medium in an in vitro gas production system. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.4643-4646, 2013.
- Senger, C.C.D.; Kozloski, G.V.; Sanchez, L.M.B.; Mesquita, F.R.; Alves, T.P.; Castagnino, D.S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.146, p.169-174, 2008.
- Undersander, D.; Mertens, D.R.; Thiex, N. **Forage analyses procedures**. Omaha: National Forage Testing Association, 1993. 139p.
- Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Sampaio, C.B.; Gomes, D.I. Avaliação dos teores de fibra em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes bovinas moídas em diferentes tamanhos e em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1184-1154, 2011a.
- Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Paulino, M.F.; Figueiras, J.F.; Souza, M.A. Simulation of variations in the composition of samples in the evaluation of neutral detergent fiber contents by using cellulose standard in filter bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1596-1602, 2011b.
- Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Queiroz, A.C.; Valadares Filho, S.C.; Gomes, D.I.; Figueiras, J.F. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2565-2573, 2011c.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B. **Analysis of forage and fibrous foods**. Ithaca: Cornell University, 1985. 202p.

Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A.S. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

Vogel, K.P.; Pedersen, J.F.; Masterson, S.D.; Toy, J.J. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. **Crop Science**, v.39, p.276-279, 1999.

Tabela 1

Estatísticas descritivas dos teores (g/kg de matéria seca) de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) das amostras de fezes, forragens e concentrados

Estatística	Item		
	MO	PB	EE
Fezes			
Média	870,6	122,6	31,8
Mínimo	757,0	66,9	7,2
Máximo	938,5	185,0	129,8
S	40,13	26,24	23,90
N			39
Forragens			
Média	892,9	76,6	15,4
Mínimo	51,0	15,1	2,0
Máximo	984,6	130,7	93,4
S	171,5	32,8	14,6
N			37
Concentrados			
Média	947,7	290,9	27,6
Mínimo	910,0	82,1	4,4
Máximo	989,0	604,6	65,3
S	24,7	163,2	13,6
N			30

Tabela 2

Estatísticas descritivas dos teores (g/kg de matéria seca) de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas das amostras de fezes, forragens e concentrados em função dos métodos de análise

Estatística	Método/Varição <sup>1</sup>			
	AOAC	Autoclave	Ankom	AOACa
<b>Fezes</b>				
Média	577,5	586,6	637,9	570,6
ES	---	9,1	60,4*	-6,9
Mínimo	372,6	377,5	391,5	302,7
Máximo	740,5	742,2	752,9	716,8
S	82,35	81,84	70,04	87,91
CV (%)	14,3	14,0	11,0	15,4
N			39	
<b>Forragens</b>				
Média	675,7	685,2	698,4	666,0
ES	---	9,5	22,7*	-9,7
Mínimo	463,7	471,0	462,5	359,1
Máximo	854,9	891,8	852,4	850,0
S	107,8	109,8	95,1	116,6
CV (%)	16,0	16,0	13,6	17,5
N			37	
<b>Concentrados</b>				
Média	182,2	205,6	278,9	192,0
ES	---	23,4*	96,7*	9,8*
Mínimo	14,4	9,8	61,6	15,5
Máximo	713,9	712,4	705,5	686,5
S	159,6	153,2	161,3	154,2
CV (%)	87,6	74,5	57,8	80,3
N			30	

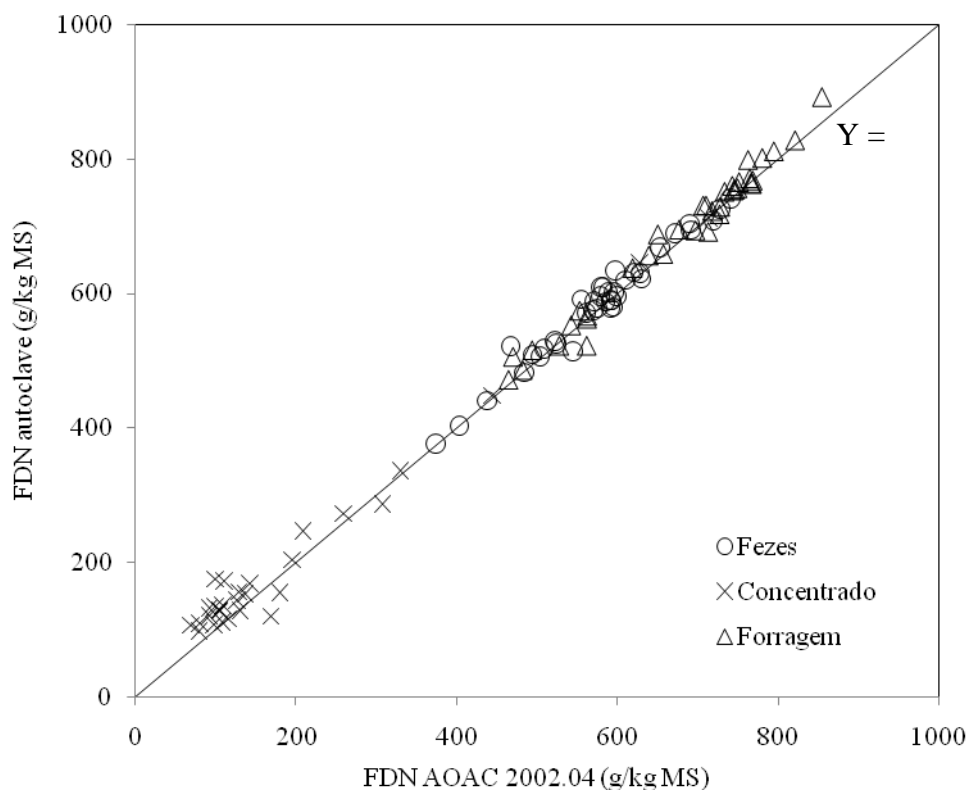
<sup>1</sup> AOAC: método AOAC 2002.04; Autoclave e Ankom: métodos conduzidos conforme os procedimentos descritos no método AOAC 2002.04 mas utilizando-se autoclave e extrator Ankom<sup>200</sup>®; AOACa: método AOAC 2002.04 adaptado com o uso de  $\alpha$ -amilase de acordo com recomendações do INCT-CA. <sup>2</sup> ES: erro sistemático. \* P<0,01.

