

DAIANY IRIS GOMES

ESTUDO SOBRE VARIAÇÕES EM MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS
FIBROSOS EM ALIMENTOS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

G633e
2012

Gomes, Daiany Iris, 1985-

Estudo sobre variações em métodos de análise de
compostos fibrosos em alimentos / Daiany Iris Gomes.
– Viçosa, MG, 2012.
xi, 59f. : il. ; 29cm.

Orientador: Edenio Detmann.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ruminante - Nutrição. 2. Fibras na nutrição animal.
3. Alimentos - Análise. 4. Nutrição animal. 5. Extração por
Solventes. 6. Diastase. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 636.20852

DAIANY IRIS GOMES

ESTUDO SOBRE VARIAÇÕES EM MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS
FIBROSOS EM ALIMENTOS

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

APROVADA: 13 de julho de 2012.

Mirton José Frota Morenz

Jailton da Costa Carneiro

Sebastião de Campos Valadares Filho
(Coorientador)

Augusto Cezar de Queiroz
(Coorientador)

Edenio Detmann
(Orientador)

Aos meus pais, **José Antônio Gomes e Aida de Almeida Gomes**, porto seguro, cumplicidade, incentivo, compreensão e confiança.

Aos meus queridos irmãos, **Kácia e Rodrigo**, os quais, com atitudes diferentes, sempre demonstraram suas torcidas por mim.

Ao **Rafael Mezzomo**, companheirismo, cumplicidade, dedicação e amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por tornar possível a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

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

Ao Luis Francisco Flores da empresa LNF Latino Americana pela doação das enzimas utilizadas neste estudo.

Ao Professor Edenio Detmann, pela paciência, sabedoria e, acima de tudo, por sua compreensão, confiança e generosidade durante as etapas de realização deste trabalho.

Ao Professor Augusto Cezar de Queiroz, pela atenção e carinho.

Aos Professores Sebastião Campos Valadares Filho e Mário Fonseca Paulino, pelo conhecimento transmitido.

À Professora Maria Ignez Leão, pelo carinho e atenção, assim como, pela colaboração na cirurgia dos animais.

Aos pesquisadores Mirton José Frota Morenz e Jailton da Costa Carneiro, por disponibilizarem seu tempo e cooperarem com este trabalho.

Aos amigos e parceiros de todas as horas Luana, Erick e Claudinha Braga, pelo carinho e imensa ajuda prestada.

Ao Alexandre Ribeiro Lopes e Wiliam Santiago dos Reis, pelos momentos de descontração e colaboração para realização dos trabalhos.

A Claudinha Sampaio, pela cordialidade e consideração, o que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Rafael Mezzomo, pelo carinho, atenção e imensa colaboração durante todas as fases de realização deste trabalho.

Aos amigos Kaliandra e Rennan, considero-os membros da minha família. Obrigada por serem minhas âncoras em todos os momentos, sempre torcendo e incentivando as decisões no âmbito profissional.

Aos amigos Livia, Thaianne, Marcio, Isabela, Ivanna, João Paulo, Cíntia, Nízio, Vanessa, Mari, Mateus, Taty e Gustavo (“Pato”), pelos momentos de descontração, carinho e “favores”.

À Natália, Carolina, Anelisa (Isa), por todos os momentos de convivência e por serem tão especiais na minha vida.

Aos funcionários do Laboratório de Animais, principalmente Pum e Joécio, que foram muito importantes na condução dos experimentos.

À Deus e Nossa Senhora, por mais essa conquista!

BIOGRAFIA

DAIANY IRIS GOMES, filha de José Antônio Gomes e Aida de Almeida Gomes, nasceu em Unai, Minas Gerais, em 29 de novembro de 1985.

Em março de 2004 ingressou na Universidade Federal Rural da Amazônia, no curso de Zootecnia, graduando-se em julho de 2008.

Em agosto de 2008 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 23 de fevereiro de 2010.

Em março de 2010 iniciou o curso de doutorado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, desenvolvendo estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de tese em 13 de julho de 2012.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
Avaliação laboratorial de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas sob diferentes ambientes físicos	4
<i>Abstract</i>	9
<i>Referências</i>	10
Evaluation of sodium sulfite and protein correction in analyses of fibrous compounds in tropical forages	11
<i>Introduction</i>	12
<i>Material and Methods</i>	13
<i>Results</i>	16
<i>Discussion</i>	17
<i>Conclusion</i>	23
<i>References</i>	23
Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro em amostras com alto teor de amido	26
<i>Introdução</i>	27
<i>Material e Métodos</i>	29
<i>Resultados</i>	33
<i>Discussão</i>	35
<i>Conclusão</i>	44
<i>Referências</i>	44
Variabilidade entre animais em procedimento <i>in situ</i> para estimação da fração indegradável da fibra de alimentos volumosos	46
<i>Introdução</i>	47
<i>Material e Métodos</i>	48
<i>Resultados e Discussão</i>	53
<i>Conclusão</i>	58
<i>Referências</i>	58

RESUMO

GOMES, Daiany Iris, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Estudo sobre variações em métodos de análise de compostos fibrosos em alimentos**. Orientador: Edenio Detmann. Coorientadores: Augusto César de Queiroz e Sebastião de Campos Valadares Filho.

A presente tese foi elaborada com base quatro artigos científicos. No primeiro artigo objetivou-se avaliar os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) em alimentos volumosos e concentrados e em fezes bovinas utilizando-se sacos filtrantes sob dois diferentes ambientes físicos de extração: pressurizado e não pressurizado. Vinte amostras de cada material foram utilizadas. Os conteúdos obtidos em diferentes ambientes foram comparados por meio de regressão linear. Para todos os materiais avaliados, foram observadas diferenças entre ambientes de extração, sendo as maiores estimativas de FDN e FDA obtidas em ambiente não pressurizado. O uso de ambientes não pressurizados mostra-se incompatível com a avaliação dos teores de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas utilizando-se sacos filtrantes. Portanto, a utilização de ambiente pressurizado é recomendada para evitar acúmulo de gás nos sacos, os quais podem comprometer a ação detergente. No segundo artigo objetivou-se avaliar o conteúdo de compostos fibrosos em gramíneas e leguminosas de acordo com a utilização de sulfito de sódio na solução de detergente neutro ou utilizando procedimento para a correção da proteína contaminante. Amostras de dez gramíneas e dez leguminosas foram utilizadas. Os teores de FDN foram reduzidos com a utilização de sulfito de sódio, com maiores reduções em leguminosas. O sulfito de sódio reduziu os teores de FDA em ambos os grupos de forrageiras. Os teores de proteína insolúvel em detergente neutro, proteína insolúvel em detergente ácido e lignina em leguminosas foram reduzidos com uso de sulfito de sódio, mas nenhum efeito foi observado em gramíneas no que diz respeito para estas variáveis. A diminuição do conteúdo de fibra em leguminosas poderia ser explicada pela solubilização de lignina e redução dos compostos nitrogenados insolúveis. No entanto, a redução da fibra em gramíneas não pode ser unicamente explicada pela diminuição da proteína contaminante e/ou solubilização da lignina, ocorrendo, provavelmente, perda de outros compostos fibrosos. A utilização de sulfito de sódio compromete a acurácia das estimativas dos teores dos compostos fibrosos em forragens tropicais. A precisão das estimativas não foi relevantemente ampliada ao se utilizar sulfito de sódio. A correção dos compostos fibrosos insolúveis para a proteína é sugerida, em comparação ao uso de sulfito de sódio, pois não acarreta modificações na solução de detergente neutro ou promove a solubilização indesejável de compostos fibrosos. No terceiro

artigo foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar o uso de enzimas industriais na avaliação da FDN em materiais rico em amido. No primeiro experimento verificou-se a exatidão das estimativas dos teores de FDN obtidas com a utilização de diferentes enzimas industriais (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) em diferentes volumes (50, 100, 250 ou 500 μL /amostra). Foram produzidas amostras contendo 0, 100, 300, 500 e 1000 g de amido/kg de matéria seca, utilizando celulose purificada como padrão analítico para aferição dos teores de FDN. Foram avaliados quatro repetições para cada combinação de tipo e volume de enzima e concentração de amido, totalizando 240 avaliações. No segundo experimento foram utilizadas amostras de milho e sorgo como matrizes amiláceas. Foram avaliados os três tipos e os quatro volumes de enzimas utilizados no primeiro experimento sobre cada matriz. Adicionalmente, foram avaliadas alíquotas sem a utilização de enzimas. Foram avaliados quatro repetições para cada combinação, totalizando 104 avaliações. Para amostras simuladas com concentração de amido menor ou igual a 300 g/kg não foram verificados vícios significativos sobre a recuperação da FDN, não havendo diferenças entre enzimas. Houve redução mais acentuada do teor de FDN por volume de enzima na amostra de milho em comparação ao sorgo. Para a avaliação dos teores de FDN recomenda-se o uso das enzimas α -amilases Termamyl 2X e Liquozyme 2.2X com atividades de 240 e 300 KNU/g, respectivamente, em volumes de 250 μL para amostras de massa variando de 0,7 a 1,0 g. No quarto artigo objetivou-se avaliar a variabilidade entre animais sobre o tempo crítico necessário para estimação da fração indegradável da fibra em procedimento de incubação *in situ* em bovinos. Para obtenção do perfil de degradação da fibra insolúvel foram utilizados cinco bovinos fistulados no rúmen com peso corporal médio de 350 kg. Os animais foram alimentados com dieta padrão com relação volumoso:concentrado de 80:20, com base na matéria seca. Os animais foram adaptados à dieta e às condições experimentais por 12 dias previamente à incubação. Foram avaliadas amostras de cana-de-açúcar *in natura*, feno de capim-braquiária, silagem de milho e capim-elefante *in natura*. As amostras processadas foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®). Os sacos foram incubados no rúmen dos animais utilizando-se os seguintes tempos: 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Em cada tempo foi incubado um saco de cada amostra em cada animal, totalizando 350 avaliações. Não foram verificadas variações significativas entre animais quanto à taxa fracional de degradação da FDN e da FDA para a silagem de milho, feno de capim-braquiária e para a cana-de-açúcar. Contudo, variabilidade significativa foi verificada sobre a amostra de capim-elefante *in natura*. Os resultados deste estudo parecem sugerir que a variabilidade entre animais quanto à taxa de degradação de

componentes fibrosos é significativa. Contudo, devido ao tamanho limitado da amostra utilizada ($n=5$), sugere-se a condução de novos estudos para confirmação desta hipótese e, em caso afirmativo, para a definição de estratégias experimentais para obtenção da concentração de componentes indegradáveis em alimentos de forma exata e precisa.

ABSTRACT

GOMES, Daiany Iris, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Study on variations in methods for analysis of fibrous compounds in feeds.** Adviser: Edenio Detmann. Co-Advisers: Augusto César de Queiroz and Sebastião de Campos Valadares Filho.

This thesis consists of four different scientific papers. The first one was carried out to evaluate the neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) contents in concentrates, forages and cattle feces using filter bags under pressured or non-pressured physical environments. Twenty samples of each material were used. The contents obtained under different environment were compared using a linear regression analysis. The NDF and ADF estimates were found different between physical environments for all materials ($P < 0.01$) being the higher estimates obtained under non pressured environment. The utilization of pressured environment is recommended to avoid gas accumulation in the bags, which may compromise the detergent action. In the second paper the objective was to evaluate the contents of fibrous compounds in tropical grasses and legumes according to utilization of sodium sulfite in the neutral detergent solution or using a procedure for contaminant protein correction. Samples of ten grasses and ten legumes were used. The contents of neutral detergent fiber were decreased when sodium sulfite was used; however, more prominent reductions were verified in legumes. Sodium sulfite decreased the acid detergent fiber contents in both forage groups. The contents of neutral and acid detergent insoluble protein and lignin were reduced by sodium sulfite in legumes but no effect was observed in grasses with regard these variables. The decrease in fiber contents in legumes could be explained by the solubilization of lignin and decrease in insoluble nitrogen. However, the decreases in fiber in grasses could not be solely explained by the decrease in contaminant protein and solubilization of lignin, and loss of other fibrous compounds probably occurred. The utilization of sodium sulfite compromises the accuracy of the estimates of fibrous compounds contents in tropical forages. The precision of the estimates were not relevantly increased by sodium sulfite. The correction of insoluble fibrous compounds for protein is suggested instead of using sodium sulfite because there are no modifications on neutral detergent solution or undesirable solubilization of fibrous compounds. The third paper was based on two experiments that were performed to evaluate the utilization of industrial enzymes in the evaluation of NDF contents in high-starch materials. In the first experiment, it was verified the accuracy of estimates of NDF obtained with the utilization of three industrial enzymes (Termamyl 2X, 2.2X and Liquozyme Supra Amylase AG 300L) at different volumes (50, 100, 250 or 500 $\mu\text{L}/\text{sample}$). Samples were simulated to contain 0, 100, 300, 500 and 1000 g

of starch/kg dry matter, using purified cellulose as analytical standard of NDF and purified starch. It were evaluated four replications for each combination of type and amount of enzyme and starch concentration, totalizing 240 evaluations. In the second experiment, samples of corn grain and sorghum grain were used as high-starch organic matrixes. One were evaluated the enzymes and volumes used in the first experiment on each feed matrix. In addition, aliquots were evaluated without the use of enzymes. It were evaluated four replications for each combination, totalizing 104 aliquots. There was no significant bias of NDF recovery for simulated samples containing starch up to 300 g/kg. Considering those samples, none difference among enzymes was observed. It was observed a more intense decrease in NDF content according to each enzyme unit added in corn when compared to sorghum. Considering NDF evaluation in samples with mass of 0.7 to 1.0 g, it can be recommended the utilization of 250 μ L the α -amylases Termamyl and 2X Liquozyme 2.2X with activities of 240 and 300 KNU/g, respectively. In the fourth paper, it was evaluated the variability among animals on the critical time needed to estimate the undegradable fraction of fiber using in situ incubation procedures in cattle. Five animals fitted with ruminal cannulae and averaging 350 kg of body weight were used. The animals were fed a basal diet with a 80:20 forage to concentrate ratio. The diet consisted of fresh elephant grass and commercial concentrate. Animals were adapted to the diet and experimental conditions for 12 days prior to incubation. Samples of fresh sugarcane, signal grass hay, corn silage and elephant grass. The samples were put in F57 bags (Ankom®). The bags were incubated in the rumen of the animals using the following times: 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, and 312 hours. It was considered one bag of each sample for each animal, totalizing 300 bags. There was no significant difference among animals with regard fractional degradation rate of NDF and ADF of corn silage, signal grass hay and sugarcane. However, significant variability among animals was observed for fresh elephant grass. The results of this study seem to suggest that the variability among animals concerning degradation rate of fibrous compounds could be significant. Nevertheless, due to the limited sample size used (n=5), further studies are suggested looking for confirmation of this hypothesis, and if so, define experimental strategies for obtaining the content of undegradable compounds with accuracy and precision.

INTRODUÇÃO GERAL

A quantificação do valor nutritivo dos alimentos para ruminantes envolve estudos que avaliam, principalmente, a fração fibrosa dos mesmos, a qual tem importância fundamental, pois fornece quantidade significativa de energia a baixo custo. Esta, por apresentar variabilidade naturalmente superior aos demais componentes químicos, deve ocupar posição central na avaliação de disponibilidade de energia, principalmente em condições brasileiras, em que os recursos nutricionais, em sua maioria, são representados pelas gramíneas tropicais (Detmann et al., 2010).

O conhecimento exato dos teores dos componentes fibrosos nos alimentos permite adequada formulação das dietas, uma vez que estes podem influenciar diferentes características das mesmas, especialmente, por disponibilizar energia e proteína aos animais, assim como por provocar efeito de enchimento ruminal (Detmann et al., 2008). Neste contexto, os equívocos cometidos nas análises químicas ou biológicas podem comprometer as inferências com base em dietas a partir de composições erradas (Van Soest et al., 1991).

