

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS
EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E
FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE
RESÍDUOS QUÍMICOS**

Maria do Socorro Nahuz Lourenço
Química Industrial

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS
EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E
FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE
RESÍDUOS QUÍMICOS**

Maria do Socorro Nahuz Lourenço

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadora: Dra. Ana Paula de Oliveira Sader

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia (Produção Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro – 2010

Lourenço, Maria do Socorro Nahuz
L892e Estudo Comparativo de Metodologias aplicadas em análises de
fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido com
gerenciamento de resíduos químicos / Maria do Socorro Nahuz
Lourenço. – – Jaboticabal, 2010
viii, 100 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Telma Teresinha Berchielli
Banca examinadora: Ricardo Andrade Reis, Euclides Braga
Malheiros, José Ricardo Soares Telles de Souza, Paulo Henrique
Moura Dian
Bibliografia

1. custos operacionais. 2. métodos alternativos. 3. parede celular.
4. precisão. 5. resíduos químicos. 6. reutilização de soluções. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS

AUTORA: MARIA DO SOCORRO NAHUZ LOURENÇO

ORIENTADORA: Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA PAULA DE OLIVEIRA SADER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO SOARES TELLES DE SOUZA

Departamento de Zootecnia / Universidade Estadual do Maranhão / São Luis/MA

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE MOURA DIAN

Departamento de Zootecnia / Unicastelo / Descalvado/SP

Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. EUCLIDES BRAGA MALHEIROS

Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 02 de dezembro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA DO SOCORRO NAHUZ LOURENÇO – filha de Nelson Choairy Nahuz e Maria Antonieta Ribeiro Nahuz, nascida em São Luís – Maranhão, no dia 19 de fevereiro de 1965. Concluiu o curso de graduação em Química Industrial na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) em 1987. Obteve o título de Especialista em Química do Meio Ambiente em 1994 e de Mestre em Química Analítica, em 1997, pelo programa de pós - graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia em março de 2008, pelo programa de pós - graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli. É Professora Assistente IV do Departamento de Química e Biologia da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), tendo como linhas de pesquisa Química de Alimentos e Química Ambiental.

Ao meu Deus - minha rocha, segurança, consolo, abrigo, força e refúgio. Deus fiel, justo, perfeito, misericordioso, compassivo, amoroso, perdoador, bondoso, infinito, pessoal. A Ele, toda honra, toda glória, todo o louvor!

DEDICO

Mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida.

(Isaías 40: 31; Salmo 23: 6a)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar os meus passos conduzindo-me sempre pelo caminho correto e seguro.

À Universidade Estadual do Maranhão, aos Departamentos de Zootecnia e Química e Biologia pela oportunidade de realização deste curso.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Departamento de Zootecnia.

A todos os coordenadores do DINTER pelo tempo investido e pelo apoio.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amigos do DINTER, pelo convívio e amizade conquistada, em especial a Silvana, João, Roberto e Gonçalo pela convivência próxima nestes meses em Jaboticabal.

Aos colegas e companheiros do Laboratório de Nutrição Animal (UNESP), meu sincero agradecimento por tudo que vivi com vocês.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal (UNESP), em especial ao Sr Orlando, sempre fazendo tudo que estivesse ao seu alcance para ajudar, à Magali e a Adriana, pelo convívio diário e ajuda proporcionada.

À Dra Roberta Canesin pelo apoio e amizade.

À minha orientadora Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli pela acolhida, orientação segura, atenção, ensinamentos e tempo dedicado.

A minha co-orientadora Dra. Ana Paula de Oliveira Sader pela atenção, sugestões, cuidado e carinho dispensados em todas as etapas deste trabalho e pelo convívio diário e amigo no laboratório.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros por ser um exemplo não só como profissional, mas como pessoa, acessível, amigo e incansável na contribuição deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis pela contribuição efetiva durante o exame de qualificação e pelas discussões posteriores.

Ao Prof. Dr. Ricardo Telles e Prof. Dr. Paulo Dian por aceitarem o convite de participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões dadas a este trabalho.

Aos meus pais Nelson e Antonieta, por tanto incentivo, doação, cuidado, carinho, dedicação e amor, por estarem sempre presentes em minha vida, me ensinando a cada dia e permitindo que eu desfrute do privilégio de tê-los como pais e amigos.

A minha avó Socorro por todo o amor dispensado a mim em todos os dias da minha vida, pela presença marcante e apoio em todos os momentos.

Ao meu marido Eliel, meu porto seguro, em quem posso confiar e contar em todos os momentos. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelo cuidado e pelo amor dedicados a mim. Esta vitória é nossa por sermos um em Deus.

Aos meus irmãos Jorge (e Iara), Fabio e Nelson Júnior (e Mary), presentes de Deus, o meu agradecimento pelo privilégio de tê-los como irmãos e melhores amigos.

Aos meus sobrinhos Carol, Jorge, Nelson Neto, Lucas e Rebeca que são a expressão do amor de Deus.

A minha amiga e irmã querida Edileusa por existir em minha vida, participando dela em todos os momentos, pelo carinho, convívio e cumplicidade em todos estes anos.

Aos meus amigos Celso, Ester, Suelma, Priscila e Sofia que sempre torceram por mim, me incentivando e apoiando sempre.

E a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Mínha eterna gratidão

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
CAPÍTULO 1 .– CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 <i>Fibras na alimentação de ruminantes</i>	1
1.2 <i>Metodologias para análises de fibras</i>	2
1.3 <i>Alimentos na nutrição de ruminantes</i>	13
1.4 <i>Impacto ambiental e gestão de resíduos</i>	18
CAPÍTULO 2 – ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO	22
RESUMO.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 <i>Local e época</i>	29
2.2 <i>Amostras</i>	29
2.3 <i>Preparo das amostras</i>	30
2.4 <i>Preparo dos reagentes analíticos</i>	31
2.5 <i>Tratamentos</i>	32
2.6 <i>Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método convencional</i>	32
2.7 <i>Métodos alternativos com uso da autoclave</i>	35
2.8 <i>Determinação dos teores de FDN e FDA pelos métodos alternativos 1 e 2</i>	36
2.9 <i>Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método alternativo 3</i>	39
2.10 <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 <i>Avaliação do descarte de resíduos químicos em análises de FDN e FDA pelos métodos convencional e alternativos</i>	42