Tabela 3

Estimativas dos parâmetros da regressão linear entre os teores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas obtida por diferentes variações no método de análise (variável dependente, Y) e pelo método AOAC 2002.04 (variável independente, X)

Variação <sup>1</sup>	Parâmetros da Regressão			r <sup>2</sup>	Valor P <sup>3</sup>	
	Intercepto	Inclinação	s <sub>y.x</sub> <sup>2</sup>		H <sub>0</sub> :β <sub>0</sub> =0	H <sub>0</sub> :β <sub>1</sub> =1
Fezes						
Autoclave	22,9±17,9	0,976±0,031	15,6	0,965	0,209	0,442
Ankom	189,6±33,3	0,776±0,057	29,0	0,833	<0,001	<0,001
AOACa	1,7±29,4	0,985±0,050	25,5	0,919	0,956	0,765
Forragens						
Autoclave	3,4±16,9	1,001±0,025	16,0	0,980	0,841	0,719
Ankom	113,7±20,1	0,865±0,029	19,0	0,961	<0,001	<0,001
AOACa	-36,7±29,7	1,044±0,044	27,9	0,944	0,225	0,320
Concentrado						
Autoclave	26,8±6,9	0,951±0,028	23,8	0,977	0,001	0,096
Ankom	125,2±25,3	0,843±0,105	90,5	0,696	<0,001	0,148
AOACa	19,6±4,9	0,944±0,020	17,3	0,988	<0,001	0,009

<sup>1</sup> Autoclave e Ankom: métodos conduzidos conforme os procedimentos descritos no método AOAC 2002.04 mas utilizando-se autoclave e extrator Ankom<sup>220</sup>®; AOACa: método AOAC 2002.04 adaptado com o uso de α-amilase de acordo com recomendações do INCT-CA. <sup>2</sup> Desvio padrão da relação entre X e Y. <sup>3</sup> Para maiores detalhes sobre os testes de hipóteses, ver equações (3) e (4).



Figural

Relação entre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) obtidos pelo método AOAC 2002.04 e por intermédio da variação baseada no uso de autoclave em amostras de forragens, concentrados e fezes.

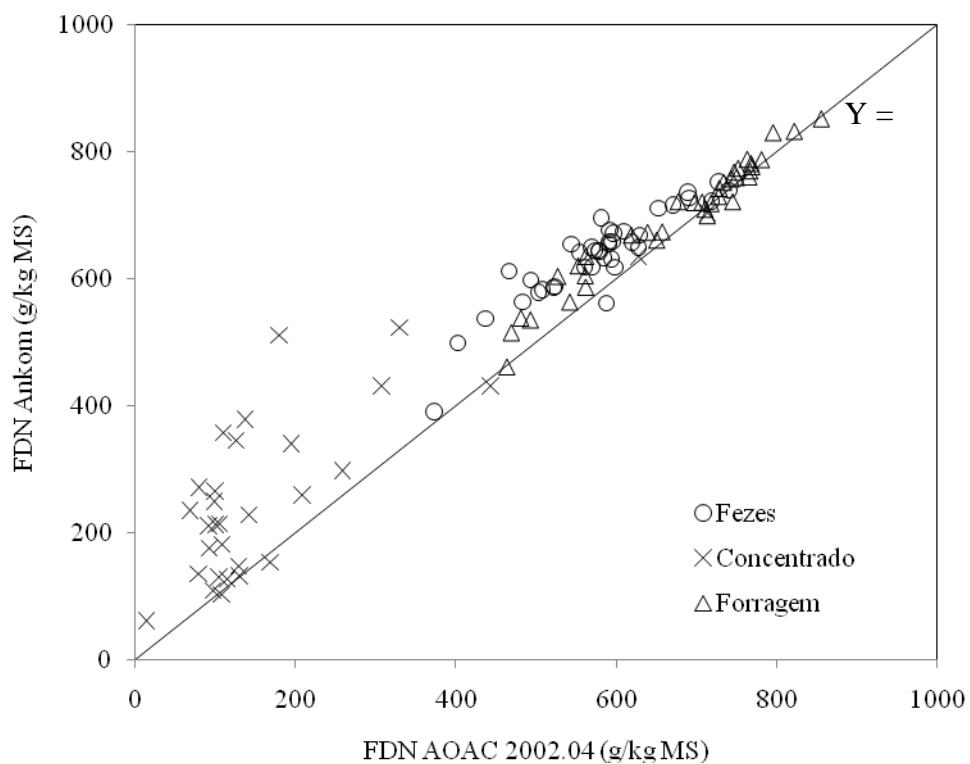


Figura2

Relação entre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) obtidos pelo método AOAC (2002.04) e por intermédio da variação baseada no sistema Ankom® em amostras de forragens, concentrados e fezes.