Em análise de alimentos os conceitos de exatidão e precisão devem ser seguidos criteriosamente. Além disso, estes devem estar associados à rusticidade e à aplicabilidade do método em questão. Os conceitos de fibra aplicados à nutrição animal são essencialmente definidos pelo método analítico. Portanto, variações nos procedimentos analíticos podem produzir resultados que diferem da proposição original. Como consequência, isso pode comprometer a comparação dos resultados obtidos em diferentes condições experimentais e produtivas (Hall, 2007; Detmann, 2010).

O método denominado “sistema detergente” aplicado para quantificação dos teores de compostos fibrosos insolúveis foi desenvolvido por P.J. Van Soest na década de 1960. Desde então, diversas modificações do método original foram estudadas e adotadas. As alterações contemplaram uso de soluções de ureia, no intuito de promover a remoção do amido por meio

de diálise (Van Soest et al., 1991); adição de sulfito de sódio para retirada da contaminação proteica das amostras (Ferreira & Mertens, 2007); uso de α -amilase adicionada ao detergente dividida em duas etapas no processo de extração (Undersander et al., 1993), alterações nas condições físicas e instrumentais de análise, entre outras.

Neste contexto, considerando o conceito analítico de fibra, as alterações adicionadas sobre o método original devem produzir resultados acurados, ou sua aplicação pode incidir em erros. Algumas das modificações sugeridas podem produzir resultados inconsistentes sobre as estimativas dos compostos fibrosos, como por exemplo, a recomendação do uso de sulfito de sódio, que apresenta posições controversas na literatura (Mascarenhas-Ferreira et al., 1983; Van soest et al., 1991; Mertens, 2002).

De maneira complementar às avaliações químicas dos alimentos, as avaliações biológicas, assumem importância central na avaliação nutricional de alimentos e dietas. O perfil de degradação da fibra insolúvel *in situ* permite a estimação das frações potencialmente degradável e indegradável, as quais são determinadas pelas características do alimento, e da taxa de degradação da fração potencialmente degradável, a qual pode ser influenciada por outros fatores importantes para o processo de degradação (Detmann et al., 2008), como o ambiente ruminal de cada animal, que pode ser favorecido por características específicas do hospedeiro (Weimer et al., 2010).

Neste contexto, estudos devem ser desenvolvidos no intuito de elucidar problemas analíticos, com o objetivo de promover melhorias nas mensurações laboratoriais na tentativa de produzir resultados acurados dos teores e características adicionais dos compostos fibrosos.

Diante do exposto, definiu-se como objetivo neste estudo estudar algumas variações em métodos de análise de compostos fibrosos em alimentos e suas implicações sobre a exatidão e sobre a coerência dos resultados obtidos a partir da aplicação dessas variações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.S.; QUEIROZ, A.C. et al. (Eds.) **Novilhas leiteiras**. Fortaleza: Graphiti, 2010. p.253-302.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2010. p.191-240.
- FERREIRA, G.; MERTENS, D.R. Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, p.335-340, 2007.
- HALL, M.B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.359-367, 2007 (Suplemento).
- 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 beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- UNDERSANDER, D.; MERTENS, D.R.; THIEX, N. **Forage analyses procedures**. Omaha: National Forage Testing Association, 1993. 139p.
- 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.
- WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MANTOVANI, H.C. et al. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5902-5912, 2010.

Comunicação

[*Communication*]

Avaliação laboratorial de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas sob diferentes ambientes físicos¹

[*Laboratorial evaluation of fibrous compounds in feeds and cattle feces under different physical environments*]

A partir do surgimento do sistema Ankom® para análises de fibras, novas perspectivas foram dadas ao uso de tecidos (sacos filtrantes) na avaliação de alimentos, incorporando-os em análises laboratoriais voltadas à estimativa do teor de compostos fibrosos insolúveis, como a fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA). Este sistema tem se mostrado vantajoso por ter menor custo, ser menos laborioso (Cherney, 2000) e não apresentar diferenças em comparação ao sistema convencional com o uso de vidrarias (Vogel et al., 1999).

No entanto, diferentes equipamentos encontram-se disponíveis para realização de análises de componentes fibrosos, os quais são diferenciados, principalmente, no tocante ao ambiente físico para condução dos procedimentos de extração, sendo estes pressurizados ou não pressurizados. Considerando-se situação hipotética na qual são mantidas fixas as condições de amostra, recipiente (saco filtrante) e de reagentes químicos, alterações no ambiente físico podem influenciar a eficiência de extração dos compostos não fibrosos. Contudo, não foram encontradas referências na literatura consultada a respeito da influência de tal variação sobre os teores de compostos fibrosos insolúveis em alimentos e fezes bovinas.

Assim, definiu-se como objetivo avaliar os teores de FDN e FDA em alimentos volumosos e concentrados e em fezes bovinas utilizando-se sacos filtrantes sob dois diferentes ambientes físicos de extração: pressurizado e não pressurizado.

¹ Artigo publicado no **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.522-525, 2011.

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Para a feitura das análises foram utilizados sacos F57 (Ankom®) e extratores de fibra Ankom²²⁰®, com ambiente pressurizado, e Tecnal TE-149®, com ambiente não pressurizado.

Foram utilizadas 20 amostras de alimentos concentrados, 20 amostras de volumosos e 20 amostras de fezes bovinas. O banco de amostras foi construído buscando-se obter materiais com alta diversidade, de forma a obter a maior amplitude possível de teores de FDN e FDA.

As amostras de forragens úmidas e fezes foram secas sob ventilação forçada (60°C) e, em conjunto com as demais amostras, processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm (Valente, 2010) e quantificadas quanto ao teor de matéria seca (MS) utilizando estufa não ventilada (105°C/16 horas).

Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em duplicatas nos sacos, seguindo a proporção de 20 mg MS/cm² de superfície, perfazendo o total de 120 sacos, os quais foram selados por calor.

Para avaliação dos teores de FDN, produziu-se detergente neutro segundo recomendações de Mertens (2002), omitindo-se o uso de sulfito de sódio e utilizando-se α -amilase termoestável (Termamyl 2X, Novozymes). Para os procedimentos de extração, a relação detergente neutro:amostra foi mantida em 100 mL/g de MS, com tempo efetivo de extração de 1 hora em temperatura de 100°C. Um saco de cada amostra foi analisado em cada um dos equipamentos que representam os diferentes ambientes de extração.

Após a extração, foram realizadas lavagens sequenciais com água quente e acetona. Após esse tratamento, os sacos foram secos em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas) e, sequencialmente, em estufa não ventilada (105°C/45 minutos), acondicionados em dessecador e pesados.

A avaliação dos teores de FDA foi conduzida seqüencialmente às avaliações de FDN, utilizando-se os mesmos procedimentos de extração e pesagem. O detergente ácido foi produzido segundo recomendações de Van Soest & Robertson (1985).

Nenhum procedimento para correção quanto aos compostos nitrogenados e cinzas insolúveis em detergente neutro ou ácido foi conduzido.

Previamente aos procedimentos de extração, os sacos foram lavados com detergente neutro em ebulição, água quente e acetona e secos e pesados conforme o procedimento descrito anteriormente para se obterem as taras.

As comparações entre os teores de FDN e FDA obtidos nos diferentes ambientes de extração foram realizadas por intermédio de ajustamento de equação de regressão linear simples dos valores obtidos em ambiente pressurizado (Y) sobre os valores obtidos em ambiente não pressurizado (X), sendo a avaliação estatística conduzida sob as seguintes hipóteses:

$$H_0: \beta_0 = 0 \text{ e } \beta_1 = 1; \text{ vs. } H_a: \text{ não } H_0$$

Para o caso de não aceitação da hipótese de nulidade, concluiu-se serem os ambientes de extração diferentes. Os procedimentos estatísticos foram realizados por intermédio do PROC REG implementado no programa SAS (Littel et al., 1991).

Os teores de FDN e FDA obtidos em ambiente não pressurizado foram, em média, superiores em 5,16 e 5,41; 2,18 e 4,37; e 9,20 e 8,05 pontos percentuais, considerando-se concentrados, fezes e volumosos, respectivamente. Para todas os materiais avaliados, foram observadas diferenças entre ambientes de extração ($P < 0,01$) (Tab. 1), corroborando as maiores estimativas de FDN e FDA obtidas em ambiente não pressurizado (Fig. 1).

Tabela 1 – Estimativas de parâmetros da regressão linear entre os teores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido, com o percentual da matéria seca, obtidos em ambiente não pressurizado (X) e pressurizado (Y)

Material	Estimativas de Parâmetros				
	Intercepto	Coef. de Inclinação	r ²	s _{xy}	Valor-P ³
Fibra em Detergente Neutro					
Concentrados ¹	-3,0537	0,9568	0,9729	2,20	<0,0001
Volumosos ¹	3,8171	0,8353	0,3802	6,75	<0,0001
Fezes ¹	-13,4914	1,1500	0,8340	2,37	<0,0001
Geral ²	-2,6174	0,9573	0,9031	5,10	<0,0001
Fibra em Detergente Ácido					
Concentrados ¹	-0,1371	0,8242	0,8952	3,40	<0,0001
Volumosos ¹	8,9302	0,6486	0,4986	4,60	<0,0001
Fezes ¹	-1,7390	0,9490	0,7137	5,05	0,0041
Geral ²	-1,9829	0,9085	0,8666	4,73	<0,0001

¹ n = 20. ² n = 60. ³ Nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado a H₀: β₀ = 0 e β₁ = 1.

A principal diferença física entre os ambientes pressurizados e não pressurizados reside sob a forma como o detergente interage com a amostra. Nos ambientes pressurizados, como o início do processo de aquecimento, ocorre aumento da pressão atmosférica sobre a solução de detergente, o que eleva seu ponto de ebulição. Assim, na temperatura de extração utilizada (100°C) não há ebulição da solução. Em ambientes não pressurizados, não há acúmulo de pressão, observando-se, portanto, ebulição da solução, a qual é mantida no sistema como auxílio de um condensador.

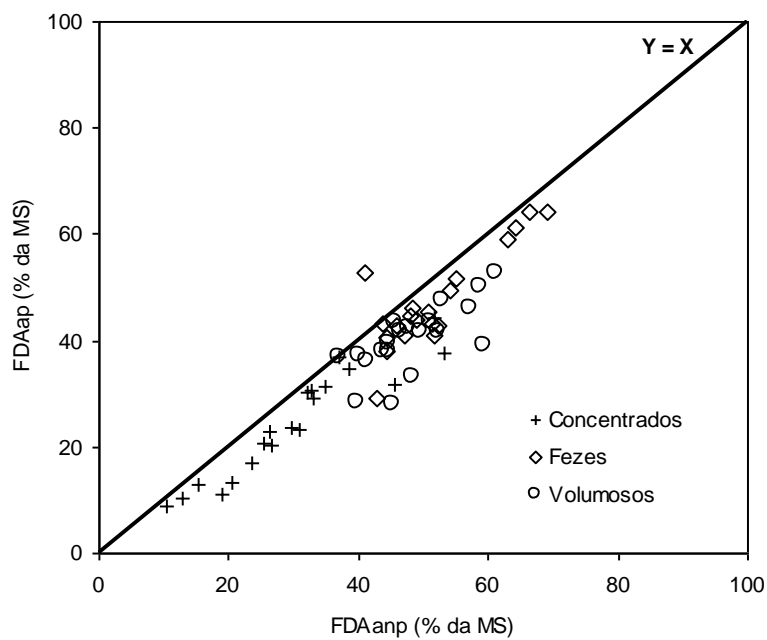
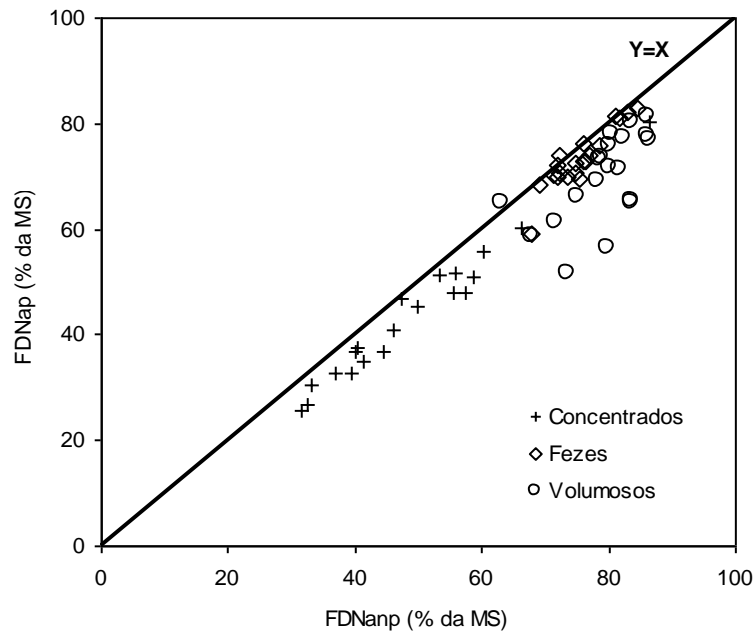


Figura 1 - Relação entre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), obtidos em ambientes pressurizado (ap) e não-pressurizado (anp).

Sacos filtrantes, como o F57(Ankom®), são confeccionados em esquema que não envolve tecelagem, com a união de fibras sem arranjo geométrico definido. Isto confere a este tipo de tecido menor porosidade em relação aos tecidos produzidos por tecelagem, o que se

mostra favorável no tocante à prevenção da perda de partículas fibrosas durante o processo de análise (Casali et al., 2009; Valente, 2010).

Contudo, baixas porosidades dificultam a eliminação de gases do interior dos sacos, como verificado em estudos de degradação *in situ* (Udén et al., 1974). Por analogia, considerando-se a formação de bolhas de gás (vapor) durante a extração em ambiente não pressurizado, haveria retenção destas quando formadas no interior dos sacos. Isto poderia comprometer diretamente o contato do detergente com as amostras, reduzindo a eficiência de extração dos materiais a serem solubilizados e implicando, conseqüentemente, em maiores estimativas de concentração de componentes fibrosos, como observado neste trabalho (Fig. 1).

A exatidão dos teores de compostos fibrosos com o uso de ambientes pressurizados utilizando-se sacos como recipientes foi verificada em alguns trabalhos (Vogel et al., 1999; Casali et al., 2009; Valente, 2010). Desta forma, diante dos resultados obtidos neste estudo, o uso de ambientes não pressurizados mostra-se incompatível com a avaliação dos teores de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas utilizando-se sacos filtrantes.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) contents in concentrates, forages and cattle feces using filter bags under pressured or non-pressured physical environment. Twenty samples of each material were used. The contents obtained under different environment were compared through linear regression. The NDF and ADF estimates were found different between physical environments for all materials ($P < 0.01$). The utilization of pressured environment is recommended to avoid gas accumulation in the bags, which may compromise the detergent action.

Key Words: acid detergent fiber, filter bags, F57, neutral detergent fiber

Referências

- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.38, p.130-138, 2009.
- CHERNEY, D.J.R. Characterization of forages by chemical analysis. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. et al. (Eds.) *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Wallingford: CAB International, 2000. p.281-300.
- LITTELL, R.C.; FREUND, R.J.; SPECTOR, P.C. *SAS system for linear models*. Cary: SAS Institute, 1991. 329p.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Internat.*, v.85, p.1217-1240, 2002.
- UDÉN, P.; PARRA, R.; VAN SOEST, P.J. Factors influencing reliability of the nylon bag technique. *J. Dairy Sci.*, v.57, p.622-622, 1974.
- VALENTE, T.N.P. *Utilização de tecidos na avaliação de compostos fibrosos e na degradação ruminal in situ de alimentos para ruminantes*. 2010. 90f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. *Analysis of forage and fibrous foods*. Ithaca: Cornell University, 1985. 202p.
- VOGEL, K.P.; PETERSEN, J.F.; MASTERSON, S.D. et al. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. *Crop Sci.*, v.39, p.276-279, 1999.