3.2 Avaliação quantitativa das diferentes metodologias propostas para análise de FDN e FDA.....	44
4. CONCLUSÕES.....	52
CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS.....	
RESUMO.....	53
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 Local e época.....	59
2.2 Amostras e reagentes.....	59
2.3 Tratamentos.....	60
2.4 Recuperação das soluções detergentes.....	60
2.5 Recuperação da acetona.....	61
2.6 Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método convencional.....	63
2.7 Métodos alternativos com uso da autoclave.....	65
2.8 Determinação dos teores de FDN e FDA pelos métodos alternativos 1 e 2.....	66
2.9 Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método alternativo 3.....	68
2.10 Delineamento experimental e análise estatística.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1 Recuperação das soluções detergentes.....	70
3.2 Recuperação da acetona.....	72
3.3 Avaliação quantitativa dos teores de FDN e FDA com uso das soluções detergentes recuperadas.....	74
4. CONCLUSÕES.....	84
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES.....	
REFERÊNCIAS.....	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO.....	22
Tabela 1. Valores médios obtidos na pré-secagem (1ªMS) e secagem definitiva (2ª MS)	31
Tabela 2. Volumes médios (Vm) gastos de soluções detergentes e acetona e desvios padrão/metodologia.....	42
Tabela 3. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDN nos alimentos analisados.....	44
Tabela 4. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, formas e métodos estudados na avaliação dos teores de FDN.....	45
Tabela 5. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDA nos alimentos analisados.....	48
Tabela 6. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, formas e métodos estudados na avaliação dos teores de FDA.....	49
CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS.....	53
Tabela 1. Valores médios de pH e desvios padrão das soluções detergentes neutra e ácida utilizadas nas análises de FDN e FDA, considerando as formas de análises - não- sequencial (NS) e sequencial (S), os métodos - MTC– método convencional; MTA ₁ – método alternativo 1; MTA ₂ – método alternativo 2 ; MTA ₃ – método alternativo 3 e as utilizações das soluções - solução original (SO) e solução recuperada (SR).....	61
Tabela 2. Volumes médios (Vm) gastos de acetona em uma repetição analítica e desvios padrão/metodologia.....	62

Tabela 3. Valores de mercado dos reagentes químicos utilizados em análises de FDN.....	71
Tabela 4. Valores de mercado dos reagentes químicos utilizados em análises de FDA.....	72
Tabela 5. Volumes médios (Vm) gastos de acetona/metodologia.....	73
Tabela 6. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDN nos alimentos estudados.....	74
Tabela 7. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, utilização e métodos estudados na avaliação dos teores de FDN	75
Tabela 8 Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDA nos alimentos estudados...	78
Tabela 9. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, utilização e métodos estudados na avaliação dos teores de FDA.....	80

ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS

RESUMO – Foram realizados dois experimentos, objetivando-se avaliar quantitativamente diferentes metodologias propostas em análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), visando à precisão dos resultados analíticos, a redução nos custos e no tempo das análises, bem como a minimização no descarte de resíduos químicos. Foram utilizados seis alimentos de uso corrente na alimentação animal: feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), silagem de milho (*Zea mays* L.), capim-xaraés (*Brachiaria brizanta* cv. *Xaraés*), capim-marandu (*Brachiaria brizanta* cv. *Marandu*) e um concentrado protéico, o farelo de babaçu (*Orbignya phalerata*). No primeiro experimento foram comparados os teores de FDN e FDA obtidos pelo método convencional com três métodos alternativos que utilizam a autoclave como sistema digestor e no segundo experimento foi avaliada a possibilidade de reutilizar, por uma vez, as soluções detergentes e a acetona recuperada, utilizadas no desenvolvimento das primeiras análises. O delineamento experimental utilizado na análise de cada alimento foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4x2 (4 metodologias e 2 formas de análises), no primeiro experimento e 2x4x2 (2 utilizações, 4 metodologias e 2 formas de análises), no segundo experimento. Observou-se que a implantação das metodologias alternativas permitiu ganhos significativos com a redução dos custos operacionais e do tempo da análise, minimizando os impactos ambientais. A precisão analítica dos métodos alternativos variou entre os alimentos estudados, tendo sido recomendados nas determinações dos teores de FDN no feno de Tifton 85, farelo de babaçu e cana-de-açúcar e nas determinações dos teores de FDA apenas no farelo de babaçu pelo método alternativo que utiliza a autoclave e saquinhos da ANKOM. Os resultados de todas as análises não diferiram significativamente quanto à forma (não sequencial e sequencial), com exceção da determinação de FDA na silagem de milho,

pelos métodos alternativos que utilizam digestão em autoclave e saquinhos da ANKOM e TNT. A recuperação e posterior utilização da acetona permitiram ganhos econômicos e ambientais. No desenvolvimento das análises com reutilização da acetona foi observada uma taxa de recuperação de 84,12%. Observou-se que a reutilização das soluções detergentes (neutra ou ácida), em todas as determinações dos teores de FDN e FDA, promoveu a redução no custo e no tempo das análises, e, em especial, no descarte de resíduos químicos no meio ambiente. Não foi verificada uniformidade na precisão das análises desenvolvidas com soluções detergentes recuperadas, sendo necessária a observação da combinação do método analítico com o alimento a ser analisado.

Palavras-Chave: custos operacionais, métodos alternativos, parede celular, precisão, resíduos químicos, reutilização de soluções

COMPARATIVE STUDY OF METHODOLOGIES APPLIED IN ANALYSIS OF NEUTRAL DETERGENT FIBER AND ACID DETERGENT FIBER WITH CHEMICAL WASTE MANAGEMENT

SUMMARY - Two experiments were conducted, aiming to quantitatively evaluate different methods proposed for the analysis of neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF). This evaluation included the precision of analytical results, the reduces costs and time analysis and minimizes waste generation. Six typical foods in animal nutrition were used: Tifton 85 hay (*Cynodon spp.*), sugarcane (*Saccharum officinarum L.*), corn silage (*Zea mays L.*), grass xaraés (*Brachiaria brizantha cv. Xaraés*) grass marandu (*Brachiaria brizantha cv. Marandu*) and a proteic concentrated, the babassu meal (*Orbignya phalerata*). The first experiment compared the NDF and ADF results of the conventional method with three alternative methods that use autoclave as system digester and on the second experiment the possibility of reuse, for once, of detergent solutions and recovered acetone applied on the first experiment, were studied. The experimental design used in the analysis of each food was completely randomized in a 4x2 factorial scheme (four methods and two forms of analysis) in the first experiment and 2x4x2 (2 uses, four methods and two forms of analysis) in the second experiment. It was observed that alternative methodologies has allowed significant gains by reducing operating costs, time of analysis, minimizing environmental impacts. The analytical precision of alternative methods varied among studied foods. NDF alternative methods were recommended for Tifton 85, babassu meal and sugarcane samples. ADF determinations by alternative methods are not recommended for samples studied; except for babassu meal that can be analyzed by the alternative method using an autoclave and bags of ANKOM. All analytical results of the determinations of NDF and ADF showed the same behavior in both forms of analysis used (non-sequential and sequential), except the determination of ADF in corn silage by methods alternative digestion using autoclave and bags of TNT and ANKOM. The recovery and subsequent use of acetone led to economic and environmental gains. It