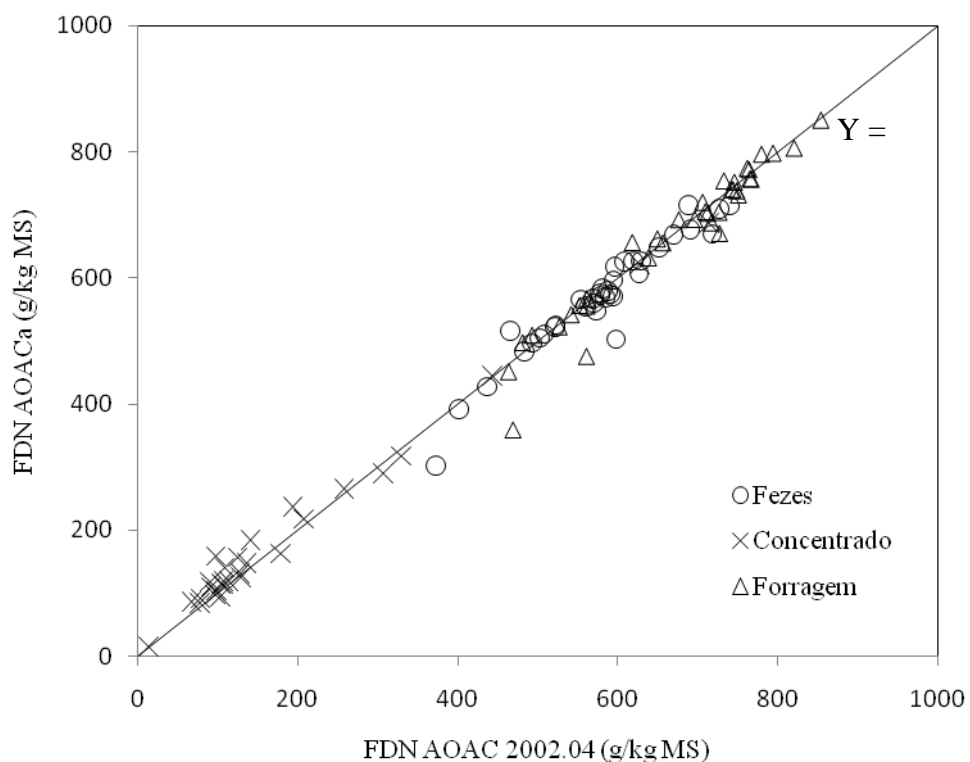


Figura 3

Relação entre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) obtidos pelo método AOAC (2002.04) e por intermédio de sua variação com a utilização de  $\alpha$ -amilase industrial(AOACa) em amostras de forragens, concentrados e fezes.

## **Avaliação de métodos de quantificação dos teores de extrato etéreo em forragens e fezes de ruminantes**

### **Resumo**

Objetivou-se comparar as estimativas da concentração de extrato etéreo (EE) obtidas pelo método de *Randall* e pelo método de alta temperatura recomendado pela *American Oil Chemist's Society* (AOCS; método Am 5-04). Foram realizados quatro experimentos utilizando amostras de forragens (n = 20) e fezes de ruminantes (n = 15). No primeiro experimento quantificou-se o teor de EE de todas as amostras utilizando-se a combinação entre os métodos de extração de *Randall* e método de alta temperatura AOCS e sacos filtrantes XT4 e cartuchos de papel de filtro qualitativo (80 g/m<sup>2</sup>) como recipientes para acondicionamento das amostras. No segundo experimento avaliou-se a perda de partículas considerando-se os dois recipientes avaliados. No terceiro experimento avaliou-se a concentração de clorofila residual no material remanescente da extração considerando-se as combinações entre método e recipiente utilizadas no primeiro experimento. No quarto experimento avaliou-se a recuperação de proteína e minerais no material submetido à extração por ambos os métodos. Em todos os experimentos o éter de petróleo foi utilizado como extrator. Em nenhum experimento foram verificadas influências (P>0,05) dos diferentes recipientes. Foi observada interação significativa (P<0,01) entre método de extração e material avaliado sobre as concentrações de EE. O desdobramento deste efeito indicou maiores estimativas (P<0,01) de concentração de EE utilizando-se o método AOCS, sendo a diferença entre métodos mais proeminente em amostras de forragens. Não foram verificadas perda de partículas com os diferentes recipientes (P>0,05). O teor de clorofila nos resíduos não foi afetado pelo método de extração em amostras fecais, mas foi

menor utilizando-se o método AOCS ( $P < 0,05$ ) em amostras de forragens. Observou-se recuperação completa ( $P > 0,05$ ) de proteína e minerais no material após extração. Os resultados indicam que o método AOCS produz maiores estimativas de concentração de EE possivelmente por propiciar maior extração de material não graxo.

**Palavras chave:** análise de alimentos, composição proximal, compostos apolares, gordura bruta

## 7. Introdução

A fração alimentar denominada de extrato etéreo (EE) possui composição heterogênea, sendo formada por lipídeos (galactolipídeos, triglicerídeos e fosfolipídeos) e por todos os demais compostos apolares que possam ser extraídos pelo solvente como: fosfatídeos, esteroides, pigmentos, vitaminas lipossolúveis, ceras, etc. Desta forma, o resíduo gravimetricamente extraído é corretamente denominado de gordura bruta em função da divergência entre o conceito analítico e o conceito bioquímico de lipídeos (Van Soest, 1994; Palmquist & Jenkins, 2003; Silva et al., 2011).

Entre os métodos gravimétricos de avaliação da concentração de EE, o método da submersão, também conhecido como *Soxtec* ou método de *Randall* tem sido, de forma mais recente, recomendado para avaliação de alimentos para animais (Thiex et al., 2003; Detmann et al., 2012). Este método se baseia na extração da fração apolar do alimento em três etapas (submersão, lavagem e secagem) e foi inicialmente proposto para reduzir o tempo de análise e aumentar a eficiência operacional em relação ao método de *Soxhlet* (Palmquist & Jenkins, 2003). A exatidão e a rusticidade deste método foram avaliadas por Thiex et al. (2003), os quais propuseram em seu estudo procedimentos que culminaram na

adoção do método de *Randall* como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).

De forma mais recente, a *American Oil Chemist's Society* (AOCS) tornou oficial método analítico para avaliação das concentrações de EE em alimentos utilizando sacos filtrantes e sistema de extração sob alta temperatura e pressão. Este método se caracteriza pela rapidez e alta capacidade operacional.

Contudo, em recente estudo, Silva et al. (2011) compararam as estimativas de concentração de EE obtidas com o método oficial proposto pela AOCS e o método de extração por gotejamento de *Goldfish* e concluíram que o método AOCS superestima a concentração de EE em amostras de fezes e forragens como possível reflexo da maior extração de material não graxo.