Technical Note

Evaluation of sodium sulfite and protein correction in analyses of fibrous compounds in tropical forages¹

Abstract - The objective of this study was to evaluate the contents of fibrous compounds in tropical grasses and legumes according to utilization of sodium sulfite in the neutral detergent solution or using a procedure for contaminant protein correction. Samples of ten grasses and ten legumes were used. The contents of neutral detergent fiber were decreased when sodium sulfite was used; however, more prominent reductions were verified in legumes. Sodium sulfite decreased the acid detergent fiber contents in both forage groups. The contents of neutral and acid detergent insoluble protein and lignin were reduced by sodium sulfite in legumes but no effect was observed in grasses with regard these variables. The decrease in fiber contents in legumes could be explained by the solubilization of lignin and decrease in insoluble nitrogen. However, the decreases in fiber in grasses could not be solely explained by the decrease in contaminant protein and solubilization of lignin, and loss of other fibrous compounds probably occurred. The utilization of sodium sulfite compromises the accuracy of the estimates of fibrous compounds contents in tropical forages. The precision of the estimates were not relevantly increased by sodium sulfite. The correction of insoluble fibrous compounds for protein is suggested instead of using sodium sulfite because there are no modifications on neutral detergent solution or undesirable solubilization of fibrous compounds.

Key words: acid detergent fiber, acid detergent insoluble protein, lignin, neutral detergent fiber, neutral detergent insoluble protein

¹ Artigo publicado na **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.1, p.225-231, 2012.

Introduction

The content and the diversity of insoluble fibrous compounds present a main role in the evaluation of tropical forages in ruminant nutrition because they directly influence several characteristics of the diets, such as the rumen fill effect and the energy and nitrogenous compounds availability (Detmann et al., 2008). Nevertheless, the concepts of fiber applied in animal nutrition are essentially defined by the analytical method. Thereby, any variation in the analytical procedures may potentially produce results that will differ from original proposition. As consequence, this can compromise the rusticity and accuracy of the method and the comparison of results obtained in different experimental or productive conditions (Detmann, 2010).

The sodium sulfite has been suggested as a component of the solution used to analyze the neutral detergent insoluble fiber (NDF). The addition of sodium sulfite to neutral detergent solution was proposed looking for decreasing the contamination with protein in the gravimetrically measured residue (Mertens, 2002). However, its utilization was also associated with the undesirable solubilization of fibrous compounds, such as lignin (Hartley, 1972; Van Soest et al., 1991; Dorleans et al., 1996). From this, it could be assumed that sodium sulfite utilization in NDF analysis is controversial.

Nitrogenous compounds are supposed to be the main contaminant of gravimetrically measured fiber (Van Soest, 1994; Detmann & Valadares Filho, 2010). To avoid biases on insoluble fiber and non-fibrous carbohydrates estimates, it has been suggested that crude residue of NDF should be corrected for contaminant protein and ash (Detmann & Valadares Filho, 2010; Detmann et al., 2010). Particularly, protein correction is an uncomplicated procedure because this is based on routine analysis such as Kjeldahl technique. When compared to sodium sulfite, protein correction could present two probable analytical advantages. First, the analysis of crude residue of fiber for protein content would not promote

the undesirable solubilization of any fibrous compounds as highlighted before for sodium sulfite utilization. Second, the protein correction allows taking into account the total contaminant nitrogen in the fiber residue whereas sodium sulfite decreases, but not eliminate, such contamination. However, an accurate comparison of the estimates of fibrous compounds considering the use of sodium sulfite or protein correction in tropical forages still remains to be established.

Thereby, the objective of this work was to evaluate the effects of using sodium sulfite in neutral detergent solution and protein correction on estimates of insoluble fibrous compounds in tropical grasses and legumes.

Material and Methods

The experiment was conducted at the Animal Nutrition Laboratory of the Animal Science Department of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

Ten grasses, *Pennisetum purpureum*, *Brachiaria decumbens*, *Panicum repens*, *Brachiaria humidicula*, *Andropogon gayanus*, *Panicum maximum* cv. Aruana, *Panicum maximum* cv. Mombaça, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, tifton 85 bermudagrass (*Cynodon* sp.) and *Panicum maximum* cv. Massai; and ten legumes, *Arachis pintoi*, *Medicago sativa*, *Leucaena leucocephala*, *Galactia striata*, *Dolichos lablab*, *Centrosema pubescens*, *Glycine weghtii*, *Gliricidia sepium*, *Stylosantes guianensis* and *Cajanus cajan*, were evaluated. The forages were cultivated in 2- x 4-m plots. All samples were cut at ground level in December 2008. The plants had approximately 45 days of regrowth.

The samples were oven-dried at 60°C and processed in a knife mill (1-mm). After that, the dry matter (DM, index no. 934.01) contents of the samples were analyzed according to the method of the AOAC (1990).

For the NDF analysis, twelve aliquots of each forage (1 g) were put in 120-mL polyethylene pots, and 100 mL of neutral detergent were added (Mertens, 2002). Sodium sulfite was added in six pots (0.5 g/100 mL). Heat-stable alpha amylase was used in all aliquots (Termamyl 2X, Novozymes). After sealing, the pots were autoclaved at 105°C for 1 h (Pell & Schofield, 1993). The neutral detergent insoluble residue was retained by vacuum filtration in filter crucibles, washed sequentially with hot distilled water and acetone, oven-dried at 105°C for 16 h, put in a desiccator and weighed. Four aliquots (two with sodium sulfite and two without sodium sulfite) were separated and analyzed regarding neutral detergent insoluble protein (NDIP) contents (Licitra et al., 1996).

The remained eight crucibles were conditioned in 120-mL polyethylene pots, and 100 mL of acid detergent was added (Van Soest & Robertson, 1985). After sealing, the pots were autoclaved at 105°C for 1 h (Pell & Schofield, 1993). The acid detergent insoluble residue was retained by vacuum filtration in the filter crucibles, washed sequentially with hot distilled water and acetone, and oven-dried and weighed as described before. Similarly, four aliquots (two with sodium sulfite and two without sodium sulfite) were separated and analyzed regarding acid detergent insoluble protein (ADIP) contents (Licitra et al., 1996).

Both NDIP and ADIP contents were obtained multiplying by 6.25 the contents of insoluble nitrogen in NDF and ADF (Licitra et al., 1996).

The remained four crucibles were used to quantify lignin contents. The filter crucibles were put in 120-mL polyethylene pots, and 30 mL of 12 M sulfuric acid were added and homogenized with a glass rod. Subsequently, 12 M sulfuric acid was added up to half the height of the crucible, and the samples were homogenized after 30 minutes (Van Soest & Robertson, 1985). After 3 h, the crucibles were subjected to vacuum filtration and washed with hot distilled water to completely remove the acid. The material was oven-dried at 105°C for 16 h and then weighed to obtain the mass of the residue composed of lignin and minerals.

Then, the crucibles were transferred to a muffle furnace at 500°C, where they remained for 3 h. They were weighed again, and the mass of lignin was calculated by the weight loss after incineration.

The contents of NDF, NDF corrected for protein (NDFp), acid detergent fiber (ADF), ADF corrected for protein (ADFp), lignin, NDIP, and ADIP obtained with or without using sodium sulfite were directly compared between the different species groups (grasses or legumes) according to the model:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_{(i)j} + M_k + GM_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad (1),$$

Where: μ = general constant; G_i = effect of the species group i (grass or legume; fixed effect); $S_{(i)j}$ = effect of species j nested within group i (random effect); M_k = effect of the method of analysis k (with or without sodium sulfite; fixed effect); GM_{ik} = interaction effect of the species group i and the method k ; and ε_{ijk} = random error. The mean square of $S_{(i)j}$ was used to test the species group effect. On the other hand, the sodium sulfite and interaction effects were evaluated using random error mean square.

Some relationships between variables evaluated with or without sodium sulfite were evaluated by adjusting a simple linear regression equation (Table 1). These statistical analyses were conducted independently for grasses and legumes under the null hypothesis:

$$H_0 : \beta_0 = 0 \text{ and } \beta_1 = 1 \quad (2).$$

Variables X and Y were considered to be similar when the null hypothesis was not rejected.

All statistical procedures were performed using the PROC MIXED and the PROC REG of SAS (*Statistical Analysis System*, version 9.1) adopting $\alpha = 0.05$.

Table 1 - Description of variables evaluated in the equality test using linear regression analysis

Relationship	X		Y	
	Variable	Description	Variable	Description
1	Δ_{NDF}	Difference between NDF contents estimated with or without sodium sulfite	Δ_{N}	Fractions of NDIP and lignin solubilized by sodium sulfite
2	Δ_{ADF}	Difference between ADF contents estimated with or without sodium sulfite	Δ_{A}	Fractions of ADIP and lignin solubilized by sodium sulfite

Results

Excepting for ADF and ADFp contents ($P>0.05$), there was interaction ($P<0.05$) of sodium sulfite utilization and forage group on the other variables presented in Table 2. The ADF and ADFp contents were decreased ($P<0.05$) by using sodium sulfite (Table 2). The NDF and NDFp contents were decreased ($P<0.05$) by using sodium sulfite in both forage groups. However, the decrease was more prominent in legumes compared to grasses (Table 2). The NDIP, ADIP and lignin contents were decreased by sodium sulfite in legume samples ($P<0.05$) but such effect was not observed ($P>0.05$) in grass samples (Table 2).

The decreases in NDF and ADF contents caused by sodium sulfite in legumes were found to be equivalent ($P>0.05$) to the sum of solubilized lignin and NDIP, for NDF, and solubilized lignin and ADIP, for ADF (Table 3). As there were no decrease in lignin and insoluble nitrogen in grasses (Table 2), such equivalence could not be observed in this forage group ($P<0.05$; Table 3).

Discussion

The recommendation for using sulfite in neutral detergent solution is based on its ability to decrease contaminant protein in the insoluble residue (Mertens, 2002). Those contaminant nitrogenous compounds can originate from four potential sources: nitrogen that is naturally associated with the cell wall, nitrogen attached to artifacts (non-enzymatic products), nitrogen linked to tannins (proanthocyanidins), and keratins of animal origin (Van Soest, 1994). The last source is not applicable to the results of this study.

Table 2 - Estimates of fibrous compounds contents according to species groups and utilization of sodium sulfite

Item	Grasses ⁴		Legumes ⁴		SDap ⁵	SDwp ⁵	P Value ⁶		
	WSS	SS	WSS	SS			F	S	F × S
NDF ¹	730.2a	710.1b	551.0	458.2b	98.1	14.1	<0.001	<0.001	<0.001
NDFp ¹	696.3a	680.3b	458.1a	417.1b	92.5	11.9	<0.001	<0.001	0.004
ADF ¹	377.2	354.4	350.6	305.7	76.7	21.6	0.149	<0.001	0.133
ADFp ¹	371.0	349.0	320.2	294.0	72.0	15.4	0.037	<0.001	0.675
NDIP ¹	33.9a	29.8a	92.9a	41.1b	28.1	9.3	0.001	<0.001	<0.001
NDIP ²	47.1a	42.4a	158.7a	86.1b	45.1	17.9	<0.001	<0.001	<0.001
ADIP ¹	6.2a	5.4a	30.3a	11.7b	12.9	7.1	0.002	<0.001	0.001
ADIP ³	16.8a	15.0a	84.3a	41.8b	31.3	9.6	<0.001	<0.001	<0.001
Lignin ¹	44.9a	34.2a	114.4a	80.6b	41.6	13.3	<0.001	<0.001	0.017

NDF = neutral detergent fiber; NDFp = NDF corrected for protein; ADF = acid detergent fiber; ADFp = ADF corrected for protein; NDIP = neutral detergent insoluble protein; ADIP = acid detergent insoluble protein.

a, b: means a same row within grasses or legumes and followed by different letters differ at P<0.05.

¹ g/kg DM. ² g/kg NDF. ³ g/kg ADF. ⁴ WSS, without sodium sulfite; SS, using sodium sulfite. ⁵ SDap, standard deviation among plots; SDwp, standard deviation within plots. ⁶ F, effect of forage group; S, effect of sodium sulfite; F × S, interaction of forage group and sodium sulfite.

Part of the protein contamination could be attributed to the formation of artifacts by the non-enzymatic reactions. However, their formation occurs mainly during drying at

temperatures of at least 65°C, which were avoided in this study (samples were dried at 60°C). The use of adequate temperatures and ventilated ovens reduces the formation of these artifacts by accelerating the removal of humidity from the material, which is necessary for non-enzymatic reactions to occur (Van Soest, 1994).

Table 3 - Estimates of regression parameters for different relationships according to utilization of sodium sulfite

Variable ¹		Parameter Estimate ²				
X	Y	Intercept	Slope	s _{XY}	r ²	P Value ³
Grasses						
Δ_{NDF}	Δ_{N}	17.22±3.68	-0.116±0.138	7.58	0.082	<0.001
Δ_{ADF}	Δ_{A}	-3.64±3.30	0.667±0.132	4.27	0.760	<0.001
Legumes						
Δ_{NDF}	Δ_{N}	-56.67±39.54	1.555±0.420	25.42	0.634	0.379
Δ_{ADF}	Δ_{A}	21.59±12.79	0.689±0.211	25.75	0.603	0.292

¹ See details of variables in Table 1. ² Estimate ± standard error. ³ See equation 2 for details.

It has been speculated that protein contamination would be more prominent in tannin-rich material or samples with higher crude protein content (Hintz et al., 1996; Krueger et al., 1999; Pagán et al., 2009). Considering this, it will be expected that legumes show higher protein contamination than grasses due to their greater tannin content, which would result in the formation of insoluble complexes with the protein components of forages (Van Soest, 1994; Krueger et al., 1999). Such statement seems to support the results obtained in this study, where sodium sulfite caused more prominent decrease in NDF and ADF contents in legumes when compared with grasses (Table 2; Figure 1).

On the other hand, the utilization of sodium sulfite has been associated with a partial solubilization of lignin (Hartley, 1972; Van Soest et al., 1991), which was observed for legume samples (Table 2). Such pattern indicates that lignin estimates can be less reliable in

this type of forage when sodium sulfite is used. However, the decreases of NDF and ADF contents in grasses could not be solely explained by the decrease in contaminant protein and solubilization of lignin (Tables 2 and 3).

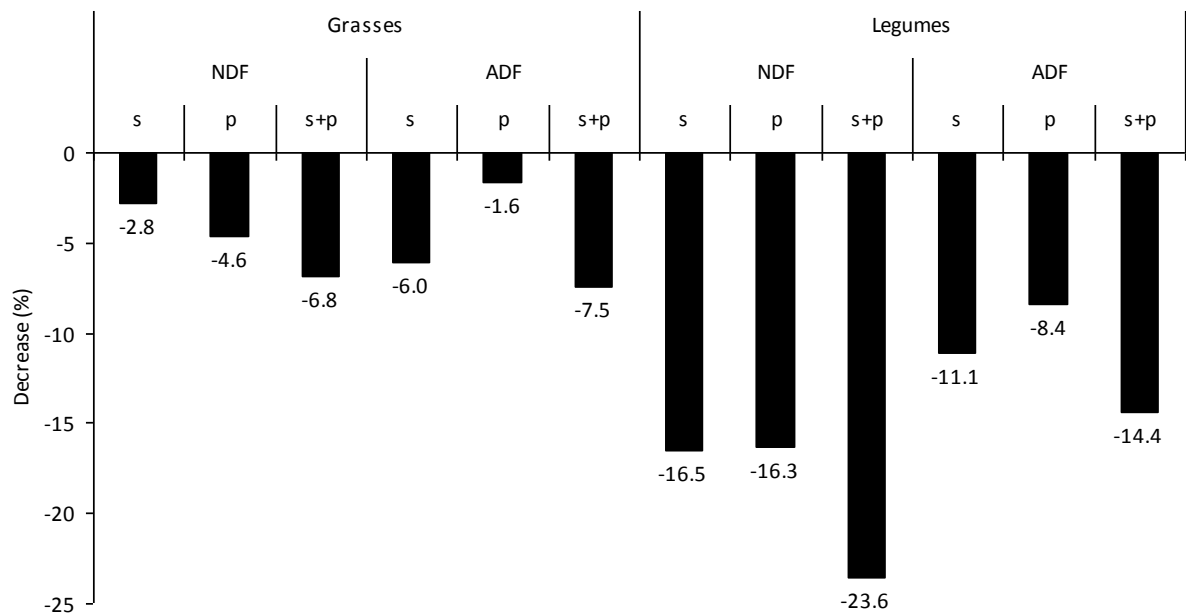


Figure 1 – Decrease of fiber contents in relation of analytical procedure without using sodium sulfite or protein correction (s, using sodium sulfite; p, considering protein correction).