was observed 84.12% of acetone recovery rate. It was noted that the reuse of detergent solutions (neutral or acid) in all determination of NDF and ADF, decreased the cost and time analysis, and in especially in the disposal of chemical wastes into the environment. Uniformity was not verified the precision of the analysis carried out with detergent solutions recovered, requiring the observation of the combination of the analytical method with the food being analyzed.

Keywords: alternative methods, cell wall, chemical waste, operating costs, precision, re-use solutions

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Uma das variáveis de grande importância no estudo de nutrição animal é o consumo de alimentos. Em busca da eficiência do processo da alimentação animal, a partir da década de 70, os nutricionistas passaram a empenhar-se em estabelecer novos parâmetros para avaliar a qualidade das forragens, interferindo positivamente na produtividade dos rebanhos (CARVALHO, 1995).

Sabe-se que os alimentos são compostos complexos constituídos de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais, tendo como uma das principais funções fornecer energia ao organismo.

Neste sentido, as determinações analíticas surgem como um parâmetro de grande importância para o conhecimento da composição química de um alimento.

1.1 Fibras na alimentação de ruminantes

Fibra alimentar é toda substância residual de origem vegetal não digerida pelas enzimas digestivas. Não é considerada uma substância química específica, mas uma denominação geral aplicada a diversos materiais constituídos de hidrogênio (H) e carbono (C), especialmente a celulose, a hemicelulose e a lignina, organizadas para formar as paredes celulares dos vegetais.

Para MERTENS (2001), a definição de fibra está vinculada ao método analítico empregado em sua determinação, sendo assim, também se considera fibra como um termo apenas nutricional.

De acordo com VAN SOEST (1994), a fibra é rica em carboidratos, que são usados como fonte de energia pelos microrganismos do rúmen e tem sido usada na caracterização de alimentos e como fator limitante na formulação de rações animais.

MERTENS et al. (1994), relataram sobre a dificuldade dos nutricionistas em estabelecer uma definição uniforme de fibra, bem como sobre a concentração de fibra ideal para a otimização do consumo de energia por bovinos.

A fibra é também considerada um nutriente essencial por produzir os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) durante a fermentação ruminal, sendo estes as principais fontes de energia para o ruminante (MERTENS, 2001). O conhecimento das suas frações permite o entendimento de suas características e importância no balanceamento de dietas, na avaliação da qualidade dos alimentos e em estimativas de seu valor nutricional (WEISS,1999).

MERTENS et al. (1994) relatam que o objetivo de se analisar qualquer alimento é o de detectar as diferenças nutricionais entre as fontes de alimentos para fornecer informações aos nutricionistas, principalmente os que tratam com ruminantes e, ainda, separar as frações digestíveis, não digestíveis, rapidamente digestíveis, etc.

Quimicamente a fibra é um agregado de compostos cuja composição é dependente da fonte e da forma como é medida (MERTENS, 1992). Portanto, o método para a obtenção da fibra deve estar de acordo com os princípios biológicos ou com sua utilidade empírica.

Quando se fala em fibra é inevitável falar nos métodos laboratoriais disponíveis para a realização das análises.

1.2 Metodologias para análises de fibra

A busca de alternativas para avaliar o valor nutricional dos alimentos e/ou dietas com o objetivo de obter estimativas precisas da disponibilidade de nutrientes e também reduzir os custos e o trabalho em rotinas laboratoriais tem sido um constante desafio dos pesquisadores na área de nutrição animal.

Uma variedade de técnicas para determinação de parâmetros importantes em pesquisa animal tem sido citada na literatura. Nesse contexto, devem-se observar alguns critérios para a escolha adequada da metodologia a ser empregada, dentre

esses se destacam os recursos disponíveis, financeiros e operacionais, a possibilidade de implantação da técnica e a busca por maior precisão das estimativas (BERCHIELLI et al. 2001). Deve-se também considerar o impacto ambiental causado pelo método escolhido.

Um dos problemas do analista é selecionar uma dentre as várias possibilidades de análise de uma determinada amostra. Para escolher melhor, o analista precisa conhecer os detalhes práticos das diversas técnicas e seus princípios teóricos. Deve também estar familiarizado com as condições nas quais cada método é confiável e conhecer as possíveis interferências. Deve se preocupar com a exatidão e a precisão, o tempo de análise e o custo. Os métodos com mais exatidão em certa determinação podem ser muito lentos ou exigir reagentes dispendiosos. Levando em conta a economia, pode ser necessário escolher um método que, embora menos exato, dê resultado de exatidão suficiente em tempo razoável (JEFFREY et al. 2002).

O conceito de fibra bruta (FB) foi estabelecido desde 1864 pelo método de Weende (AOAC, 1975), sendo utilizado como um padrão. Em termos gerais, FB é aquela isolada por soluções de ácidos e bases fortes. A marcha analítica consiste em duas extrações em sequência. A primeira extração (ácida) remove amidos, açúcares e parte da pectina e da hemicelulose dos alimentos. A segunda extração (básica) retira proteínas, pectinas e hemicelulose remanescentes e parte da lignina (MERTENS, 2001). Assim, a FB é formada principalmente de celulose adicionada de pequenas quantidades de lignina e hemicelulose. Este método é limitado pela falta de precisão dos resultados da solubilização da hemicelulose e lignina (VAN SOEST & WINE, 1968).

Atualmente, os trabalhos de pesquisa na área de nutrição de ruminantes consideram a determinação dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), métodos de análises mais precisos, sendo a quantificação dos teores de FB praticamente inexistente. Estas técnicas, conhecidas como sistema detergente foram desenvolvidas por VAN SOEST (1963, 1967) e por VAN SOEST & WINE (1967, 1968) e oficialmente aceitas pela AOAC (1980) por estimar com maior precisão tanto os componentes totais da parede celular como os das frações mais indigestíveis desta.