O EE constitui conceito definido essencialmente pelo método (Palmquist & Jenkins, 2003). Contudo, deve haver coerência entre estimativas obtidas por diferentes métodos para que comparações entre estudos possam ser realizadas com alta rusticidade. Assim, estudos devem ser conduzidos para se estabelecer o correto entendimento das entidades analíticas produzidas por diferentes métodos e classificadas de forma geral como EE.

Assim definiu-se como objetivo deste trabalho comparar as estimativas de concentração de extrato etéreo obtidas pelo método de *Randall* e pelo método de alta temperatura recomendado pela AOCS em amostras de forragens e fezes de ruminantes.

## 8. Material e Métodos

### 2.1. Localização e amostras

Foram realizados quatro experimentos no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, utilizando-se banco de amostras formado por forragens e fezes de bovinos.

Foram coletadas dez amostras de gramíneas e dez amostras de leguminosas frescas por intermédio do corte rente ao solo em canteiros localizados no Setor de Forragicultura do DZO durante o mês de março de 2013. As gramíneas utilizadas foram: *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizanta* cv. Marandu, *Brachiaria brizanta* cv. Piatã, *Brachiaria brizanta* cv. Xaraés, *Panicum maximum* cv. Tanzânia, *Panicum maximum* cv. Massai, *Panicum maximum* cv. Colonião, *Panicum maximum* cv. Mombaça e capins Tifton 68 e 85 (*Cynodon* sp.). As leguminosas avaliadas foram: estilosantes Campo Grande (*Stylosantes capitata* + *Stylosantes macrocephala*), guandu (*Cajanus cajan*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides*), centrosema (*Centrosema pubescens*), leucena (*Leucaena leucocephala*), gliricidia (*Gliricidia sepium*), puerária (*Pueraria phaseoloides*), soja perene (*Neonotonia wightii*), amendoim forrageiro (*Arachispintoi*) e estilosantes mineirão (*S. capitata* + *S. guianensis* + *S. macrocephala*).

As amostras de fezes foram coletadas em experimentos com bovinos de corte em sistema de confinamento (n=5) e a pasto (n=5) e em vacas em lactação (n=5), totalizando 15 amostras.

Todas as amostras foram submetidas à redução do teor umidade por intermédio de liofilização (método INCT-CA G-002/1; Detmann et al., 2012) e processadas em moinho de facas (1 mm). Posteriormente procedeu-se à quantificação do teor de matéria seca (MS; método INCT-CA G-003/1; Detmann et al., 2012).

## 2.2. Experimento 1 – Quantificação da concentração de extrato etéreo

Para avaliação das estimativas de concentração de EE foram utilizadas todas as amostras de forragens e fezes.

As análises foram conduzidas seguindo-se o método de *Randall* (método AOAC 2003.05; Thiexet al., 2003), com a substituição do éter dietílico por éter de petróleo (método INCT-CA G-005/1; Detmann et al., 2012), e o método de alta temperatura da AOCS (método AOCS Am 5-04; AOCS, 2009), também utilizando-se éter de petróleo. As avaliações em ambos os métodos foram conduzidas utilizando-se dois tipos de recipientes para acondicionamento das amostras: cartuchos de papel de filtro qualitativo (80 g/m<sup>2</sup>) e sacos filtrantes XT4 (Ankom®). As análises segundo os métodos de *Randall* e AOCS foram conduzidas em extratores de gordura Tecnal® TE-044-8/50e Ankom® XT15, respectivamente.

Para as avaliações segundo o método de *Randall* utilizando-se cartuchos de papel de filtro foram pesados aproximadamente 2 g de amostra seca ao ar sobre uma folha de papel de filtro qualitativo (80 g/m<sup>2</sup>), a qual foi envolvida com uma segunda folha do mesmo papel utilizada como envoltório. Para a utilização dos sacos filtrantes XT4, aproximadamente 1 g de amostra seca ao ar foi acondicionado nos sacos filtrantes, os quais foram selados por calor.

Os copos do extrator de gordura Tecnal® TE-044-8/50 foram previamente lavados, identificados, secos em estufa não ventilada (105°C/16 horas), acondicionados em dessecador e pesados.

Previamente à extração os cartuchos ou sacos filtrantes foram acondicionados em seus respectivos copos e mantidos em estufa não ventilada (105°C/2 horas) para redução do teor de umidade.

Os cartuchos ou os sacos filtrantes foram acoplados ao suporte metálico do extrator de gordura. Em sequência foram adicionados 100 mL de éter de petróleo em cada um dos copos, os quais foram acoplados ao condensador e encaixados na unidade de aquecimento.

As amostras foram mantidas submersas no solvente em ebulição durante 30 minutos. Em seguida, as mesmas foram suspensas, passando-se a realizar a extração por gotejamento durante 60 minutos considerando-se taxa de condensação do solvente de 3 a 5 gotas por segundo (Detmann et al., 2012).

Após a etapa de extração por gotejamento procedeu-se à retirada do éter por intermédio do mecanismo de reciclagem característico do equipamento até que uma camada delgada de éter (1 a 2 mm) permanecesse no fundo do copo. Após este procedimento, os copos foram mantidos em estufa não ventilada (105°C/30 minutos) para evaporação do éter residual, acondicionados em dessecador e pesados. A gordura extraída foi estimada pelo ganho de peso do copo.

Para realização das avaliações segundo o método AOCS, as amostras foram acondicionadas em cartuchos de papel de filtro qualitativo ou sacos filtrantes XT4 como descrito para o método de *Randall*. As amostras permaneceram em estufa não ventilada (105°C/ 3 horas), sendo em seguida acondicionadas em dessecador e pesadas para obtenção do peso pré-extração.