The decreases in NDF and ADF contents caused by protein correction or sodium sulfite were approximately equivalent each other in legume samples (Figure 1). Despite this, those decreases present different components. The utilization of sodium sulfite in legumes decreases, but not obliterated, the contaminant protein (Table 2; Figure 1), which allows verifying an additional decrease in fiber contents when protein correction was applied to samples previously treated with sodium sulfite (Figure 1). Thereby, NDF and ADF decreases were at least partially caused by the solubilized portion of lignin (Tables 2 and 3). In this way, despite of providing similar results than sodium sulfite (Figure 1), it can be assumed that

protein correction provides more accurate estimates of fibrous compounds in legumes under a chemical point of view.

Actually, the decreases in NDF and ADF contents caused by sodium sulfite or protein correction were approximately additive each other in grass samples (Figure 1). It can be affirmed because sodium sulfite did not promote any significant decrease in the insoluble protein included in fiber residues (Table 2). Moreover, the sodium sulfite did not cause significant decrease in lignin content in grasses (Table 2). In this context, the actual cause of the decreases in NDF and ADF contents (Figure 1) could not be entirely explained by decrease in insoluble nitrogen or solubilization of lignin (Table 3). Such pattern highlights that sodium sulfite can solubilize other compounds of the cell wall (Hintz et al., 1996). When compared to control method (without sodium sulfite or protein correction), thereabout 26 and 49% of the decreases caused by sodium sulfite in NDF and ADF could not be identified from results obtained in this work (Figure 2), which implicates lack of accuracy on fiber content estimates.

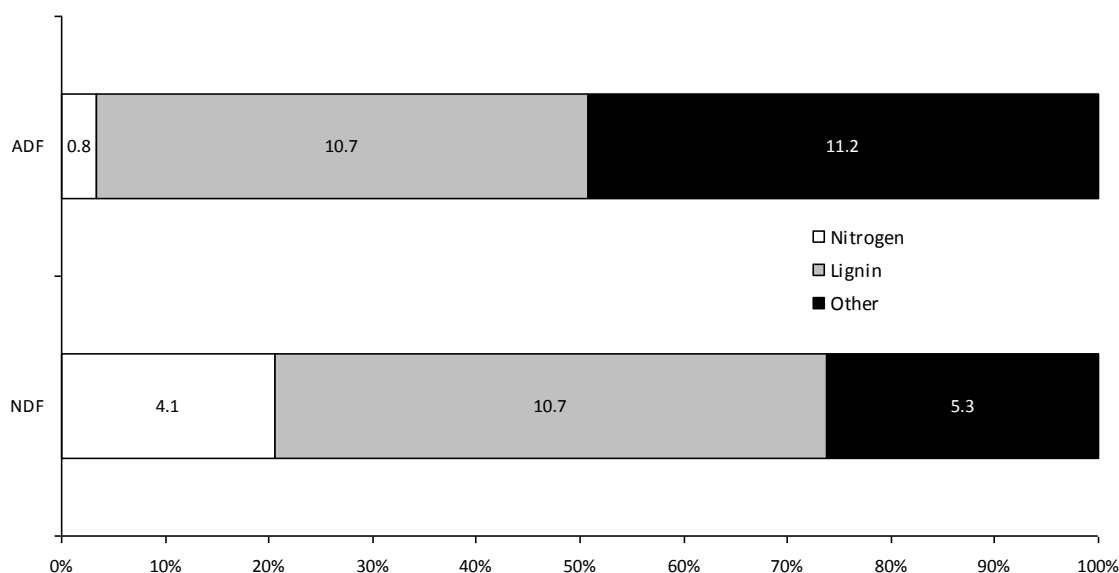


Figure 2 – Descriptive evaluation of the average decrease in NDF and ADF contents caused by sodium sulfite in grass samples (g/kg DM).

Considering the results obtained with grass samples, the protein correction could be assumed as an alternative to avoid the bias caused by sodium sulfite. This statement is based on the fact that protein correction does not demand any modification in neutral detergent solution and avoids the undesirable loss of known or unknown fibrous compounds. Moreover, considering the results obtained with legume samples, the partial solubilization of insoluble nitrogen and lignin could compromise the estimates of these compounds when they are imputed in feed evaluation models.

Oven-drying procedures of forages can cause the formation of nitrogen-containing artifacts, which seem to be originated from oxidative polymerization of tannins and protein (Pagán et al., 2009) or through non-enzymatic reactions between sugars and free amino acids (Van Soest, 1994). Those compounds can noticeably increase the protein contamination of neutral detergent insoluble residue, but they would be not necessarily eliminated by sodium sulfite. Such pattern could be more relevant by considering that different oven-drying procedures could cause different increases in insoluble nitrogen contents (Pagán et al., 2009; Pelletier et al., 2010), which will obviously decrease the reproducibility of the analytical method. Nevertheless, Terrill et al. (1994) affirmed that protein correction is able to eliminate the variation associated with drying procedure on insoluble fibrous residue.

A possible problem associated with protein correction procedure is the conversion of insoluble nitrogen contents into equivalent protein. According to Hintz et al. (1996), the conversion factor of nitrogen into protein of a simple Maillard artifact (amino acid plus sugar) would be around a half of that one applied for true protein (6.25). The probable bias caused by uncorrected conversion of nitrogen into equivalent protein could be increased in digestion assays because little true protein is found in feces. A great part of fecal nitrogenous compounds presents nitrogen content around 70-110 g/kg (Van Soest, 1994). This would demand a conversion factor varying from 14.3 to 9.1. Thereby, despite of 6.25 factor be

recommended in the evaluation of nitrogenous compounds associated with fiber (Licitra et al., 1996), its utilization could underestimate the actual mass of contaminant nitrogenous compounds and overestimate the mass of insoluble fiber. However, evaluations with regard the true nitrogen content in the nitrogenous compounds associated with insoluble fiber remains to be performed. Despite this, it must be emphasize that bias observed with protein correction would be less relevant when compared to effective loss of nitrogenous and fibrous compounds caused by sodium sulfite utilization (Table 2; Figures 1 and 2).

According to Hintz et al. (1996), the sodium sulfite utilization could be advantageous because it would increase the precision of fiber estimates. The benefit of using sodium sulfite in NDF analysis is that it would make some samples easier to filter, especially those that are high in protein or those that have been heated or fermented. In these cases, sulfite would greatly reduce variability among replicates and improve repeatability as well.

However, using sodium sulfite caused higher precision only on lignin contents (Figure 3). It probably occurred due to decrease in the contaminant protein of lignin residue. The lignin estimated by solubilization of cellulose in sulfuric acid presents significant contamination by nitrogenous compounds (Henriques et al., 2007; Gomes et al., 2011). Nonetheless, the increased precision (Figure 3) may be associated with decreased accuracy (Table 2), which would not be a good analytical advantage.

Considering the NDF contents, the sodium sulfite utilization produced results with lower precision when compared to control method or to protein correction. If the filtration problems are more prominent in NDF analysis than in ADF or lignin analyses, the analytical advantage pointed out by Hintz et al. (1996) for using sodium sulfite seems to be not relevant for tropical forages analysis.

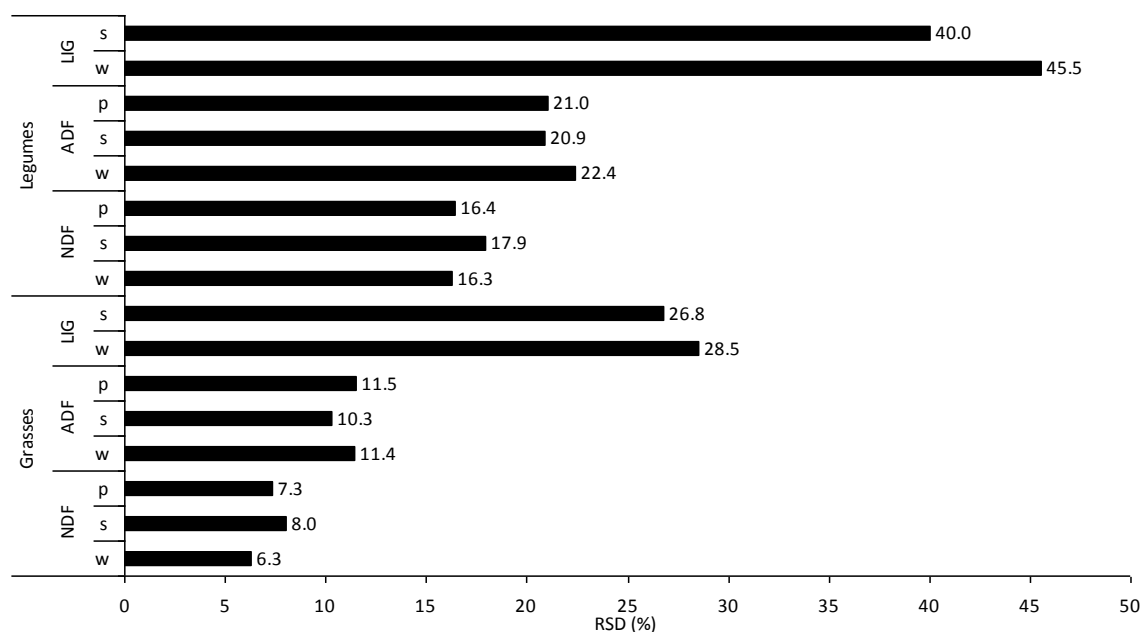


Figure 3 - Relative standard deviation (RSD) for estimates of fiber compounds according to utilization of sodium sulfite or protein correction (w, without sodium sulfite or protein correction; s, using sodium sulfite; p, considering protein correction).

Conclusion

The utilization of sodium sulfite compromises the accuracy of the estimates of fibrous compounds contents in tropical forages. The procedure for contaminant protein correction is suggested as alternative to sodium sulfite because it does not encompass any modification in neutral detergent solution or cause any undesirable solubilization of fibrous compounds.

References

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official methods of analysis**. 15 ed. Arlington: AOAC International, 1990. paginação descontínua.
- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.S.; QUEIROZ, A.C. et al. (Eds.). **Novilhas Leiteiras**. Fortaleza: Graphiti, 2010. p.253-302.
- DETMANN, E; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.980-984, 2010.

- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. Prediction of the energy value of cattle diets based on chemical composition of the feeds. In: VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I.; CHIZZOTTI, M.L. et al. (Eds). **Nutrient requirements of zebu beef cattle BR-Corte**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2010. p.45-60.
- DORLEANS, M.; MANDRAN, M.; SAUVANT, D. Study of the use of a protease with the Van Soest procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, p.129-136, 1996.
- GOMES, D.I.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. 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, 2011.
- HARTLEY, R.D. p-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.23, p.1347-1354, 1972.
- HENRIQUES, L.T.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C. et al. Frações dos compostos nitrogenados associados à parede celular em forragens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.258-263, 2007.
- HINTZ, R.W.; MERTENS, D.R.; ALBRECHT, K.A. Effects of sodium sulfite on recovery and composition of detergent fiber and lignin. **Journal of the AOAC International**, v.79, p.16-22, 1996.
- KRUEGER, C.G.; ALBRECHT, K.A.; REED, J.D. et al. Sodium sulfite effects on recovery and composition of detergent fibre and lignin from forage legumes varying in levels of proanthocyanidins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1351-1356, 1999.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- PAGÁN, S.; WOLFE, R.M.; TERRILL, T.H. et al. Effect of drying method and assay methodology on detergent fiber analysis in plants containing condensed tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v.154, p.119-124, 2009.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- PELLETIER, S.; TREMBLAY, G.F.; BERTRAND, A. et al. Drying procedures affect non-structural carbohydrates and other nutritive value attributes in forage samples. **Animal Feed Science and Technology**, v.157, p.139-150, 2010.
- TERRILL, T.H.; WINDHAM, W.R.; EVANS, J.J. et al. Effect of drying method and condensed tannin on detergent fiber analysis of *Sericea lespedeza*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.66, p.337-343, 1994.

- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. **Analysis of forages 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.

Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro em amostras com alto teor de amido¹

Resumo - Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar o uso de enzimas industriais na avaliação da fibra em detergente neutro (FDN) de materiais ricos em amido. No primeiro experimento verificou-se a exatidão das estimativas dos teores de FDN obtidas com a utilização de diferentes enzimas industriais (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) em diferentes volumes (50, 100, 250 ou 500 µL/amostra). Foram produzidas amostras contendo 0, 100, 300, 500 e 1000 g de amido/kg de matéria seca, utilizando celulose purificada como padrão analítico para aferição dos teores de FDN. Foram avaliadas quatro repetições para cada combinação de tipo e volume de enzima e concentração de amido, totalizando 240 avaliações. No segundo experimento foram utilizadas amostras de milho e sorgo como matrizes amiláceas. Foram avaliados os três tipos e os quatro volumes de enzimas utilizados no primeiro experimento sobre cada matriz. Adicionalmente, foram avaliadas alíquotas sem a utilização de enzimas. Foram avaliadas quatro repetições para cada combinação, totalizando 104 avaliações. Para amostras simuladas com concentração de amido menor ou igual a 300 g/kg não foram verificados vícios significativos sobre a recuperação da FDN, não havendo diferenças entre enzimas. Houve redução mais acentuada do teor de FDN por volume de enzima na amostra de milho em comparação ao sorgo. Para a avaliação dos teores de fibra em detergente neutro recomenda-se o uso das enzimas α -amilases Termamyl 2X e Liquozyme 2.2X com atividades de 240 e 300 KNU/g, respectivamente, em volumes de 250 µL para amostras de massa variando de 0,7 a 1,0 g.

Palavras Chave: α -amilase; amiloglicosidase; análise de alimentos; fibra

¹ Artigo formatado segundo as normas da **Revista Brasileira de Zootecnia**.

Introdução

O método de análise de componentes fibrosos denominado de “sistema detergente” foi inicialmente desenvolvido para avaliação de forragens. Subsequentemente, este foi estendido aos demais tipos de alimentos. Entretanto, a sua aplicação a outros tipos de matrizes orgânicas não fibrosas está associada a alguns problemas analíticos. De forma particular, a limitação do sistema detergente na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) em alimentos com elevado teor de amido está associada à dificuldade de filtração devido à concentração de amido em si, o qual pode se exceder em relação à capacidade do detergente em solubilizar a amostra (Mascarenhas-Ferreira et al., 1983) ou precipitar por gelatinização, promovendo superestimação da concentração de fibra insolúvel (Hall, 2007; Valente et al., 2011a).

O método de análise de FDN originalmente desenvolvido (Van Soest & Wine, 1967) passou por diversas alterações com o intuito de possibilitar a avaliação de grãos, farelos e concentrados em geral. Todas as modificações foram propostas com base na solubilização da matriz solúvel dos diversos alimentos; bem como para facilitar sua aplicação rotineira nos laboratórios de nutrição.