A determinação quantitativa dos teores de FDN parte do princípio que o detergente neutro solubiliza a bicamada lipídica da membrana celular dos alimentos e, por filtração separa-se a parede celular (celulose, hemicelulose e lignina) do conteúdo celular. Atualmente esse é o método mais aceito pelos nutricionistas de ruminantes para determinação de fibra. Contudo, parte da pectina, componente da parede celular, é solubilizada e computada como conteúdo celular. Quanto à análise dos teores de FDA, esta é definida como a quantificação da fibra baseada em tratamento com detergente ácido.

O método proposto por VAN SOEST (1963, 1967) e por VAN SOEST & WINE (1967, 1968), foi desenvolvido nos laboratórios do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA, principalmente para análises de forrageiras, VAN SOEST, (1967). Este método permite uma grande quantidade de alternativas sequenciais de análises, com o objetivo de fracionar alguns componentes minoritários importantes da parede celular, além de estimar os macrocomponentes isoladamente por diferenças matemáticas entre os resultados das análises efetuadas (FERREIRA, 1994).

A determinação quantitativa utiliza soluções contendo diversos reagentes sendo que cada um possui uma função específica. Na determinação de FDN utiliza-se uma solução de detergente neutro composta de tetraborato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), hidrogenofosfato de sódio, lauril sulfato de sódio e trietilenoglicol. O tetraborato de sódio e o hidrogenofosfato de sódio funcionam como sistemas tampões mantendo o pH da solução de detergente neutro próximo a 7,0 evitando, assim, a solubilização da hemicelulose e da lignina. O detergente lauril sulfato de sódio é usado na remoção das proteínas, o EDTA, por ser um agente quelante, promove a solubilização das proteínas e pectinas e o trietilenoglicol solubiliza amidos. Portanto, essa mistura de reagentes isola, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina com alguma contaminação por proteína e pectina. Em relação à pectina, esta é facilmente extraída e quase completamente digerida. Já a contaminação por proteína parece contrabalancear a perda de pectina imediatamente solúvel, fazendo da FDN uma estimativa aceitável da parede celular dos tecidos vegetais (MERTENS, 1992).

Ao longo dos anos, comprovou-se que o método convencional de VAN SOEST (1963, 1967) e VAN SOEST & WINE (1967, 1968) não era muito eficaz para algumas categorias de alimentos, particularmente os cereais ricos em amido e subprodutos agroindustriais ricos em pectinas, taninos, complexos taninos-proteína e produtos da reação de Maillard; havendo, então, a necessidade de sofrer algumas alterações em uma ou outra etapa analítica de acordo com o tipo de amostra (VAN SOEST et al. 1991). Assim, desde que foi desenvolvido, o método convencional vem sofrendo algumas modificações, devendo-se tomar muito cuidado na comparação dos valores.

No método convencional proposto por VAN SOEST & WINE (1967), o éter monoetilenoglicol era usado para promover a solubilização de amidos, entretanto, por ser teratogênico, foi substituído pelo trietilenoglicol (VAN SOEST et al. 1991). Utilizava-se também a decalina, agente antiespumante, que foi retirado por remover a lignina. O sulfito de sódio, utilizado para remover contaminações por proteínas, também foi suprimido por não removê-las completamente e por degradar a lignina. Ao longo dos anos, diversas modificações foram efetuadas resultando em diferentes procedimentos para determinação de teores de FDN. O método de ROBERTSON & VAN SOEST (1981) não utiliza sulfito de sódio, mas utiliza amilase na remoção de amido; o método de VAN SOEST et al. (1991) não usa a decalina e recomenda o uso do trietilenoglicol, da amilase e da uréia (8 Mol.L^{-1}) para remover amido, sendo opcional o uso do sulfito de sódio. O método de MERTENS (1997) recomenda o uso do sulfito e da amilase.

Os altos valores de FDN obtidos nas análises de amostras de alimentos concentrados e forragens contendo amido, associados às dificuldades que a prática laboratorial tem demonstrado na etapa de filtração, indicam que o detergente neutro não é eficiente na solubilização dos amidos. Por isso, as amilases têm sido utilizadas nas determinações da FDN (VAN SOEST et al. 1991).

A FDA permite conhecer os constituintes menos solúveis da parede celular, sendo que posteriormente, poderão ser determinadas celulosas, lignina, nitrogênio insolúvel em detergente ácido (que representa o nitrogênio lignificado), cinzas insolúveis em ácido e sílica. Basicamente, o teor de FDA é determinado por refluxo (60 minutos), a quente, de uma amostra em solução, contendo ácido sulfúrico (H_2SO_4 1N)

para solubilizar açúcares, amidos, hemiceluloses e algumas pectinas e detergente (brometo de cetil-trimetilamônio) para remoção de proteínas (MERTENS et al. 1994). Por este método, a celulose, lignina, com algumas contaminações por pectina, minerais (cinza insolúvel) e compostos nitrogenados são quantitativamente recuperadas (VAN SOEST, 1994). Embora consagrado nos principais laboratórios de nutrição, os sistemas detergentes apresentam limitações práticas, principalmente àquelas relacionadas ao excesso de trabalho despendido na realização das etapas de refluxo (em tubos de digestão ou em frascos) e filtração (com a utilização de cadinhos de borossilicato) de cada amostra do alimento avaliado na bateria, o que limita sua eficiência na utilização dos recursos humanos, financeiros e de infra-estrutura do laboratório (BERCHIELLI et al. 2001).

BAILEY & ULYATT (1970) recomendaram que a primeira extração fosse feita com detergente neutro e em seguida com detergente ácido no intuito de purificar a fibra em detergente ácido. Essa pré-extração com detergente neutro elimina a interferência por pectinas e sílica biogênica. Além disso, a subtração de FDN da FDA superestima a hemicelulose nas gramíneas por figurar as medidas de seus açúcares constituintes (THEANDER & WESTERLUND, 1993). Este problema demonstra bem a dificuldade de se formular um procedimento laboratorial que atenda às exigências de fracionamento dos constituintes dos alimentos.