As amostras foram acondicionadas no extrator Ankom® XT15 em número de dez para aquelas acondicionadas em sacos filtrantes e seis para aquelas acondicionadas em cartuchos de papel de filtro qualitativo. A extração foi conduzida por 50 minutos sob a temperatura de 90°C. Após a extração as amostras foram retiradas do aparelho, mantidas em estufa não ventilada (105°C/30 minutos). As amostras foram condicionadas em dessecador e pesadas. A gordura extraída foi estimada pela perda de peso (AOCS, 2009).

Os teores de EE (g/kg MS) foram submetidos à análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + A_{(i)j} + M_k + R_l + GM_{ik} + GR_{il} + MR_{kl} + GMR_{ikl} + \varepsilon_{ijkl} \quad (1);$$

em que:  $\mu$  = constante geral;  $G_i$  = efeito do grupo de amostras  $i$  (forragens ou fezes; efeito fixo);  $A_{(i)j}$  = efeito da amostra  $j$  aninhada ao grupo  $i$  (efeito aleatório);  $M_k$  = efeito do método de extração  $k$  (*Randall* ou AOCS; efeito fixo);  $R_l$  = efeito do recipiente  $l$  (papel de filtro qualitativo ou saco filtrante XT4; efeito fixo);  $GM_{ik}$ ,  $GR_{il}$ ,  $MR_{kl}$  e  $GMR_{ikl}$  = interações entre os efeitos fixos; e  $\varepsilon_{ijkl}$  = erro aleatório não observável, pressuposto NID (0;  $\sigma^2$ ).

As análises foram realizadas por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.2) adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

### 2.3. Experimento 2 – Perda de partículas de amostras em função de diferentes recipientes

Para realização da avaliação da perda de partículas foram escolhidas aleatoriamente dez amostras de forragens (cinco gramíneas e cinco leguminosas) e cinco amostras de fezes. Cada amostra foi acondicionada em papel de filtro qualitativo e em saco filtrante XT4 conforme descrito no Experimento 1.

Os cartuchos de papel de filtro ou os sacos filtrantes foram acondicionados individualmente juntamente com uma barra magnética em frascos reservatórios de extratores de gordura tipo *Soxhlet* aos quais foram adicionados 500 mL de éter de petróleo. Os extratores de *Soxhlet* foram acoplados sobre placas aquecedoras (Tecnal® TE-0851) e aquecidos a 95°C. Após a temperatura de extração ser atingida, o material foi mantido sob agitação (100 rpm) por 30 minutos.

Folhas de papel de filtro quantitativo (Whatman #41;  $\varnothing = 15$  cm) foram previamente mantidas em estufa não ventilada (105°C/30 minutos), acondicionadas em dessecador e pesadas.

Após o período de extração, o conteúdo dos reservatórios foi filtrado utilizando-se os papéis de filtro previamente pesados com auxílio de funis e béqueres. Após a filtração, os papéis de filtro foram novamente secos em estufa não ventilada (105°C/30 minutos), acondicionadas em dessecador e pesados. A perda de partículas foi estimada pelo ganho de peso do papel de filtro quantitativo.

Os resultados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + A_{(i)j} + R_k + GR_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad (2);$$

em que:  $\mu$  = constante geral;  $G_i$  = efeito do grupo de amostras  $i$  (forragens ou fezes; efeito fixo);  $A_{(i)j}$  = efeito da amostra  $j$  aninhada ao grupo  $i$  (efeito aleatório);  $R_k$  = efeito do recipiente  $k$  (papel de filtro qualitativo ou saco filtrante XT4; efeito fixo);  $GR_{ik}$  = interação entre os efeitos fixos; e  $\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório não observável, pressuposto NID (0;  $\sigma^2$ ).

As análises foram realizadas por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.2) adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

#### 2.4. Experimento 3 – Avaliação da concentração residual de clorofila

Para realização da avaliação da concentração residual de clorofila foram escolhidas aleatoriamente dez amostras de forragens (cinco gramíneas e cinco leguminosas) e cinco amostras de fezes.

Alíquotas de cada amostra foram submetidas à extração por intermédio dos métodos de *Randall* e AOCS, utilizando cartuchos de papel de filtro qualitativo ou sacos filtrantes, como descrito no Experimento 1. Os resíduos desengordurados foram reservados em frascos de polietileno ao abrigo da luz.

Posteriormente, alíquotas de aproximadamente 100 mg de todos os resíduos e das amostras originais (sem extração) foram acondicionadas em cadinhos de porcelana, adicionando-se aproximadamente 50 mg de carbonato de cálcio e 5 mL de solução de acetona (800mL/L). Procedeu-se à homogeneização com bastão de vidro e posterior transferência do material para balão volumétrico de 10 mL. A transferência foi realizada utilizando-se papel de filtro quantitativo (Whatman #41). Completou-se o volume do balão com solução de acetona (800 mL/L), sendo este mantido ao abrigo da luz com o auxílio de papel alumínio.

Avaliou-se a absorvância das soluções nos comprimentos de onda de 646,8 e 663,2 nm. A absorvância “zero” do espectrofotômetro foi obtida utilizando-se solução de acetona (800mL/L).

A concentração total de clorofila na solução foi obtida segundo Lichthenthaler (1987):

$$ClorT = 7,15 \times A_{663,2} + 18,71 \times A_{646,8} \quad (3);$$

em que: ClorT = concentração total de clorofila na solução (mg/L); e  $A_{646,8}$  e  $A_{663,2}$  = absorvâncias nos respectivos comprimentos de onda.

Os teores de clorofila total nas amostras e resíduos (mg/kg MS) foram submetidos à análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + A_{(i)j} + M_k + GM_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad (4);$$

em que:  $\mu$  = constante geral;  $G_i$  = efeito do grupo de amostras i (forragens ou fezes; efeito fixo);  $A_{(i)j}$  = efeito da amostra j aninhada ao grupo i (efeito aleatório);  $M_k$  = efeito do material avaliado k (material original ou resíduos obtidos pela combinação entre os métodos de *Randall* ou AOCS e os recipientes papel de filtro qualitativo ou saco filtrante XT4; efeito fixo);  $GM_{ik}$  = interação entre os efeitos fixos; e  $\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório não observável, pressuposto NID (0;  $\sigma^2$ ).