No caso de alimentos com matriz orgânica rica em amido, apenas a solução detergente não se mostra eficiente em solubilizar o conteúdo celular; assim, recomenda-se o uso de enzima α -amilase para obter com exatidão a fração fibrosa insolúvel dos alimentos (Van Soest et al., 1991; Mertens, 2002; Ferreira & Mertens, 2007; Valente et al., 2011a). No entanto, a fonte e a quantidade da enzima não são devidamente especificadas; dessa forma, variações significativas podem ser observadas nos procedimentos adotados pelos laboratórios, reduzindo a rusticidade do método de análise. Isto se torna particularmente relevante em termos de análise de compostos fibrosos, pois os conceitos de fibra atualmente empregados na nutrição animal são essencialmente empíricos e definidos pelo método (Undersander et al., 1993; Detmann, 2010). Assim, a proposição de um método modificado apresenta potencial

para definir um novo valor de fibra, o qual deixa de ser comparável ao valor produzido pelo método original (Undersander et al., 1993; Mertens, 2002). Desta forma, o excesso de variantes de um mesmo método muitas vezes compromete o cotejamento adequado dos parâmetros estabelecidos em um trabalho de pesquisa, limita a aplicabilidade das inferências e restringe a robustez do método per si (Detmann, 2010).

No método oficial para análise do teor de FDN adotado pela *AOAC International* (Mertens, 2002) não há especificação direta de tipo, dose ou atividade da α -amilase a ser utilizada, mas somente procedimento de aferição de soluções enzimáticas por intermédio de avaliação visual. Isso denota limitações ao método, uma vez que pode comprometer sua rusticidade.

Alternativamente, diferentes enzimas industriais estão disponíveis no mercado, as quais possuem, de forma geral, certificação de qualidade e de nível de atividade. Isso poderia constituir vantagem, pois a aquisição de produto certificado e padronizado poderia ampliar a homogeneidade de aplicação do método entre laboratórios, incrementando sua rusticidade. Contudo, devido ao rol de produtos disponíveis no mercado, o tipo e o volume das enzimas que poderiam ser potencialmente utilizadas na avaliação de FDN não estão estabelecidos. Este fato se torna particularmente relevante considerando-se que diferentes alimentos são constituídos por diferentes matrizes orgânicas, as quais apresentam diferentes níveis de complexidade para solubilização e hidrólise de substâncias contidas no conteúdo celular, inclusive o amido. Isto demanda recomendações exatas com relação ao tipo e quantidade de α -amilase a ser usada na análise.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o uso de enzimas industriais na quantificação da concentração de fibra insolúvel em detergente neutro em materiais rico em amido.

Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

No primeiro experimento verificou-se a exatidão das estimativas dos teores de FDN obtidas com a utilização de diferentes amilases industriais em diferentes volumes (relações volume:amostra) em amostras contendo diferentes concentrações de amido. Neste sentido, utilizou-se a técnica de simulação de amostras proposta por Valente et al. (2011a).

Foram avaliadas três amilases industriais: Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L. Ressalta-se que as duas primeiras são classificadas como amilolíticas, ao passo que à última é atribuída atividade amiloglicolítica. Todas as enzimas foram produzidas pela Novozymes® (Tabela 1).

Foram produzidas amostras contendo 0, 100, 300, 500 e 1000 g de amido/kg de matéria seca. Utilizou-se como padrão analítico para aferição dos teores de FDN amostras de papel-filtro quantitativo (faixa preta; diâmetro 12,5 cm; cód, 050154, Vetec®), composto por celulose purificada. O papel foi processado em moinho de facas provido de peneira com porosidade de 1 mm, conforme recomendações de Valente et al. (2011a; 2011b). As diferentes concentrações de amido foram produzidas pela mistura do padrão de celulose com amido purificado (Merck 101252).

As amostras foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®), seguindo-se a proporção de 20 mg de matéria seca/cm² de superfície. A solução de detergente neutro foi produzida segundo recomendações de Detmann et al. (2012).

Os sacos contendo as amostras foram acondicionados em potes de polietileno. A solução de detergente neutro foi então adicionada à temperatura ambiente seguindo a proporção de 100 mL/g de amostra. Sobre a solução de detergente neutro foram acrescentadas as enzimas em diferentes volumes: 50, 100, 250 ou 500 µL/amostra. Os potes foram vedados

e autoclavados por 1 hora a 105°C (Método INCT-CA F-002/1; Detmann et al., 2012). Após a extração, foram realizadas lavagens sequenciais com água destilada quente e acetona. Os sacos foram então secos em estufa com ventilação forçada (60°C/48 horas) e, sequencialmente, em estufa não ventilada (105°C/2 horas), acondicionados em dessecador e pesados. Foram avaliadas quatro repetições para cada combinação de tipo e volume de enzima e concentração de amido, totalizando 240 avaliações.

Previamente aos procedimentos de extração os sacos foram lavados com solução de detergente neutro comercial em ebulição, água quente e acetona; secos e pesados conforme o procedimento descrito anteriormente para se obterem as taras (Detmann et al., 2012).

Como o padrão analítico de FDN é constituído por celulose purificada e o amido não possui componentes da FDN, admitiu-se que o resíduo insolúvel em detergente neutro deveria ser formado exclusivamente pela massa de celulose purificada submetida à análise. Assim, qualquer variação observada sobre o resíduo da análise em relação à massa de padrão celulose adicionada foi considerada como viés do processo analítico. Neste caso, o viés seria representado pela retenção de amido gelatinizado.

As estimativas dos vícios foram analisadas por intermédio de análise de variância, segundo delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $5 \times 3 \times 4$, sendo cinco concentrações de amido (0, 100, 300, 500 e 1000 g/kg), três tipos (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) e quatro volumes (50, 100, 250 e 500 μL /amostra) de enzimas. Os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.1). A significância dos vícios médios de cada tratamento foi avaliada por intermédio das propriedades dos intervalos de confiança. Adotou-se $\alpha = 0,01$.

No segundo experimento foram utilizadas amostras de milho grão e sorgo grão como matrizes orgânicas amiláceas. As amostras foram processadas em moinho de facas (1 mm; Valente et al., 2011b) e avaliadas quanto ao teor de matéria seca (método INCT-CA G-003/1),

matéria mineral (método INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB; método INCT-CA N-001/1) e extrato etéreo (método INCT-CA G-005/1), seguindo-se as recomendações de Detmann et al. (2012) (Tabela 2).

Tabela 1 - Resumo das características das enzimas

Item	Enzima ¹		
	Termamyl 2X	Amylase AG 300L	Liquozyme Supra 2.2X
Atividade qualitativa	α -amilase	amiloglicosidase	α -amilase
Atividade quantitativa ^{2 3}	240 KNU-T/g	300 AGU/mL	300 KNU/g
Forma física	Líquida	Líquida	Líquida
Densidade (g/L)	1260	1170	1260
Organismo de produção	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
Método de produção	Produzido por fermentação submersa de microrganismos autoclados. A proteína enzimática é separada e purificada a partir do organismo produtor		
Temperatura de armazenamento	0-25°C	0-10°C	0-25°C

¹ A informação foi obtida do fabricante. ² Limite inferior. ³ KNU = unidades de *Kilo Novo (Kilo Novo Units)* de α -amilase; uma KNU é a quantidade de α -amilase que, sob condições padrões (pH 7,1; 37°C), dextriniza 5,26 g de amido. AGU = unidade de amiloglicosidade; uma AGU é definida como a quantidade de enzima que cliva 1 μ mol de maltose por minuto sob condições padrões de ensaio (concentração de substrato de 10 mg/mL; 37°C; pH 5,0; tempo de incubação de 30 minutos).

As amostras foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®) e avaliadas quanto aos teores de FDN conforme os procedimentos descritos para o primeiro experimento. Neste caso, foram avaliados três tipos (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) e quatro volumes de enzimas (50, 100, 250 e 500 μ L/amostra) para cada matriz. Adicionalmente, foram avaliadas alíquotas sem a utilização de enzimas. Foram avaliadas quatro repetições para cada combinação, totalizando 104 avaliações.

Tabela 2 - Composição química dos alimentos

Alimento	Item ¹			
	MS ²	MO ³	PB ³	EE ³
Milho grão	881,0	98,94	8,47	1,62
Sorgo grão	890,1	98,93	9,03	1,39

¹MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo. ²g/kg de matéria natural
³g/kg de matéria seca.

Os teores de FDN de cada matriz foram avaliados de forma independente para cada enzima por intermédio de análise de regressão tendo como variável independente o volume de enzima utilizado. Após a inspeção do comportamento dos dados optou-se pela adoção de modelo com estrutura *linear-response-plateau* (LRP), o qual foi parametrizado por:

$$\hat{Y} = \hat{F}_0 + \hat{\beta} \times V; \forall V < V_c \quad (1);$$

$$\hat{Y} = \hat{F}_c; \forall V \geq V_c \quad (2);$$

em que: \hat{Y} = teor estimado de FDN (g/kg de matéria seca); \hat{F}_0 = teor estimado de FDN quando $V = 0$; V = volume de enzima ($\mu\text{L}/\text{amostra}$); $\hat{\beta}$ = taxa de decréscimo sobre os teores de FDN com a utilização de enzima [$(\text{g}/\text{kg})/(\mu\text{L})$]; V_c = volume crítico de enzima a partir do qual não se observa mais redução em \hat{Y} (μL); e \hat{F}_c = teor estimado de FDN com $V \geq V_c$ (g/kg).

Para o ajustamento das funções as estimativas dos teores de FDN sem a utilização de enzimas em cada alimento foram consideradas como nível 0 para todas as enzimas. As funções foram ajustadas utilizando-se o procedimento *linear-response-plateau* do software SAEG (versão 9.1), adotando-se $\alpha = 0,01$.

Resultados

Houve interação tripla ($P < 0,01$) de tipo e volume de enzima e concentração de amido sobre as estimativas dos vícios de recuperação da celulose purificada (Tabela 3). De forma geral, vícios significativos ($P < 0,01$) somente foram obtidos nas amostras simuladas contendo as concentrações de 500 e 1000 g/kg de amido, independentemente do tipo e volume de enzima, excetuando-se a combinação obtida com o volume de 500 μL e a enzima Liquozyme Supra 2.2X. Ressalta-se que os valores do vício de recuperação, de forma geral, foram superiores para as amostras contendo 1000 g/kg em relação às amostras contendo 500 g/kg de amido (Tabela 3).

O desdobramento do efeito de interação tripla complementou a informação gerada pela avaliação da significância dos vícios. Assim, para amostras com baixa concentração de amido (≤ 300 g/kg), além da não verificação de vícios significativos ($P < 0,01$; Tabela 3), observou-se não haver diferença entre as enzimas ($P > 0,01$), independentemente do volume utilizado (Tabela 4).

Contudo, para amostras com 500 e 1000 g/kg de amido verificou-se diferença ($P < 0,01$) entre as enzimas em todos os volumes utilizados (Tabela 4). De forma geral, as enzimas Termamyl 2X e Liquozyme Supra 2.2X propiciaram menores vícios nas amostras com maiores concentrações de amido, quando comparadas à Amylase AG 300L (Figura 1). Em comparação específica, a enzima Liquozyme Supra 2.2X mostrou-se pouco mais eficiente que a enzima Termamyl 2X, pois propiciou vícios de menor valor (Figura 1).

Os modelos com estrutura LRP apresentaram bom ajustamento para a descrição da relação do teor de FDN e do volume de enzimas utilizadas (Tabela 5; Figuras 2 e 3). Dentro de cada matriz avaliada, as diferenças entre enzimas foram de pequena magnitude, havendo, contudo, diferenças marcantes entre milho e sorgo (Tabela 5).

Tabela 3 - Estimativas do viés médio (mg/amostra) de recuperação de celulose de acordo com as diferentes combinações de tipo de enzima, volume de enzima e concentração de amido em amostras simuladas

Enzima	Volume (μ L)	Concentração de amido (g/kg) ^{1 2}				
		0	100	300	500	1000
Termamyl 2X	50	-17,1 (0,187)	-16,7 (0,198)	12,5 (0,333)	240,3 (<0,001)	153,0 (<0,001)
	100	-23,3 (0,740)	-1,9 (0,883)	13,8 (0,357)	181,2 (<0,001)	136,3 (<0,001)
	250	0,4 (0,978)	-8,8 (0,497)	0,0 (0,998)	51,5 (<0,001)	133,7 (<0,001)
	500	3,5 (0,784)	-0,1 (0,994)	12,7 (0,395)	75,4 (<0,001)	87,6 (<0,001)
AG 300L	50	-13,9 (0,283)	16,8 (0,194)	25,0 (0,055)	187,6 (<0,001)	228,6 (<0,001)
	100	-14,2 (0,271)	-1,6 (0,898)	14,3 (0,270)	210,1 (<0,001)	249,0 (<0,001)
	250	-11,7 (0,364)	-000,7 (0,957)	21,1 (0,105)	249,0 (<0,001)	224,4 (<0,001)
	500	-11,5 (0,373)	1,9 (0,883)	13,4 (0,300)	201,1 (<0,001)	224,2 (<0,001)
Liquozyme	50	-10,4 (0,422)	6,1 (0,641)	-3,7 (0,772)	64,4 (<0,001)	127,6 (<0,001)
	100	-27,3 (0,036)	5,8 (0,653)	7,1 (0,579)	75,7 (<0,001)	120,3 (<0,001)
	250	-34,0 (0,089)	7,3 (0,569)	-2,0 (0,873)	42,8 (0,001)	114,1 (<0,001)
	500	-0,8 (0,947)	-20,7 (0,111)	-6,3 (0,625)	17,1 (0,187)	75,1 (<0,001)

¹ EPM = 12,93. ² Os valores entre parêntese correspondem ao nível descrito de probabilidade para o erro tipo I, que foi associado a: $H_0: \mu = 0$ e $H_a: \mu \neq 0$.

Embora apresentando teores de FDN similares com a utilização de maiores volumes de enzimas, a ausência de amilase na análise causou maior distorção sobre a amostra de milho, com elevação de cerca de 360 g/kg sobre o teor de FDN, comparada a, aproximadamente, 100 g/kg na amostra de sorgo (Tabela 5). As amostras também diferiram no tocante à característica de hidrólise do amido, havendo, em média, maior redução do teor de FDN por volume de enzima na amostra de milho em comparação ao sorgo [aproximadamente 7 vs, 0,8 (g/kg)/ μ L]. Isso culminou com maior demanda de enzima para a correta avaliação do sorgo em comparação ao milho (Tabela 5; Figuras 2 e 3).

Discussão

A completa hidrólise e solubilização do amido presente nas amostras permite a quantificação correta dos componentes fibrosos dos alimentos (Detmann & Valadares Filho, 2010; Valente et al., 2011a), além da separação acurada entre fibra insolúvel e conteúdo celular (Van Soest, 1994).

Os métodos disponíveis para avaliação dos teores dos carboidratos incluem análises empíricas e não empíricas. Nas análises não empíricas obtêm-se compostos específicos (e.g., glicose). Por outro lado, nas análises empíricas o método empregado define o material medido, que é o caso da FDN. Para adoção das análises empíricas é essencial que o método estabelecido seja seguido precisamente ou os resultados não descreverão o que se pretende medir (Hall, 2007).

As estimativas dos teores de fibra insolúvel devem estar isentas de materiais contaminantes, como o amido. A contaminação por amido ocorre devido à sua gelatinização em meio neutro em temperaturas de 90 a 100°C (Hall, 2007), as quais são atingidas na avaliação de FDN. Com a gelatinização, o amido precipita em conjunto com os componentes

da FDN, sendo erroneamente contabilizado como componente fibroso (Van Soest et al., 1991; Mertens, 2002; Valente et al., 2011a).