As análises para determinação dos teores de FDN e FDA podem seguir duas sequências laboratoriais distintas: na primeira, conhecida como forma não sequencial, fazem-se duas pesagens da mesma amostra e procede-se com as análises de FDN e FDA separadamente, enquanto que na forma sequencial pesa-se a amostra e procede-se com a determinação de FDN, utilizando-se o resíduo dessa análise na determinação do teor de FDA. O cadinho contendo o resíduo da FDN é imerso em 100 mL de solução de detergente ácido, acoplado ao sistema digestor e logo após, lavado, filtrado e seco em estufa para determinação do teor de FDA. (VAN SOEST & ROBERTSON, 1985). A análise sequencial nas frações de fibras é atrativa porque as interferências importantes podem ser evitadas e também o uso de uma única amostra é mais econômico. A vantagem principal é que as estimativas da hemicelulose e da celulose pela diferença

são mais exatas, mas o tratamento sequencial não pode ser aplicado em todas as amostras porque existem situações específicas em que as frações de interesse podem ser perdidas no processo. Particularmente a sílica biogênica (AIA), alguns taninos e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) são melhores analisados por FDA sequencial (VAN SOEST et al. 1991). Também, os valores de FDA podem ser aumentados pela presença de pectina (fibra solúvel em detergente ácido) que em algumas situações, não consegue ser extraída completamente pela ação deste detergente, recomendando-se a análise sequencial nas amostras ricas em pectina.

FERREIRA (1994) discorre das muitas dificuldades de se estabelecerem sistemas padronizados e eficientes de análise química, os quais devem permitir quantificar rigorosamente os componentes insolúveis e solúveis da parede celular vegetal, com a menor interferência possível dos resíduos indesejáveis. Esses resíduos se somam na estimativa, fazendo com que muitos investigadores, ao longo dos anos, procurassem estabelecer diferentes técnicas em função da fração que se quer determinar e do tipo de amostra analisada. Neste contexto, as modificações propostas por JERACI et al. (1988), utilizando a enzima alfa-amilase termoestável na determinação de FDN, podem ser citadas na tentativa de otimizar o método convencional.

As modificações propostas no método convencional de VAN SOEST (1963, 1967) e VAN SOEST & WINE (1967, 1968) diferem entre si nos ganhos. As que se destacam em nosso país são as propostas por KELLEY (1998), SOUZA et al. (1999) e SILVA & QUEIROZ (2002). A base do método proposto por KELLEY (1998) consiste na digestão e filtração das amostras em condições homogêneas e de forma coletiva, obtendo-se maior número de análises por dia, em relação ao método proposto por VAN SOEST (1963, 1967), onde as lavagens e filtrações sucessivas são feitas de forma manual.

O método proposto por SOUZA et al. (1999) enfatiza a redução de custos e minimização da quantidade de resíduos, mantendo a qualidade analítica do processo, ao utilizar apenas 0,35 gramas de amostra em 35 mL de reagentes, analisando 80 amostras por dia. O método adota a utilização do sulfito de sódio e uréia (8 Mol.L^{-1})

mais amilase para amostras ricas em amido. Este método tem sido adotado, desde 2000, nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste tendo como beneficiários laboratórios, institutos de pesquisa, universidades e indústrias. A metodologia alternativa é uma simplificação dos procedimentos analíticos originais, sem alteração dos princípios do método proposto por VAN SOEST (1963, 1967) e VAN SOEST & WINE (1967, 1968). Como o método alternativo emprega menores quantidades de amostra e de reagentes, consequentemente diminui os resíduos gerados, além de processar maior número de amostras com menor impacto ambiental.

O método proposto por SILVA & QUEIROZ (2002) utiliza 0,5 gramas da amostra em 50 mL de solução detergente, tendo como base as tradicionais obras que versam sobre análise de alimentos, dentre elas a “Official Methods of Analysis – (A.O.A.C)”, apresentando uma marcha analítica sistematizada, de fácil leitura e compreensão, especialmente para as áreas de engenharia agrônoma e de alimentos, nutrição humana, zootecnia e bioquímica. Neste método utiliza-se a decalina como agente antiespumante e é recomendado o uso do sulfito de sódio e do trietilenoglicol.

Assim, diversos procedimentos analíticos alternativos têm surgido para determinação da fração fibrosa dos alimentos (MERTENS et al. 1994). Os chamados métodos alternativos têm sido desenvolvidos na tentativa de suplantar as dificuldades do método convencional quanto ao uso de mão de obra individual, demora na execução das etapas de análise, alto custo e diminuição dos resíduos químicos gerados no processo.

Dentro deste contexto, alguns sistemas foram lançados no mercado como, por exemplo, o denominado **método da “Filter Bag Technique” da Ankom (FBT), (ANKOM, 2010)**, cujo princípio de funcionamento baseia-se na digestão e filtração das amostras de alimentos contidas em saquinhos, em ambiente fechado. Esta técnica garante condição homogênea de digestão e filtração para todas as amostras e possibilita, ainda, a realização de um número bem maior de análises por dia, pois algumas etapas do método de VAN SOEST (1963, 1967), como as lavagens e filtrações sucessivas, que anteriormente eram feitas manualmente, passam a ser feitas no próprio sistema de forma coletiva (BERCHIELLI et al. 2001).

Vários aparelhos da ANKOM já foram adquiridos por instituições de pesquisa e por empresas particulares, no entanto, algumas dúvidas e limitações levam à condição de sub-utilização deste sistema. Uma delas seria quanto às concentrações de FDN e FDA obtidos com esta técnica, pois se encontram poucas informações disponíveis sobre esse assunto na literatura. Um dos trabalhos é o realizado por KOMAREK et al. (1993 e 1994), em que foram testados vários alimentos e verificados valores bem próximos daqueles observados com o método convencional de digestão de fibras. Outra questão refere-se ao alto custo dos saquinhos utilizados para conter as amostras enquanto são digeridas, sendo os mesmos obtidos na própria empresa fabricante do equipamento.

A eficiência das análises de FDN e FDA utilizando saquinhos de poliéster nas determinações analíticas, com digestão das amostras em autoclave a 120°C por 60 minutos foi primeiramente observada por KOMAREK (1993).