As análises foram realizadas por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.2) adotando-se  $\alpha = 0,05$ . Utilizou-se a Diferença Mínima Significativa de Fisher como ferramenta auxiliar na comparação entre médias.

#### 2.5. Experimento 4 – Avaliação da extração de componentes proteicos e minerais

Para realização da avaliação da extração de componentes proteicos e minerais foram escolhidas aleatoriamente duas amostras de forragens (uma gramínea e uma leguminosa) e uma amostra de fezes. Cinco alíquotas de cada amostra foram submetidas à extração de gordura por intermédio do método de *Randall* utilizando cartuchos confeccionados com papel de filtro qualitativo e outras cinco alíquotas por intermédio do método AOCS utilizando sacos filtrantes Ankom® XT4. Os procedimentos foram conduzidos conforme descrito no Experimento 1.

Alíquotas dos resíduos pós-extração e do material original foram avaliadas quanto aos teores de proteína bruta (PB) e matéria mineral (MM) segundo os métodos de *Kjeldhal* e de incineração em mufla (métodos INCT-CA N-001/1 e M-001/1, respectivamente; Detmann et al., 2012).

Foram estimadas as recuperações de PB e MM em cada alíquota conforme a equação:

$$R = \frac{Mr}{Ma} \quad (5);$$

em que: R = recuperação de PB ou MM (g/g); Ma = massa de PB ou MM na amostra antes da extração (g); e Mr = massa de PB ou MM no resíduo pós-extração.

As recuperações de PB e MM (g/g) foram submetidas à análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + M_j + \varepsilon_{ij} \quad (6);$$

em que:  $\mu$  = constante geral;  $A_i$  = efeito da amostra  $i$  (efeito aleatório);  $M_j$  = efeito do método de extração  $j$  (*Randall* ou AOCS; efeito fixo); e  $\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório não observável, pressuposto NID ( $0; \sigma^2$ ).

As análises foram realizadas por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.2) adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

## **9. Resultados**

### *3.1. Experimento 1 – Quantificação da concentração de extrato etéreo*

Observou-se interação significativa ( $P < 0,01$ ) entre método de extração e material avaliado sobre as concentrações de EE (Tabela 1). O desdobramento deste efeito permitiu evidenciar que maiores concentrações de EE foram obtidas com o método AOCS ( $P < 0,01$ ) tanto para forragens como para fezes. Contudo, a diferença entre os métodos foi mais proeminente para amostras de forragens (Tabela 2).

Ressalta-se que não foram verificados efeitos ( $P > 0,05$ ) relativos aos recipientes de extração ou a qualquer interação na qual o efeito de recipientes fez parte (Tabela 1).

### *3.2. Experimento 2 – Perda de partículas de amostras em função de diferentes recipientes*

Não foram verificados efeitos de material avaliado, recipiente ou sua interação ( $P > 0,05$ ) sobre a perda de partículas. A avaliação das médias em função dos recipientes utilizados indicou que em nenhum destes a perda de partículas foi considerada significativa ( $P > 0,05$ ; Tabela 3).

### 3.3. Experimento 3 – Avaliação da concentração residual de clorofila

Verificou-se efeito de interação ( $P < 0,05$ ) entre material avaliado e método de extração sobre as concentrações de clorofila. O desmembramento deste efeito permitiu evidenciar diferenças ( $P < 0,01$ ) entre procedimentos de extração somente para amostras de forragens (Tabela 4). Neste caso, a comparação entre médias indicou, apesar de pequena sobreposição, que o método AOAC conferiu menor concentração de clorofila residual ( $P < 0,05$ ) em comparação ao método de *Randall*, sendo as concentrações obtidas por ambos os métodos inferiores ( $P < 0,05$ ) àquelas obtidas nas forragens não submetidas à extração. Não foram observadas influências ( $P > 0,05$ ) de recipientes dentro de cada método de extração (Tabela 4).

### 3.4. Experimento 4 – Avaliação da extração de componentes proteicos e minerais

Foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) quanto à recuperação da PB e da MM contidas nas amostras em função dos métodos de extração, sendo a recuperação de PB superior ( $P < 0,05$ ) para o método AOCS, ao passo que a recuperação de MM foi superior ( $P < 0,05$ ) com o método de *Randall*. Apesar destas diferenças, nenhuma das estimativas de recuperação foi considerada diferente do valor paramétrico 1 ( $P > 0,05$ ), indicando recuperação completa destes componentes independentemente do método de extração (Tabela 5).

## 4. Discussão

A utilização do método AOCS produziu estimativas mais elevadas da concentração de EE tanto em forragens como em fezes em comparação ao método de *Randall* (Tabela 2). Este resultados corroboram aqueles obtidos por Silva et al. (2011), que comparam o

método AOCS ao método de *Goldfish*. Cabe ressaltar que, a despeito do método de *Randall* ter sido desenvolvido para substituição do método de *Soxhlet* (Palmquist & Jenkins, 2003), o mesmo se mostra mais similar em termos operacionais ao método de *Goldfish*.

As principais diferenças entre o método AOCS e os métodos de extração de *Randall* e *Goldfish* são: a utilização de ambiente pressurizado e o uso de sacos filtrantes XT4. No entanto, de acordo com os dados obtidos neste trabalho, a utilização dos sacos filtrante XT4 não exerce influência sobre a extração, uma vez que os resultados obtidos com sacos filtrantes foram similares aos obtidos com o uso de papel de filtro qualitativo em todas as comparações realizadas (Tabelas 1, 3 e 4).

Considerando a maior extração de material solúvel em éter com a utilização do método AOCS, os Experimentos 2, 3 e 4 foram conduzidos com o objetivo de entender a diferença entre os métodos.