Tabela 4 - Avaliação da diferença entre as enzimas considerando-se estudo aninhado às diferentes combinações volume de enzima × concentração de amido

Concentração de amido (g/kg)	Volume de enzima (µL)	Valor P ¹
0	50	0,935
0	100	0,766
0	250	0,371
0	500	0,698
100	50	0,176
100	100	0,891
100	250	0,678
100	500	0,394
300	50	0,291
300	100	0,913
300	250	0,377
300	500	0,488
500	50	<0,001
500	100	<0,001
500	250	<0,001
500	500	<0,001
1000	50	<0,001
1000	100	<0,001
1000	250	<0,001
1000	500	<0,001

¹ Diferenças entre enzimas.

As amostras simuladas com concentração de amido menor ou igual a 300 g/kg não apresentaram contaminação significativa por amido em nenhuma das enzimas ou volume de enzimas avaliado, o que pode ser comprovado pela ausência de vício significativo ($P > 0,01$) de

recuperação da celulose nestas amostras (Tabela 3). Nesta situação, a massa proporcional de amido pode ter sido adequadamente solubilizada pela solução de detergente com auxílio da hidrólise das cadeias propiciada pela ação conjunta das enzimas (independente do tipo e volume utilizado; Tabela 4).

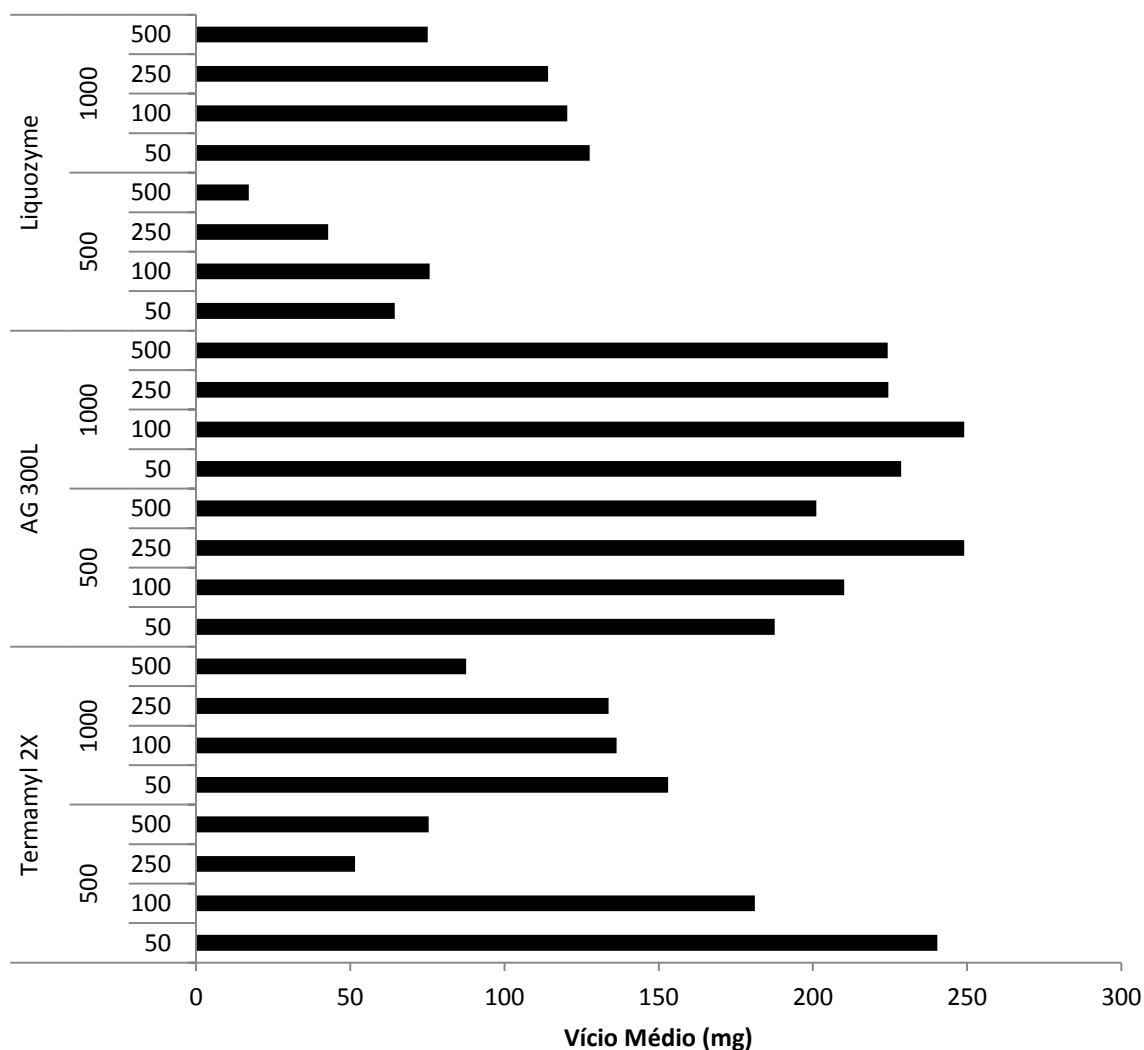


Figura 1 - Vícios médios de recuperação de celulose (mg/amostra) para os diferentes tipos e volumes de enzima considerando as concentrações de amido de 500 e 1000 g/kg em amostras simuladas.

O sistema detergente, notadamente na avaliação da fração fibrosa insolúvel em meio neutro, passou por várias alterações ao longo do tempo com o intuito de reduzir as

interferências causadas pela presença de amido (Van Soest et al., 1991). Apesar da presença de componentes adjuvantes na solução detergente (e.g., etilenoglicol monoetil éter e, posteriormente, trietilenoglicol), a principal modificação se baseou na utilização de amilase. Entretanto, algumas amilases avaliadas inicialmente continham outras atividades enzimáticas, como atividades hemicelulolítica e proteolítica (Mascarenhas-Ferreira et al., 1983). Posteriormente, enzimas produzidas por *Bacillus subtilis* foram utilizadas; mas, além de apresentar atividade hemicelulolítica, a enzima era rapidamente inativada em temperaturas elevadas (100°C). Além disso, as enzimas com atividade de clivagem das ligações α -1,6 eram cálcio-sensíveis, sendo inativadas na presença de EDTA (um componente da solução de detergente neutro; Van Soest et al., 1991). Portanto, fazia-se necessário a utilização de uma enzima estável em temperaturas elevadas, eficiente em solubilizar o amido das amostras (Cherney et al., 1989; Van Soest et al., 1991; Mertens, 2002) e que apresentasse alta especificidade, ou seja, sem a possibilidade de hidrólise de componentes não desejados (e.g., hemicelulose).

Tabela 5 - Parametrização das estimativas de concentração de fibra em detergente neutro (g/kg) em diferentes matrizes amiláceas em função do volume das enzimas (μ L) de acordo com modelo *linear-response-plateau*

Matriz	Enzima	Fase Linear ¹		Plateau ¹		s_{XY}
		\hat{F}_0	$\hat{\beta}$	V_c	\hat{F}_c	
Milho	Termamyl 2X	552,2	-7,19	49,91	193,2	17,02
	AG 300L	552,2	-7,17	49,89	194,5	10,55
	Liquozyme	552,2	-6,74	52,74	196,8	7,88
Sorgo	Termamyl 2X	290,0	-0,74	134,35	190,0	8,62
	AG 300L	284,6	-0,77	124,59	189,1	6,76
	Liquozyme	285,1	-1,04	108,43	172,1	4,52

¹ Detalhes sobre os parâmetros podem ser obtidos nas equações (1) e (2).

O uso de uma α -amilase termoestável na avaliação da fibra em detergente neutro tem sido indicado pela *AOAC International* como procedimento padrão para promover a solubilização do amido em amostras de alimentos (Mertens, 2002). Dessa forma, para a quantificação exata da fibra insolúvel é imprescindível a adição de α -amilase ou os resultados se mostrarão positivamente viesados devido à gelatinização do amido (Valente et al., 2011a). Neste contexto, de acordo com os resultados do presente estudo, as três enzimas avaliadas parecem constituir alternativa igualmente efetivas para avaliação do teor de FDN considerando-se a informação gerada a partir de amostras simuladas com baixas concentrações de amido (≤ 300 g/kg; Tabelas 3 e 4).

Contudo, considerando-se a informação gerada com amostras simuladas com altos teores de amido (500 e 1000 g/kg), verificou-se que ocorreram vieses positivos sobre a recuperação do padrão de celulose, independentemente da enzima e de seu volume (Tabelas 3 e 4; Figura 1). Essa informação seria particularmente relevante, pois as matrizes amiláceas mais comuns (milho e sorgo) possuem teores de amido intermediários a estes valores (Valadares Filho et al., 2010).

No entanto, o comportamento obtido com amostras simuladas com elevada concentração de amido (Tabelas 3 e 4; Figura 1) deve ser interpretada de forma mais minuciosa, uma vez que várias informações podem ser retiradas simultaneamente a partir dos resultados obtidos.

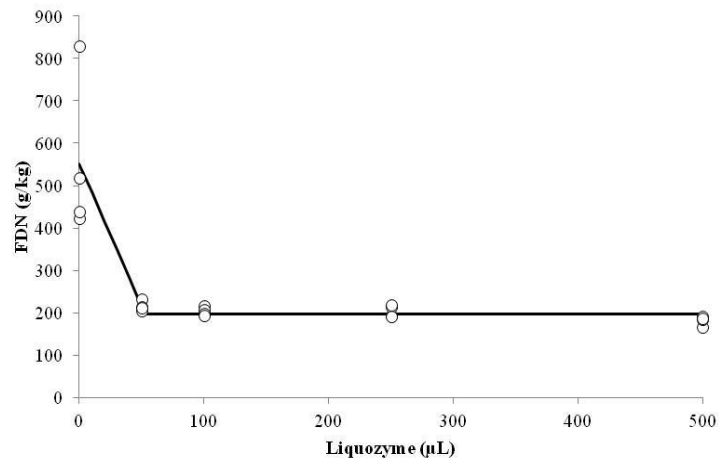
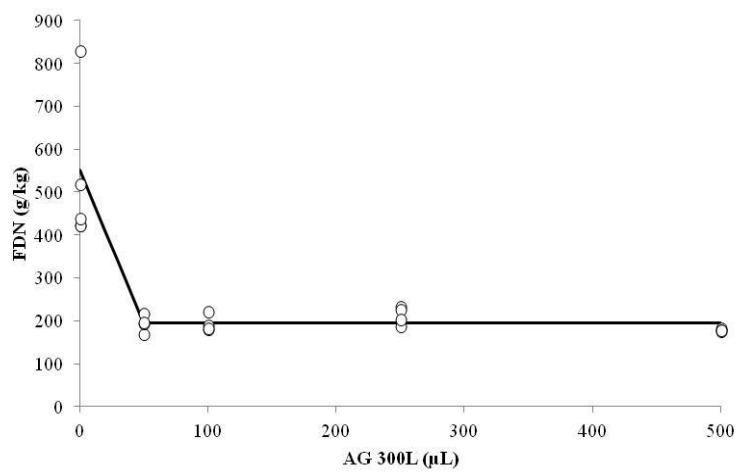
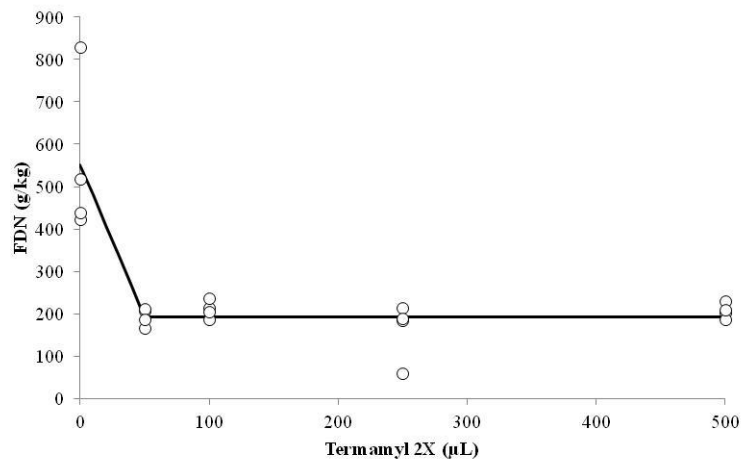


Figura 2 - Estimativas da concentração de fibra em detergente neutro (FDN) em milho de acordo com os diferentes tipos e volumes de enzimas (detalhes das funções ajustadas são mostrados nas Equações 1 e 2 e na Tabela 5).

Em primeiro lugar, releva-se a presença de diferenças relativas entre as enzimas, as quais não eram evidentes sob baixas concentrações de amido (Tabela 4; Figura 1). De forma geral, verificou-se que a enzima AG 300L apresenta menor eficiência para reduzir a contaminação por amido em relação à Termamyl 2X e à Liquozyme 2.2X (Figura 1). Esta diferença possivelmente se calca sobre a diferença de ação enzimática entre essas, uma vez que a AG 300L possui atividade amiloglicolítica, ao passo que as demais possuem atividade amilolítica (Tabela 1). A atividade amiloglicolítica possui como produto final a glicose, ou seja, constitui atividade mais complexa em relação à simples hidrólise do amido. Contudo, para evitar a interferência gravimétrica por precipitação do amido gelatinizado não há necessidade de sua conversão completa em glicose, mas somente sua hidrólise em oligopeptídeos. Logo, considerando-se condições fixas de tempo de reação/análise e de massa de amido, enzimas de ação amilolítica seriam mais eficientes em relação a enzimas amiloglicolíticas na avaliação de FDN, o que suporta os resultados obtidos com amostras simuladas (Figura 1).

Em adição, aparentemente a enzima Liquozymes 2.2X apresentou, de forma geral, vícios médios pouco inferiores aos obtidos com a Termamyl 2X (Figura 1). Contudo, isso parece refletir somente a diferença na atividade destas enzimas (Tabela 1).

Os resultados obtidos com amostras simuladas contendo alto teor de amido (Tabela 3) aparentemente contradizem aqueles obtidos com amostras de alimentos (Tabela 5; Figuras 2 e 3). As matrizes amiláceas aqui avaliadas possuem concentração de amido superior a 500 g/kg (Valadares Filho et al., 2010). Logo, a estabilidade na concentração de FDN obtida a partir de determinado volume de enzima (Figuras 2 e 3) parece não condizer com a elevação dos vícios com o incremento na concentração de amido em amostras simuladas (Tabela 3).