Na tentativa de minimizar os custos das análises com os saquinhos da ANKOM, diversos trabalhos já foram desenvolvidos utilizando-se saquinhos confeccionados com outros tecidos similares ao da ANKOM como o náilon e o tecido não tecido (TNT). Assim, BERCHIELLI et al. (2001) testaram quatro tipos de saquinhos diferentes no equipamento da ANKOM: o primeiro tipo constituído de um material semelhante ao papel da ANKOM, o segundo formado por um material semelhante ao náilon utilizado na confecção de saquinhos para ensaio de degradabilidade ruminal, porém, com malha de 50 μm , adquirido na empresa representante da ANKOM no Brasil. Os dois outros saquinhos de filtração testados foram confeccionados com o mesmo náilon utilizado em saquinhos para ensaio de degradabilidade ruminal, sendo um feito com náilon novo e malha de 50 μm , e o outro feito a partir de saquinhos de náilon já utilizados em incubação ruminal, malha de 50 μm . Os saquinhos foram confeccionados com as mesmas dimensões dos saquinhos ANKOM (5 cm x 5 cm). Os tipos de saquinhos de filtração utilizados não influenciaram nos teores de FDN nos diferentes alimentos, com exceção das fezes, cujos saquinhos de náilon resultaram em concentrações de FDN inferiores. Não houve diferença significativa entre os valores de FDN e FDA, obtidos pelo equipamento ANKOM ou pelo convencional, nos alimentos estudados, com

exceção da polpa cítrica, cujo valor médio de FDA pelo ANKOM foi inferior àquele obtido pelo método convencional.

PELL & SCHOFIELD (1993) analisaram o teor de FDN desenvolvendo micro-análises (100 mg/ amostra), com digestão de amostras em autoclave em condições de temperatura de 105°C durante 60 minutos. Os resultados obtidos foram comparados com o método convencional, não sendo validadas as micro-análises em alimentos concentrados.

DESCHAMPS (1999) testou o uso de saquinho de náilon (5 x 5 cm, porosidade média de 45 µm) para acondicionar amostras de três cultivares de capim-elefante, observando, ao longo de 126 dias de crescimento, as principais modificações na composição química e na digestibilidade da matéria seca das mesmas. Na determinação do teor de FDN foi utilizada uma autoclave de bancada sendo a temperatura ajustada na melhor condição observada (temperatura de 120°C e tempo de operação de 40 minutos). O ajuste do tempo utilizado na digestão em autoclave foi feito em um ensaio prévio utilizando azevém e bagaço de cana como amostras experimentais. A adoção da autoclave permitiu executar a análise de 120 amostras por operação.

A confiabilidade dos resultados obtidos em análises reutilizando saquinhos também foi observada no trabalho desenvolvido por BORTOLASSI et al. (2000) que analisaram os teores de FDN e FDA pelo método convencional e pela “Filter Bag Technique” da ANKOM (FBT), reutilizando os filtros F57 por até seis vezes. Foram utilizados como alimentos o milho moído, farelo de trigo, farelo de soja, farelo de canola, feno de tifton 85, feno de aveia, milheto e silagem de milho. Algumas restrições foram observadas: o método FBT para a determinação de FDN e FDA não foi recomendado em todos os alimentos analisados e a reutilização dos filtros F57 na FBT foi recomendada de acordo com o tipo de alimento a ser testado. Em alimentos como a silagem de milho e o farelo de canola, a reutilização dos filtros poderá ser feita até seis vezes, já em outros alimentos, recomenda-se menor número de reutilizações. A análise da FDN em milho, na FBT, não foi recomendada por apresentar diferença ($p < 0,05$) entre o método convencional e FBT em todas as reutilizações. O milho moído

apresentou esse comportamento devido a seu elevado teor de amido que foi gelatinizado dentro do filtro durante o processo de fervura. A ação da enzima alfa-amilase, quando se utilizou o filtro F57, não foi suficiente para solubilizar o amido, resultando, provavelmente, no entupimento da malha do mesmo e, dessa forma, superestimando o teor de FDN desse alimento. Tal constatação não foi observada na metodologia convencional.

CORDEIRO et al. (2007), analisando os teores de FDN e FDA em cana-de-açúcar, farelo de algodão e fubá de milho, utilizaram a autoclave por ser mais prática, tendo validado seus resultados comparando com análises desenvolvidas em blocos digestores/ cadinhos filtrantes (método convencional). Os resultados obtidos indicaram que não houve diferença ($p>0,05$) entre os métodos analisados, o que comprovou a eficácia do uso da autoclave.

SENGER et al. (2008) testaram quatro diferentes tempos e temperaturas de autoclave em análises de FDN e FDA com o objetivo de encontrar um procedimento alternativo que não fosse diferente do método convencional (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). As amostras de 15 concentrados e 17 volumosos foram acondicionadas em sacos de poliéster e náilon (4 cm x 5 cm e 50 μ m de porosidade). Após o experimento foi observado que os resultados obtidos em autoclave regulada à temperatura de 110°C durante 40 minutos não diferiram ($p>0,05$) do método convencional.

CICHOSKI et al. (2009) determinaram a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de quatro espécies de forrageiras (duas gramíneas e duas leguminosas), obtidas através do fermentador da ANKOM, Daisy II, utilizando diferentes materiais na confecção do saco de fermentação: náilon e TNT comparados aos sacos da ANKOM. As médias obtidas de DIVMS e DIVFDN, utilizando saquinhos de náilon e TNT superestimaram os valores obtidos com o material padrão (saquinhos da ANKOM), observando-se que é possível utilizar saquinhos de materiais alternativos (náilon e TNT) desde que sejam corrigidos através de equações estabelecidas nesse trabalho.

CASALI et al. (2009), avaliando o teor de FDN em farelo de trigo, casca de soja, silagem de milho e feno de capim- brachiaria observaram similaridade ($p>0,05$) nos

valores obtidos com os saquinhos da ANKOM e aqueles obtidos pelo método convencional. Nos saquinhos de TNT observou-se semelhança dos resultados com o método convencional em alguns alimentos (farelo de trigo, capim-brachiaria e casca de soja) e diferença ($p < 0,05$) nas amostras de silagem de milho. O teste com sacos confeccionados com náilon indicaram menores teores de FDN ($p < 0,05$) em comparação aos valores do método oficial, por ter ocorrido perda de partículas fibrosas que provavelmente está relacionada à estrutura do tecido. Quanto às análises desenvolvidas com saquinhos de TNT verificaram-se divergências nos resultados quando comparadas as dos saquinhos da ANKOM, sugerindo-se que a superfície do TNT não apresenta poros em sua totalidade, uma vez que parte da superfície é vedada pelo calor durante o processo de fabricação do tecido.

Todos os experimentos desenvolvidos utilizando metodologias alternativas (saquinhos de diversos tecidos e autoclave) visam à obtenção de um método alternativo de análise exato, preciso, mais econômico e que também reduza o tempo das análises, visto que o método convencional compreende várias etapas demoradas em especial a digestão e filtração das amostras.