No Experimento 2 buscou-se avaliar a possibilidade de perda de partículas sólidas a partir do uso dos sacos XT4, o que poderia contribuir para as maiores estimativas de concentração de EE. Contudo, como previamente ressaltado, não foram percebidas diferenças entre recipientes, uma vez que ambos propiciaram perda de partículas não significativas (Tabela 3).

O EE total de uma amostra pode ser subdividido em duas frações. A primeira, denominada de EE graxo, é composta da fração lipídica propriamente dita (triglicerídeos, galactolipídios e fosfolipídios), a qual apresenta interesse nutricional. A segunda fração, denominada de EE não graxo, é composta pelos componentes não polares das amostras, incluindo pigmentos vegetais, ceras e óleos essenciais (Sukhija & Palmquist, 1988; Van Soest, 1994). A quantidade de EE não graxo define a diferença entre o conceito analítico (EE) e bioquímico (lipídeos) da fração gordurosa dos alimentos (Silva et al., 2011).

As avaliações conduzidas no Experimento 3 se basearam no fato de a clorofila ser componente do EE não graxo (Van Soest, 1994). Logo, uma maior extração de clorofila pode ser entendida como um indicador da maior capacidade do método de extrair material apolar não graxo. A partir dos resultados aqui obtidos, infere-se que o método AOCS promove maior extração de material não graxo em amostras de forragens, haja vista a menor concentração de clorofila no material submetido à extração (Tabela 4). Resultados similares foram obtidos por Silva et al. (2011). Isto poderia justificar as diferenças entre métodos quanto ao teor de EE total (Tabela 2). Contudo, não houve diferença quanto ao teor de clorofila para amostras de fezes (Tabela 2).

No desdobramento do efeito de interação entre método de extração e material avaliado, percebeu-se que a diferença entre método é mais proeminente para amostras de forragens (Tabela 2). Assim, considerando-se que há uma menor diferença para amostras fecais e que não houve alteração na concentração de clorofila nas fezes, possivelmente pode ter havido extração de material não graxo com características diferentes dos pigmentos, o que justificaria a diferença entre métodos nas amostras de fezes e complementaria a diferença entre métodos para as amostras de forragens.

Segundo Van Soest (1994), alguns componentes do EE não graxo podem ser absorvidos e posteriormente excretados na urina, incluindo óleos essenciais (classificação dada aos compostos voláteis em vapor, como ésteres, terpenos, aldeídos e cetonas) e fenóis de baixo peso molecular. Assim, por serem absorvidos, os mesmos não comporiam o EE fecal, o que parece auxiliar na explicação da menor diferença entre métodos na avaliação das amostras de fezes.

No entanto, as comparações entre materiais neste trabalho devem ser realizadas com cautela, haja vista que as amostras fecais não correspondem àquelas que seriam obtidas em dietas formadas predominantemente pelas forragens aqui avaliadas. Desta

forma, a composição total da fração não graxa do EE obtido pelos métodos AOCS e *Randall* ainda permanece indefinida. Contudo, independentemente das limitações, os resultados obtidos indicam maior extração de material não graxo com a utilização do método AOCS.

Para auxiliar na discussão, estabeleceu-se comparação descritiva entre os teores de EE obtidos por ambos os métodos de extração e os valores constantes na base de dados CQBAL (Tabela 6). Das 19 comparações possíveis, 15 indicaram valores mais próximos daqueles constantes na base CQBAL quando utilizado o método de *Randall*, correspondendo a 79% das amostras de forragens (Tabela 6). No entanto, para três amostras (Tifton 68, estilosantes mineirão e leucena) as concentrações de EE constantes no CQBAL foram oriundas de baixo número de observações (de 1 a 3 observações) e estão claramente superestimados. Assim, considerando-se este comportamento, a similaridade entre as concentrações de EE obtidas pelo método de *Randall* e a base CQBAL seriam ainda maiores.

Substâncias solúveis em água (e.g., açúcares, aminoácidos, sais) podem, em alguns casos, serem extraídas em conjunto com o material apolar (Pomeranz & Meloan, 1978; Palmquist & Jenquins, 2003), o que poderia incrementar a fração não graxa do EE. Assim, o Experimento 4 foi conduzido visando à avaliação da possível extração de material polar por intermédio da análise da recuperação dos compostos nitrogenados e minerais. Contudo, devido à recuperação completa de ambos os grupos de compostos (Tabela 5), não se evidenciou extração de material polar pelos métodos AOCS e de *Randall*.

## 5. Conclusões

A quantificação dos teores de extrato etéreo em amostras de forragens e fezes por intermédio do método AOCS Am 5-04 propicia estimativas superiores àquelas obtidas pelo método de *Randall*, possivelmente pela maior extração de material apolar não graxo. Não existem influências sobre as estimativas de concentração de extrato etéreo relativas à utilização de sacos filtrantes XT4® e papel de filtro qualitativo (80 g/m<sup>2</sup>).

## 6. Referências

- Detmann, E.; Souza, M.A.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Berchielli, T.T.; Saliba, E.O.S.; Cabral, L.S.; Pina, D.S.; Ladeira, M.M.; Azevedo, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- American Oil Chemists' Society – AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 6 ed. Denver: AOCS, 2009. 1200p.
- Lichthenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. (Eds.) **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1987. p.350-382.
- Palmquist, D.L.; Jenkins, T.C. Challenges with fats and fatty acid methods. **Journal of Animal Science**, v.81, p.3250-3254, 2003.
- Pomeranz, Y.; Meloan, C.E. **Food analysis: theory and practice**. Rev. ed. Westport: AVI, 1978. 709p.
- Silva, P.T.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Detmann, K.S.C.; Barros, L.V.; Martins, S.C.V.; Morais, L.E.; Costa, V.A.C. Evaluation of total and non-fatty ether extract in feeds and cattle feces using two analytical methods. **Animal Feed Science and Technology**, v.163, p.111-117, 2011.
- Thiex, N.J.; Anderson, S.; Gildemeister, B. Crude fat, diethyl ether extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): collaborative Study **Journal of AOAC International**, v.86, p.888-898, 2003.