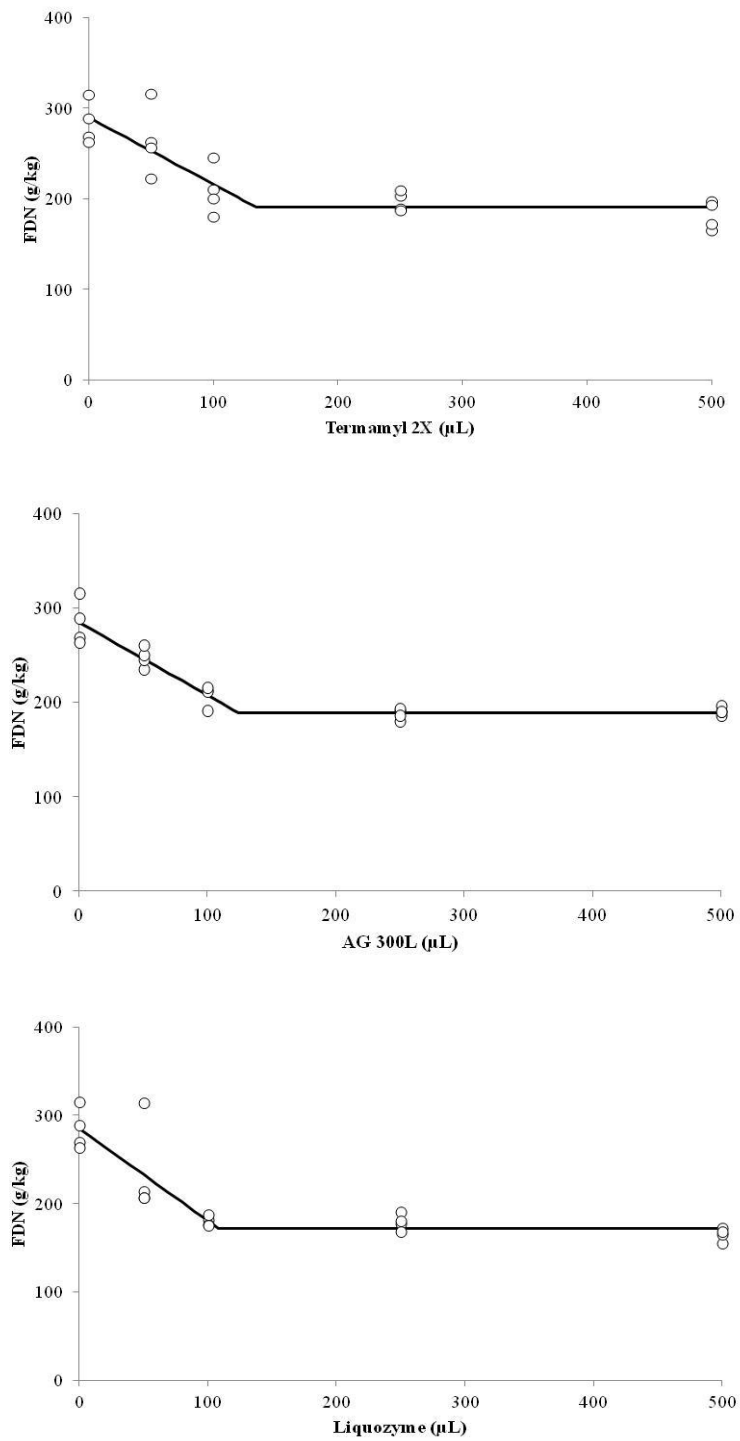


Figura 3 - Estimativas da concentração de fibra em detergente neutro (FDN) em sorgo de acordo com os diferentes tipos e volumes de enzimas (detalhes das funções ajustadas são mostrados nas Equações 1 e 2 e na Tabela 5).

Contudo, a técnica de simulação de amostras a partir de padrão de celulose possui algumas limitações intrínsecas, pois, mesmo possibilitando a avaliação de amostras de diferentes composições, esta não permite simular as interações físicas e químicas entre as moléculas na forma como observado em amostras integrais (Valente et al., 2011a; 2011b).

As moléculas de amido contidas em grãos possuem elevada interação com moléculas protéicas responsáveis pelo armazenamento dos grânulos de amido. Por outro lado, o amido utilizado em amostras simuladas é purificado. Logo, sua maior exposição poderia propiciar maior rapidez no processo de gelatinização. Em amostras integrais, a exposição do amido ocorreria de forma mais gradativa em função da solubilização das moléculas que formam a cobertura dos grânulos. Logo, o processo de gelatinização seria mais lento e a ação das amilases poderia ser realizada de forma mais gradativa. Assim, não haveria uma divergência verdadeira entre amostras simuladas e amostras reais.

Os resultados obtidos com os alimentos permitiram evidenciar que existem diferenças entre matrizes orgânicas as quais parecem refletir diferentes níveis de complexidade das moléculas de amido e das estruturas que protegem estas moléculas no grão. Isto culminou com a observação de diferenças entre milho e sorgo no tocante à redução do teor de FDN por unidade de enzima adicionada e ao volume de enzima necessário para máxima hidrólise de amido. Portanto, a complexidade apresentada nos alimentos pode influenciar a relação enzima × amostra (Tabela 5; Figuras 2 e 3).

A recomendação de diferentes volumes de enzimas para cada tipo de matriz amilácea seria interessante somente do ponto de vista técnico, mas poderia comprometer a rusticidade do método devido à ampla variação que iria ser demonstrada por um dos parâmetros da análise. Neste sentido, há de ser ressaltado que o uso de amilase em excesso é melhor do que o uso em quantidades restritas (Mertens, 2002). Assim, considerando-se os resultados aqui obtidos e as peculiaridades exibidas pelas amostras de milho e sorgo (Tabela 5; Figuras 2 e 3),

a recomendação de uso de enzimas deve ser nivelada pela maior demanda, neste caso, aquela determinada pela amostra de sorgo (aproximadamente 130 μL /amostra). Considerando-se os valores avaliados neste estudo, a aproximação superior para 130 μL corresponderia à recomendação de utilização de 250 μL de enzima por amostra, o que poderia representar certa margem de segurança caso matrizes amiláceas de maior resistência à hidrólise sejam analisadas.

Adicionalmente, o uso de excesso de enzima deve ser evitado, pois, caso ocorra, pode ser observada retrogradação da hidrólise do amido. Assim, a quantidade de enzima a ser utilizada não deve ultrapassar em cinco vezes o mínimo necessário para hidrólise do amido da amostra (Mertens, 2002). Considerando-se as demandas observadas para a amostra de milho (aproximadamente 50 μL por amostra), a recomendação de 250 μL poderia ser considerada adequada.

Conclusão

Para a avaliação dos teores de fibra em detergente neutro recomenda-se o uso das enzimas α -amilases Termamyl 2X e Liquozyme 2.2X com atividades de 240 e 300 KNU/g, respectivamente, em volumes de 250 μL para amostras de massa variando de 0,7 a 1,0 g.

Referências

- CHERNEY, D.J.R.; PATTERSON, J.A.; CHERNEY, J.H. Use of 2-ethoxyethanol and α -amilase in the neutral detergent fiber method of feed analysis. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.3079-3084, 1989.
- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.S.; QUEIROZ, A.C. et al. (Eds.) **Novilhas leiteiras**. Fortaleza: Graphiti, 2010. p.253-302.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.980-984, 2010.

- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- FERREIRA, G.; MERTENS, D.R. Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, p.335–340, 2007.
- HALL, M.B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.359-367, 2007 (Suplemento).
- 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 beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- UNDERSANDER, D.; MERTENS, D.R.; THIEX, N. **Forage analyses procedures**, Omaha: National Forage Testing Association, 1993. 139p.
- VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, P.A.S.; CHIZZOTTI, M.L. et al. (Eds.) **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos CQBAL 3.0**. 3 ed. Viçosa: DZO-UFV, 2010. 502p.
- VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. 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, 2011a.
- VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. 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.1148-1154, 2011b.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- Van SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds, IV, Determinations of plant cell wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.50, p.50-55, 1967.
- 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.

Variabilidade entre animais em procedimento *in situ* para estimação da fração indegradável da fibra de alimentos volumosos¹

Resumo - Objetivou-se avaliar a variabilidade entre animais sobre o tempo crítico necessário para estimação da fração indegradável da fibra em procedimento de incubação *in situ* em bovinos. Para obtenção do perfil de degradação da fibra insolúvel foram utilizados cinco bovinos fistulados no rúmen com peso corporal médio de 350 kg. Os animais foram alimentados com dieta padrão com relação volumoso:concentrado de 80:20, com base na matéria seca. A ração foi constituída por capim-elefante *in natura* e concentrado comercial. Os animais foram adaptados à dieta e às condições experimentais por 12 dias previamente à incubação. Foram avaliadas amostras de cana-de-açúcar *in natura*, feno de capim-braquiária, silagem de milho e capim elefante *in natura*. As amostras foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®). Os sacos foram incubados no rúmen dos animais utilizando-se os seguintes tempos: 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Em cada tempo foi incubado um saco de cada amostra em cada animal, totalizando 300 avaliações. Não foram verificadas variações significativas entre animais quanto à taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido para a silagem de milho, feno de capim-braquiária e para a cana-de-açúcar. Contudo, variabilidade significativa foi verificada sobre a amostra de capim-elefante *in natura*. Os resultados deste estudo parecem sugerir que a variabilidade entre animais quanto à taxa de degradação de componentes fibrosos é significativa. Contudo, devido ao tamanho limitado da amostra utilizada (n = 5), sugere-se a condução de novos estudos para confirmação desta hipótese e, em caso afirmativo, para a definição de estratégias experimentais para obtenção da concentração de componentes indegradáveis em alimentos de forma exata e precisa.

Palavras chave: degradação ruminal, FDN_i, FDA_i, indicadores internos

¹ Artigo formatado segundo as normas da **Revista Brasileira de Zootecnia**.

Introdução

Em termos nutricionais, a degradação ruminal de um alimento pode ser avaliada por intermédio dos conceitos de potencialidade e efetividade. O primeiro termo refere-se aos limites de degradação ruminal que são definidos pelas características do alimento em si, sendo esta uma característica assintótica. Entretanto, a degradação do alimento ocorre em escalas de tempo finitas e não é determinada apenas por sua composição química, mas depende da ação dos sistemas enzimáticos durante o tempo no qual a interação enzima × substrato ocorre, ou seja, da efetividade do processo de degradação (Detmann et al., 2008).

Neste contexto, a adequação do ambiente ruminal ao crescimento microbiano passa a constituir fator determinante para a utilização dos substratos (Detmann et al., 2008; 2009). Diversas características podem afetar a adequação do sistema ruminal para o crescimento microbiano, destacando-se a qualidade do substrato, pH, taxa de diluição e sincronismo entre o fornecimento de carboidratos e proteínas (Bach et al., 2005). Contudo, algumas características inerentes ao hospedeiro podem ser determinantes para a eficiência do processo de degradação.

Considerando-se animais com peso corporal semelhante e recebendo a mesma dieta, geralmente esperam-se desempenhos similares. Contudo, muito se tem observado em termos de animais que, mesmo sendo similares e estando submetidos à mesmas condições, apresentam respostas completamente diferentes de seu grupo. Isso levanta a possibilidade de haver interferência significativa do efeito animal sobre características de utilização do alimento. Existem relatos na literatura sobre a especificidade do hospedeiro quanto à população bacteriana no rúmen. Nestes casos, mesmo havendo a quase completa troca do conteúdo ruminal entre animais, a população microbiana nativa do animal se restabelece novamente, comprovando a especificidade do animal hospedeiro quanto à composição da comunidade microbiana (Weimer et al., 2010).

Neste contexto poderia se esperar que as avaliações do perfil de degradação ruminal dos alimentos apresentassem influência da composição da comunidade microbiana específica do animal. Estas influências podem ser particularmente relevantes para os ensaios de degradação *in situ*, os quais nem sempre são organizados de acordo com delineamentos experimentais que poderiam permitir o controle do efeito animal sobre as estimativas obtidas.

Esta variabilidade entre animais poderia gerar comprometimento mais proeminente quando as frações indegradáveis da fibra insolúvel em detergente neutro (FDNi) ou ácido (FDAi) são avaliadas para uso como indicadores internos. Nestes procedimentos, tempo único de incubação é adotado (Casali et al., 2008; Valente et al., 2011a) e, não raras vezes, o procedimento é conduzido em um único animal. Dessa forma, poderia se especular que os animais menos eficientes em manter sua população microbiana ou animais com população microbiana menos aptas a degradar a fibra demandariam maior tempo de incubação para estimação acurada da fração indegradável. Caso não haja antecipação deste efeito, as concentrações dos teores dos indicadores podem ficar superestimadas, gerando viés sobre as estimativas de excreção fecal, fluxo de digesta ou consumo de pasto.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a variabilidade entre animais sobre o tempo crítico necessário para estimação da fração indegradável da fibra em procedimento de incubação *in situ* em bovinos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências dos Laboratórios de Animais e de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Para obtenção do perfil de degradação da fibra insolúvel foram utilizados cinco bovinos Nelore, castrados, fistulados no rúmen com peso corporal médio de 350 kg. Os

animais foram alimentados com dieta padrão com relação volumoso:concentrado de 80:20, com base na matéria seca (MS). A ração foi constituída por capim-elefante *in natura* e concentrado comercial contendo 280 g de proteína bruta (PB) por kg de MS. A dieta completa apresentava, aproximadamente, 112 g PB/kg MS. Os animais foram adaptados à dieta e às condições experimentais por 12 dias previamente à incubação. Mistura mineral contendo 90 g/kg de fósforo foi disponibilizada *ad libitum*.

Foram avaliadas amostras de cana-de-açúcar *in natura*, feno de capim-braquiária, silagem de milho e capim-elefante *in natura*, sendo todas obtidas no município de Viçosa, MG. As amostras úmidas foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C) e, em conjunto com a amostra de feno, processadas em moinho de facas (1 e 2 mm; Valente et al., 2011b)

As avaliações químicas foram realizadas nas amostras processadas a 1 mm, sendo quantificados os teor de MS (método INCT-CA G-003/1), matéria mineral (método INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB; método INCT-CA N-001/1), fibra em detergente neutro (FDN; método INCT-CA F-002/1) e fibra em detergente ácido (FDA; método INCT-CA F-004/1) seguindo-se as recomendações de Detmann et al. (2012) (Tabela 1).

As amostras processadas a 2 mm foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®) seguindo-se a proporção de 20 mg de matéria seca/cm² de superfície. Os sacos foram então incubados no rúmen dos animais utilizando-se os seguintes tempos: 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Em cada tempo foi incubado um saco de cada amostra em cada animal, totalizando 300 avaliações. Os sacos foram dispostos no rúmen em ordem reversa quanto ao tempo de incubação, de modo que sua retirada ocorresse simultaneamente.

Previamente aos procedimentos de incubação os sacos foram lavados com solução de detergente neutro comercial em ebulição, água quente e acetona; secos e pesados conforme o procedimento descrito anteriormente para se obterem as taras (Detmann et al., 2012).

Após a retirada do rúmen, os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento desta, sendo levemente pressionados com as mãos para auxiliar na retirada do material solúvel.

Tabela 1 - Composição química dos alimentos

Alimento	Item ¹					
	MS ²	MM ³	PB ³	EE	FDN ³	FDA ³
Cana-de-açúcar	296,0	30,5	26,5	1,50	602,9	336,0
Feno de braquiária	887,7	54,5	36,7	1,93	824,1	432,6
Silagem de milho	312,6	49,8	72,7	2,75	558,0	312,2
Capim-elefante	214,1	87,9	70,2	2,13	779,1	461,9

¹MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido. ² g/kg de matéria natural. ³ g/kg de matéria seca.

Os sacos contendo os resíduos de incubação foram então acondicionados em potes de polietileno, adicionando-se a estes a solução de detergente neutro seguindo-se a proporção de 100 mL/g de amostra. Os potes foram vedados e autoclavados por 1 hora a 105°C (Método INCT-CA F-002/1; Detmann et al., 2012). Após a extração, foram realizadas lavagens sequenciais com água destilada quente e acetona. Os sacos foram então secos em estufa com ventilação forçada (60°C/48 horas) e, sequencialmente, em estufa não ventilada (105°C/2 horas), acondicionados em dessecador e pesados. Posteriormente, procedeu-se à extração sequencial com detergente ácido seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para a extração com detergente neutro (Método INCT-CA F-004/1; Detmann et al., 2012).

A modelagem dos perfis de degradação da FDN e da FDA foi conduzida pressupondo-se que as dimensões das frações potencialmente degradável e indegradável da fibra

constituem características intrínsecas ao alimento e que a taxa de degradação é influenciada tanto pelas características do alimento, quanto pelas características do ambiente de degradação (Detmann et al., 2008). Neste último caso, buscou-se verificar a diferença entre animais (i.e. diferentes ambientes) mantidos sob as mesmas condições de alimentação.

Sob estas pressuposições, os perfis de degradação foram interpretados utilizando-se abordagem de modelos não lineares mistos com base no modelo exponencial de primeira ordem:

$$Y_{ij} = B \times e^{\{-[kd(\pm u)] \times t\}} + I + \varepsilon_{ij} \quad (1);$$

em que: Y_{ij} = resíduo de degradação medido no animal i no tempo j (g/100 g); B = fração potencialmente degradável (g/100 g); kd = taxa fracional de degradação (parâmetro aleatório; h^{-1}); u = parâmetro de efeito aleatório desconhecido associado a kd pressuposto de distribuição normal com média zero e variância constante; I = fração indegradável (g/100 g); e ε_{ij} = erro aleatório pressuposto assintoticamente NID (0; σ^2) e independente de u . O modelo foi ajustado aos dados por intermédio do procedimento NLMIXED do SAS (versão 9.1).