Na área das análises laboratoriais deve-se considerar que todas as medidas experimentais possuem certo grau de incerteza, pois sempre que é feita uma medida há uma limitação imposta pelo equipamento usado. Assim, o valor numérico correspondente à medida experimental terá uma incerteza associada a ela, conhecida como erro experimental. Esse erro não tem como ser evitado, o que se procura é minimizá-lo, melhorando-se tanto o equipamento quanto a técnica utilizada (SOUZA et al. 1999). Assim, a continuidade das pesquisas neste aspecto é de grande importância para a identificação de outras tecnologias que forneçam resultados analíticos confiáveis e rotinas laboratoriais otimizadas, visando ganhos no custo e no tempo utilizado no desenvolvimento dos parâmetros da análise.

1.3 Alimentos na Nutrição de Ruminantes

É evidente o grande número de alimentos que podem ser utilizados na alimentação de ruminantes. Convém ressaltar que as várias fontes de alimentos possuem propriedades nutricionais diferentes (OLIVEIRA et al. 2005).

Segundo TEIXEIRA (1997), o volume dos alimentos indica, a princípio, uma forma de classificação dos mesmos. Assim, existem alimentos de alta concentração de nutrientes - os concentrados, e os que possuem baixa concentração - os não concentrados ou volumosos. Geralmente, as rações são compostas dos dois grupos. Algumas vezes, utilizam-se somente os volumosos, entretanto, nunca se usam exclusivamente concentrados na alimentação dos ruminantes.

Nos trabalhos de TEIXEIRA (1998) e MELLO (1999), observou-se a citação de que os alimentos são classificados de acordo com a Associação Americana Oficial de Controle de Alimentos (AAFCO) e o Conselho Nacional de Pesquisas dos EUA (NRC), nas seguintes categorias: volumosos, concentrados, minerais, vitaminas, aditivos e outros alimentos que não se classificam nos itens anteriores.

Os alimentos volumosos ou não concentrados caracterizam-se por possuir baixo teor energético, com altos teores em fibra. Possuem menos de 60% de NDT e ou mais de 18% de FB e podem ser divididos em secos e úmidos. São os alimentos de mais baixo custo na propriedade. Os mais usados para os bovinos de corte são as pastagens naturais ou artificiais (brachiarias e panicuns em sua maioria), capineiras (capim elefante), silagens (capim, milho, sorgo), cana-de-açúcar e bagaço. Entre os menos usados estão: milheto, feno de gramíneas, silagem de girassol e palhadas de culturas.

Os alimentos concentrados possuem alto teor de energia, mais de 60% de NDT e menos de 18% de FB. Estes podem ser energéticos caracterizando-se por possuírem menos de 20% de proteína bruta (PB), tais como o milho, sorgo, trigo, arroz, melaço, polpa cítrica (todos de origem vegetal), sebos e gordura animais (de origem animal) e protéicos, que se caracterizam por possuírem mais de 20% de PB. Citam-se o farelo de soja, farelo de algodão, farelo de babaçu, farelo de girassol, soja grão, farelo de amendoim, caroço de algodão, todos de origem vegetal.

Os alimentos minerais usuais na alimentação animal são compostos de fosfato bicálcico, calcário, sal comum, sulfato de cobre, sulfato de zinco e óxido de magnésio.

As vitaminas utilizadas são as lipossolúveis e hidrossolúveis enquanto que os aditivos incluem os antibióticos, hormônios, probióticos, antioxidantes e corantes.

Na nutrição de ruminantes as forragens destacam-se como fontes importantes de nutrientes, pois delas advêm a energia e a fibra necessária nas rações para promover a mastigação, ruminação e saúde do rúmen. As plantas forrageiras são constituídas principalmente de carboidratos, correspondendo de 50 a 80% da matéria seca (MS) das forrageiras e cereais. As características nutritivas dos carboidratos das forrageiras dependem dos açúcares que os compõem, das ligações entre eles estabelecidas e de outros fatores de natureza físico-química. Assim, considerando-se o grau de degradabilidade, os carboidratos das plantas classificam-se em duas grandes categorias: estruturais e não estruturais, respectivamente (VAN SOEST, 1994). Basicamente, os carboidratos não estruturais são aqueles encontrados no conteúdo celular, tais como glicose e frutose, e os carboidratos de reserva das plantas, como o amido, a sacarose e as frutanas (VITTORI et al. 2000). Já os carboidratos estruturais incluem aqueles encontrados normalmente constituindo a parede celular, representados principalmente pela pectina, hemicelulose e celulose, que são os elementos mais importantes na determinação da qualidade nutritiva das forragens (VAN SOEST et al. 1991). A natureza e concentração dos carboidratos estruturais da parede celular são os principais determinantes da qualidade dos alimentos volumosos, especialmente de forragens (VAN SOEST, 1994).

Dentre as décadas de 70 a 90, a pecuária brasileira sofreu uma grande mudança com a introdução das gramíneas do gênero *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*. As três cultivares que mais contribuíram para esta revolução foram a *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, a *Brachiaria humidicola* cv. *Tully* e a *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*. A partir de então a gramínea forrageira mais plantada e estudada nos diferentes biomas brasileiros é a *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*. O capim-marandu também conhecido como braquiarião ou brizantão foi lançado no Brasil em 1984 pela Embrapa Gado de Corte (Campo Grande – MS) e Embrapa Cerrados (Brasília). De acordo com MACEDO

(2006), constituem cerca de 80% das pastagens em alguns estados da região Norte (Acre, Rondônia e Pará) e cerca de 50% das pastagens cultivadas no Brasil.

A *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, conhecida como capim-xaraés, foi introduzida pela Embrapa em 1986, chegando a Embrapa Gado de Corte (Campo Grande – MS) em 1987 tendo sido avaliada por mais de dez anos pelos pesquisadores da Embrapa Cerrados (Brasília). Somente em 2003 foi lançada comercialmente com o nome de origem tupi-guarani cv. Xaraés (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010). Atualmente, a produção do Xaraés é de 70% nas águas, e na seca de 30%, com destaques para o norte do Mato Grosso, Tocantins, Rondônia, Acre, sul do Pará, todos os estados das regiões Centro-Oeste, Sudeste, Oeste e a mata Atlântica da Bahia (VALLE et al. 2004).