Van Soest, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

Tabela 1

Teores de extrato etéreo (mg/kg de matéria seca) em amostras de forragens e fezes em função do método de extração e do recipiente utilizado para o acondicionamento das amostras (Experimento 1)

Recipiente <sup>1</sup>	Método de Extração	
	<i>Randall</i>	AOCS
Forragens		
PFQ	21,0±3,9	36,2±3,9
XT4	20,8±3,9	33,1±3,9
Fezes		
PFQ	26,4±4,4	30,1±4,4
XT4	25,9±4,4	33,4±4,4
Valor P		
Método de Extração (ME)	<0,001	
Recipiente (R)	0,942	
Material (M)	0,793	
ME x R	0,708	
ME x M	0,003	
R x M	0,162	
ME x R x M	0,133	

<sup>1</sup> PFQ = papel de filtro qualitativo; XT4 = sacos filtrantes XT4.

Tabela 2

Estudo do efeito de interação entre material e método de extração sobre os teores de extrato etéreo (g/kg de matéria seca) (Experimento 1)

Método	Material		Valor P <sup>2</sup>
	Forragens	Fezes	
<i>Randall</i>	20,9±3,7	26,2±4,2	0,352
AOCS	34,7±3,7	32,3±4,2	0,671
Valor P <sup>1</sup>	<0,001	0,001	---

<sup>1</sup> Níveis descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado à avaliação de diferenças quanto aos métodos de extração dentro de cada material. <sup>2</sup> Níveis descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado à avaliação de diferenças quanto aos materiais dentro de cada método de extração.

Tabela 3

Perdas de partículas de amostras de forragens e fezes em função do recipiente utilizado para o acondicionamento das amostras (Experimento 2)

Recipiente	Perda de partículas (g)	Valor P <sup>2</sup>
PFQ	0,0023±0,0047	0,621
XT4	0,0024±0,0047	0,613

<sup>1</sup> PFQ = papel de filtro qualitativo; XT4 = sacos filtrantes XT4. <sup>2</sup> H<sub>0</sub>:  $\mu = 0$ .

Tabela 4

Concentração de clorofila total (mg/kg) em amostras de forragens e fezes e nos resíduos das amostras após extração por diferentes métodos (Experimento 3)

Método <sup>1</sup>	Material	
	Forragens <sup>2</sup>	Fezes
Controle	1554±123a	104±174
R + PFQ	749±129b	113±193
R + XT4	610±123bc	61±175
A + PFQ	466±123c	49±193
A + XT4	402±129c	54±175
Valor P <sup>3</sup>	<0,001	0,997

<sup>1</sup> Controle = amostra original, sem extração; R = extração pelo método de *Randall*; A = extração pelo método AOCS; PFQ = papel de filtro qualitativo; XT4 = sacos filtrantes XT4. <sup>2</sup> Médias na coluna seguidas por letras diferentes, são diferentes (P<0,05). <sup>3</sup> Níveis descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado à avaliação de diferenças quanto à concentração de clorofila dentro de cada material.

Tabela 5

Recuperação média (g/g) de proteína bruta e matéria mineral em função do método de extração (Experimento 4)

Método	Item <sup>1</sup>	
	Proteína bruta	Matéria mineral
AOCS	1,017±0,001 (0,256)	0,992±0,003 (0,762)
<i>Randall</i>	1,013±0,001 (0,369)	1,002±0,003 (0,936)
Valor P <sup>2</sup>	0,037	0,046

<sup>1</sup> Os valores entre parênteses correspondem aos níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados à  $H_0: \mu = 1$ . <sup>2</sup> Níveis descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado à avaliação de diferenças entre métodos de extração.

Tabela 6

Comparação descritiva entre as concentrações de extrato etéreo (g/kg MS) obtidas utilizando-se diferentes métodos de extração e os valores disponíveis na base de dados CQBAL

Forragem	Método de extração <sup>1</sup>		Base CQBAL <sup>2</sup>
	AOCS+XT4	Randall+PFQ	
<i>B. decumbens</i>	6,6	<b>16,5</b>	18,3
Capim Marandu	9,8	<b>14,1</b>	18,2
Capim Piatã	26,3	<b>11,1</b>	17,4
Capim Xaraés	16,2	<b>17,8</b>	23,8
Capim Tanzânia	32,6	<b>19,4</b>	17,0
Capim Massai	9,9	<b>16,4</b>	16,0
Capim Colonião	6,7	<b>13,3</b>	21,0
Capim Mombaça	9,2	<b>10,5</b>	12,1
Tifton 68	<b>18,3</b>	11,7	29,1
Tifton 85	32,6	<b>16,7</b>	20,0
Estilosantes Campo Grande	28,5	<b>22,4</b>	13,1
Estilosantes Mineirão	<b>58,4</b>	36,6	75,0
Guandu	61,1	<b>51,8</b>	35,3
Leucena	<b>41,9</b>	18,1	38,4
Gliricidia	<b>50,8</b>	25,0	53,6
Puerária	45,1	<b>19,1</b>	19,6
Centrosema	57,5	<b>26,2</b>	21,8
Soja perene	65,8	<b>21,3</b>	36,5
Amendoim forrageiro	45,6	<b>14,7</b>	19,2
Calopogônio	50,7	34,0	--- <sup>3</sup>

<sup>1</sup> PFQ = papel de filtro qualitativo; XT4 = sacos filtrantes XT4. Valores ressaltados em negrito indicam maior proximidade ao valor da base de dados CQBAL. <sup>2</sup> <http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/index.php>; acessado em 11 de dezembro de 2013. <sup>3</sup> Forragem não disponível na base de dados CQBAL.