De acordo com a aproximação probabilística sugerida por Casali et al. (2008), o tempo crítico (t_c) necessário para se estimar a fração indegradável (valor assintótico), considerando-se o modelo descrito na equação (1), seria dado por:

$$t_c = \frac{\ln\left(\frac{LSI - I}{B}\right)}{-kd} \quad (2);$$

em que: t_c = tempo crítico para se estimar a assíntota com confiança (h ; $1-\alpha = 0,05$); LSI = limite superior do intervalo de confiança assintótico para a fração I (g/100 g). Os demais termos foram previamente definidos.

Considerando a aproximação probabilística para t_c apresentada na equação (2) em conjunto com o componente aleatório u associado a kd (Equação 1), realizou-se análise de

sensibilidade para a influência do meio sobre k_d e, conseqüentemente, sobre t_c , utilizando a técnica de simulação de Monte Carlo.

A análise de sensibilidade foi realizada por intermédio do software @Risk for Excel 5.5.1 (*Palisade Corporation*) utilizando 1000 interações por alimento e fração (FDNi ou FDAi). Concordando com as suposições previamente apresentadas, os parâmetros B e I foram mantidos fixos e a variabilidade do parâmetro k_d foi simulada baseada em uma função densidade probabilidade.

Para estimação dos perfis de degradação, assumiu-se pelo procedimento NLMIXED que o parâmetro aleatório u apresentasse distribuição normal. Contudo, isso corresponde a uma inconsistência biológica, pois definiria os limites inferior e superior de u iguais a $\pm \infty$, o que poderia acarretar em estimativas de k_d negativas. De modo a contornar esta inconsistência, assumiu-se que u seguiria distribuição lognormal. Assim como a distribuição normal, a distribuição lognormal apresenta dois parâmetros μ e σ^2 ; no entanto, por transformação logarítmica, a variável aleatória assume apenas valores maiores que zero (Tijms, 2007).

Os valores simulados de k_d foram inseridos na equação (2) propiciando a formação de uma amostra aleatória de valores de t_c ($n = 1000$). Por intermédio do software @Risk procedeu-se ao teste de adequação de diversas funções densidade probabilidade para descrição populacional do parâmetro t_c . A discrepância entre a função densidade probabilidade ajustada e os valores de cada amostra foi mensurado por intermédio da estatística χ^2 . A função densidade probabilidade escolhida foi aquela que propiciou o menor valor de χ^2 entre todas as distribuições avaliadas.

Resultados e Discussão

Não foram verificadas variações significativas entre animais ($P>0,10$) quanto à taxa fracional de degradação da FDN e da FDA para a silagem de milho, feno de capim-braquiária e para a cana-de-açúcar. Neste caso, nenhuma simulação foi conduzida para os valores de t_c devido à não significância ($P>0,10$) do parâmetro u (Equação 1). Assumindo-se k_d como invariante entre animais, foram obtidas estimativas médias únicas para t_c . Com exceção da fração FDA_i da cana-de-açúcar, as estimativas obtidas (Tabelas 2 e 3) seriam compatíveis com as sugestões de métodos para avaliação de frações indegradáveis em procedimento de incubação com tempo único sugeridos no Brasil (Casali et al., 2008; Valente et al., 2011a).

Tabela 2 - Características do perfil de degradação da fibra em detergente neutro para os diferentes alimentos

Item ¹	Alimento			
	Cana	Feno	Silagem de milho	Capim elefante
B (g/100 g)	47,66	64,69	68,89	68,53
I (g/100 g)	52,34	35,31	31,36	31,46
LSI (g/100 g)	53,88	36,91	33,85	34,26
DPA (g/100 g)	2,51	2,92	3,88	4,65
k_d (h^{-1})	0,0207	0,0375	0,0194	0,0216
u (h^{-1})	0,000017	0,001000	$7,38 \times 10^{-6}$	0,000032
Valor P^2	0,3843	0,2804	0,2857	0,0759
t_c (h)	165,8	98,7	171,1	---

¹ B = fração potencialmente degradável; I = fração indegradável; LSI = limite superior do intervalo de confiança de I; DPA = desvio padrão assintótico; k_d = taxa fracional de degradação; u = componente de variância aleatória associado a k_d . ² Nível descritivo de probabilidade associado à avaliação da significância de u .

A estimativa elevada de t_c para a avaliação da fração FDA_i da cana-de-açúcar (364,0 horas) reflete a baixa taxa de degradação estimada ($0,0087 h^{-1}$). Contudo, considerando-se que a FDA está contida na FDN, estes valores parecem ser irrealistas quando avaliados em conjunto

com as estimativas associadas à FDN da cana-de-açúcar (Tabela 2). Divergências entre tc para obtenção das frações FDNi e FDAi foram relatadas por Casali et al. (2008). Detmann et al. (2007) relataram que a avaliação de resíduos de degradação da FDA tende a apresentar menor precisão em comparação à avaliação de resíduos de degradação da FDN devido à menor massa, o que tornaria mais relevantes os erros associados às quantificações gravimétricas. Isso poderia justificar ao menos parte da distorção sobre o perfil de degradação da FDA da cana-de-açúcar e que não teria sido relevante sobre o perfil de degradação da FDN deste alimento.

Tabela 3 – Características do perfil de degradação da fibra em detergente ácido para os diferentes alimentos

Item ¹	Alimento			
	Cana	Feno	Silagem de milho	Capim elefante
B (g/100 g)	54,09	61,21	65,58	70,63
I (g/100 g)	45,91	38,79	34,42	29,37
LSI (g/100 g)	48,19	42,97	40,95	33,61
DPA (g/100 g)	5,46	7,81	6,55	5,64
kd (h ⁻¹)	0,0087	0,0365	0,0194	0,0185
u (h ⁻¹)	1,44 × 10 ⁻⁶	0,002077	3,18 × 10 ⁻⁶	0,000043
Valor P ²	0,4719	0,3807	0,3622	0,0165
tc (h)	364,0	73,5	118,9	---

¹ B = fração potencialmente degradável; I = fração indegradável; LSI = limite superior do intervalo de confiança de I; DPA = desvio padrão assintótico; kd = taxa fracional de degradação; u = componente de variância aleatória associado a kd. tc = tempo crítico para estimação da assíntota. ² Nível descritivo de probabilidade associado à avaliação da significância de u.

Por outro lado, verificou-se significância para o parâmetro u na avaliação do capim-*in natura* tanto em termos de FDN (P<0,08; Tabela 2) como de FDA (P<0,02; Tabela 3). A partir da técnica de Monte Carlo foram produzidas amostras de kd para FDN e FDA, as

quais propiciaram a construção de amostras de t_c . A estas amostras foram ajustadas distribuições lognormal e gaussiana inversa, respectivamente (Tabela 4; Figura 1).

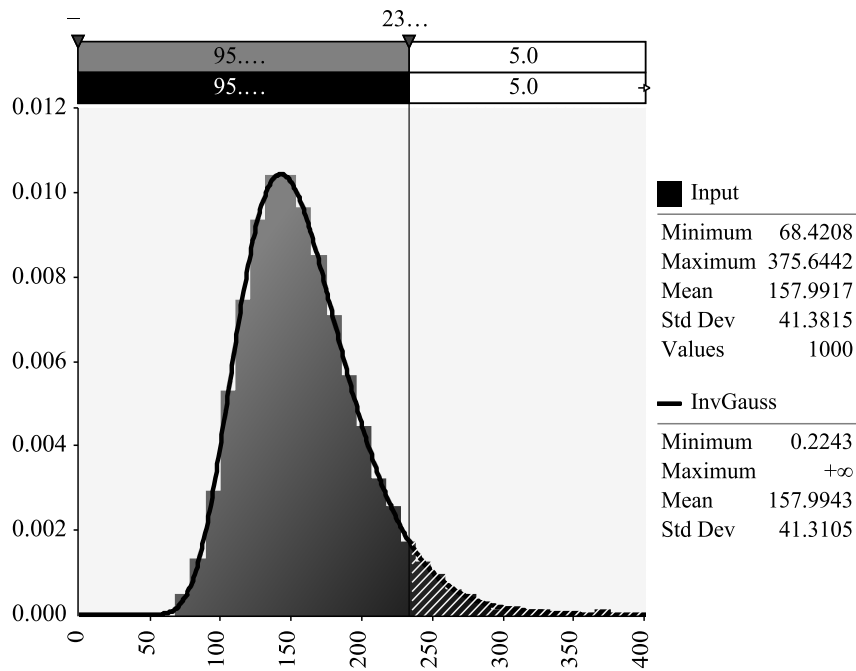
Tabela 4 - Caracterização dos valores simulados para o tempo crítico de incubação necessário para estimação da fração indegradável da fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) em capim-elefante

Item	Fração	
	FDN	FDA
Dados Simulados		
Média	157,99	170,91
Mínimo	68,42	49,44
Máximo	375,64	496,91
s	41,38	60,41
n	1000	1000
Ajustamento		
Distribuição	Gaussiana inversa	Lognormal
μ	157,99	170,91
σ	41,31	60,47
t_c (95%) ¹	233,6	283,5
χ^2	0,326	0,210

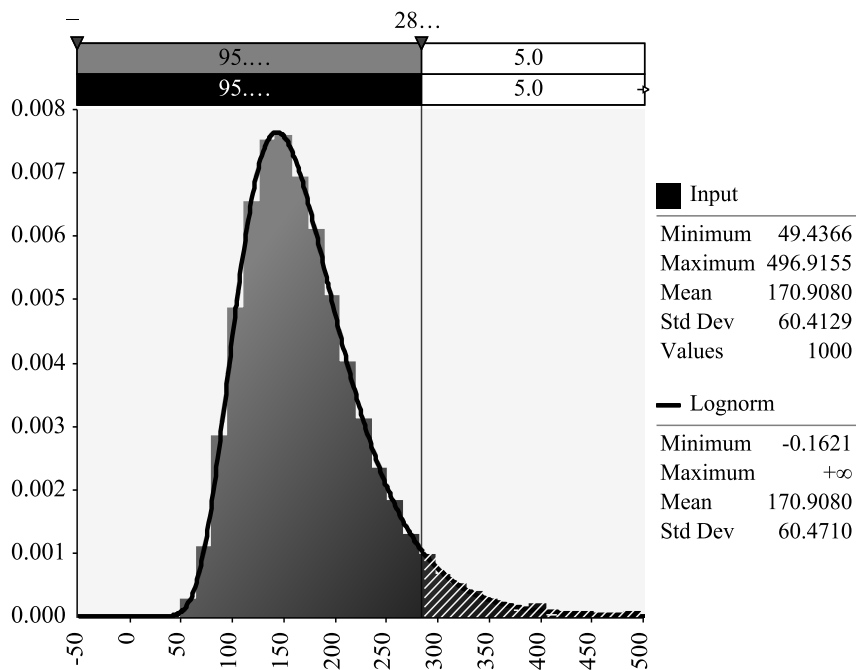
¹ Valor referente ao percentil 95 para a distribuição de t_c .

Considerando-se as distribuições de probabilidade, foram estimados os valores de t_c equivalentes ao percentil 95 da distribuição. Em outras palavras, este representa o valor de t_c que, caso recomendado como procedimento experimental, propiciaria a estimação acurada da fração indigestível para 95% da população de animais. Isso somente é possível devido ao fato de a fração indegradável constituir conceito assintótico (Detmann et al., 2008). Assim, o procedimento de estimação não seria afetado pela utilização de tempos de incubação superiores a t_c (Casali et al., 2008). Os valores obtidos foram de 233,6 e 283,5 horas para FDN_i e FDA_i, respectivamente. Neste caso, o maior valor (283,5 horas) mostra-se compatível

com o tempo de incubação sugerido por Valente et al. (2011a) para avaliação da fração FDNi utilizando-se sacos F57 (288 horas).



(a)



(b)

Figura 1 - Distribuições de probabilidade para os tempos críticos necessários para estimação da fração indegradável da fibra em detergente neutro (a) e fibra em detergente ácido (b) em capim-elefante *in natura*.

Os resultados obtidos com as amostras de capim-elefante evidenciam diferenças entre animais no tocante à taxa de utilização da fibra no rúmen (Tabelas 2 e 3). A diversidade de microrganismos capazes de colonizar o rúmen ainda não está bem estabelecida, havendo relatos de mais de 2000 espécies de bactérias (Firkins, 2010). Muitas dessas espécies bacterianas utilizam os mesmos substratos como fonte de nutrientes e podendo também gerar produtos similares ou não (Edwards et al., 2008). Adicionalmente, a composição da comunidade bacteriana é específica para cada animal (Weimer et al., 2010).

Diferenças entre animais no tocante à capacidade de manutenção de características físico-químicas do rúmen foram também relatadas. A capacidade em controlar o pH ruminal desenvolvida por alguns animais permite sua sobrevivência, mesmo recebendo dietas com 90% de concentrado (Russell & Rychlik, 2001). Considerando-se a diversidade entre animais quanto à população microbiana (Weimer et al., 2010) associada ao fato de a reciclagem de nitrogênio ser parcialmente controlada por relações de simbiose com microrganismos (Waterlow, 2006), entende-se que animais similares podem ser diferentes em termos de eficiência de conservação do nitrogênio no organismo.

A variabilidade entre animais observada com relação à amostra de capim-elefante pode ser considerada um indicativo de que esta variabilidade seja também significativa para os demais alimentos aqui avaliados. Contudo, a não observação de significância poderia ser atribuída à pequena amostra utilizada ($n = 5$). O baixo número de animais utilizado neste estudo se atribui à dificuldade de se utilizar grande número de animais fistulados e de estes serem similares o suficiente para avaliação de diferenças entre estes sem confundimentos atribuídos a fatores externos.

Considerando-se que a variabilidade entre animais seja real, gera-se automaticamente a idéia de que existe a necessidade do correto estabelecimento de controle experimental seguindo-se os princípios básicos da experimentação para que as estimativas de concentração

de componentes indegradáveis e, talvez, de perfis de degradação sejam obtidas sem viés e com precisão adequada aos objetivos do estudo. No entanto, mais estudos para avaliação da variação entre animais são sugeridos para confirmação ou não do comportamento aqui obtido e evidenciado com a amostra de capim-elefante *in natura*.

Conclusão

Os resultados deste estudo parecem sugerir que a variabilidade entre animais quanto à taxa de degradação de componentes fibrosos é significativa. Contudo, devido ao tamanho limitado da amostra utilizada, sugere-se a condução de novos estudos para confirmação desta hipótese e, em caso afirmativo, para a definição de estratégias experimentais para obtenção da concentração de componentes indegradáveis em alimentos de forma exata e precisa.

Referências

- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.E9–E21, 2005. (Electronic Supplement)
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.335-342, 2008.
- DETMANN, E.; SOUZA, A.L.; GARCIA, R. et al. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.182-188, 2007.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação 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.21-51.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C. et al. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136-146, 2009.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- EDWARDS, J.E.; HUWS, S.A.; KIM, E.J. et al. Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. **Animal**, v.5, p.653-660, 2008.

- FIRKINS, J.L. Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.445-457, 2010 (Suplemento).
- RUSSELL, J.B., RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v.292, p.1119-1122, 2001.
- TIJMS, H.C. **Understanding probability: chance rules in everyday life**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 452p.
- VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. 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, 2011a.
- VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. 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.1148-1154, 2011b.
- WATERLOW, J. C. **Protein Turnover**. Cambridge: CAB International, 2006. 301p.
- WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MANTOVANI, H.C. et al. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5902-5912, 2010.