Uma das culturas de maior destaque na área de produtos alimentares e energéticos, no Brasil, é a cana-de-açúcar. O país é hoje o maior produtor mundial dessa matéria-prima, com mais de 300 milhões de toneladas, que se transformam em mais de 15 milhões de toneladas de açúcar e 15 bilhões de litros de álcool. A região Nordeste, tradicional produtora de açúcar, vem perdendo posição relativa para a produção de São Paulo ao longo das últimas décadas, pois as condições climáticas predominantes neste estado são consideradas excelentes para a sua produção, permitindo o crescimento vigoroso da planta durante a primavera e o verão, e oferecendo condições adequadas para a maturação e a colheita, durante o outono e o inverno. No Centro-Oeste, apesar do clima apresentar certa semelhança, a deficiência hídrica durante o inverno é mais acentuada, exigindo, na maioria das regiões, uma pequena suplementação hídrica para viabilizar a rebrota das soqueiras e a manutenção dos níveis de produtividade (MACEDO, 2010).

A cana-de-açúcar é de fácil adaptação às regiões de clima tropical, quente e úmido, cuja temperatura predominante seja entre 19 e 32° C e onde as chuvas sejam bem distribuídas, com precipitação acumulada acima de 1000 milímetros por ano, desenvolvendo-se bem em solos de baixa fertilidade ou com condições físicas desfavoráveis, sendo que os solos ideais para o desenvolvimento da cana-de-açúcar devem ser bem arejados e profundos, com boa retenção de umidade e alta fertilidade.

O Tifton 85 é um híbrido de *Cynodon dactylon* e *Cynodon nlemfuensis*. O gênero *Cynodon*, por sua vez, é dividido em dois grupos: capim ou grama Bermuda e capim ou grama Estrela. Segundo FONSECA & MARTUSCELLO (2010) os capins-bermuda são amplamente utilizados na forma de feno tanto em regiões de clima tropical quanto nas de clima temperado. Há um grande número de cultivares do capim-bermuda, originários do melhoramento genético da grama Bermuda, que receberam o nome genérico de Tifton, seguidos de uma numeração. No Brasil estão disponíveis os cultivares Coastal, Alícia, Callie, Tifton 44, Tifton 78 e Tifton 85 (HILL et al. 1996).

Os melhores fenos de gramíneas do gênero *Cynodon* são obtidos dos cultivares que tem mais folhas do que colmos, como o Florakirk, Tifton 85, Coastcross e Florona (HILL et al. 1996).

O feno tem como característica preservar as qualidades nutricionais da forragem por meio de rápida desidratação, o que provoca a paralisação da atividade respiratória das plantas e estabiliza a atividade de microorganismos responsáveis pela deterioração dos princípios nutritivos. O processo da fenação consiste na desidratação da forragem verde contendo um teor de umidade entre 65 e 80%, transformando-a em feno, atingindo um teor de umidade entre 10 e 20% (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010).

A Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG) adota a classificação de feno nos tipos A, B e C, em função do teor de umidade, PB e FDN. Os fenos do tipo A possuem de 12 a 15% de umidade, PB maiores que 13% e FDN menor que 65%, os do tipo B possuem 18 a 15% de umidade, 9 a 13% de PB e 65 a 69% de FDN, enquanto que os fenos do tipo C possuem umidade variando de 15 a 18%, PB menor que 9% e FDN maior que 69% (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010).

De acordo com FONSECA & MARTUSCELLO (2010) as gramíneas do gênero *Cynodon* constituem excelente opção de alimento volumoso, quando submetidas à fenação, sendo seu valor nutritivo satisfatório quando comparados a outros alimentos de alta qualidade como a silagem de milho.

O milho é um cereal amplamente utilizado em alimentação animal como concentrado energético. De acordo com TEIXEIRA (1998), o milho é rico em energia,

pró-vitamina A (betacaroteno) e pigmentantes (xantofila) e possui baixos teores de aminoácidos principalmente lisina e triptofano, cálcio, riboflavina, niacina e vitamina D.

É uma excelente cultura para confecção de silagem por apresentar boa quantidade de açúcares para produção de ácido láctico, fundamental no processo de ensilagem e por permitir altas produções por hectare de um alimento de elevado valor nutritivo (energia).

O processo da ensilagem inicia-se com o corte da planta na época ideal, posterior enchimento do silo com a massa verde compactada e vedação do mesmo. O processo de anaerobiose por acidificação desse material verde vegetal produz o que se chama de silagem. Após o fechamento do silo, os açúcares solúveis contidos na planta de milho são transformados em ácido láctico. Estas transformações levam à acidificação do material, cujo pH deverá situar-se abaixo de 4, valor que limita as fermentações indesejáveis (ação da flora butírica) e assegura uma boa conservação da silagem de milho (CENTRAL DA PECUÁRIA, 2010).

Apesar de serem poucos os trabalhos citados na literatura relativos ao uso do farelo de babaçu na alimentação animal, este é classificado como um alimento concentrado protéico (BENEDETT & SPERS, 1995). A variação na sua composição e o processamento são fatores que influenciam na sua composição final.

Segundo ROCHA JÚNIOR et al. (2003); CAVALCANTE et al. (2005) e VIEIRA et al. (2005), a composição bromatológica do farelo de babaçu apresenta os seguintes teores: MS – 89,9 a 95,2%, PB - 16,3 a 24,2%, EE – 1,1 a 17,3%, matéria mineral com base na matéria seca (MM) – 4,6 a 7,2%, FDN – 64,5 a 78,7% e FDA – 32,9 a 53,8%. A variedade de composição observada é devido aos diferentes processos de extração do óleo na obtenção da torta ou farelo.

Apesar da sua grande importância sócio-ambiental principalmente no estado do Maranhão, a falta de conhecimento das propriedades químicas, nutricionais e ecológicas do babaçu ainda é rudimentar e insuficiente, obstáculo para uma futura produção sustentável de biodiesel na região.

De acordo com ABDALLA et.al. (2008), a torta ou farelo gerado na extração do óleo não passam por processo de agregação de valor porque são desconhecidas as

suas potencialidades nutricionais e econômicas. Em estudos recentes na Austrália e Canadá, constatou-se que para cada 1% de acréscimo de gordura na dieta de ruminantes, pode se reduzir em até 6% a quantidade de metano produzido por quilo (kg) de matéria seca consumida (GRAINGER, 2008 citado por ABDALLA et.al. 2008).

O óleo do babaçu constitui cerca de 65% do peso da amêndoa sendo um subproduto na fabricação de sabão, glicerina, óleo comestível e do farelo utilizado na produção de ração animal (ALBUQUERQUE, 2006).

Em 1991, a Embrapa (EMBRAPA, 2010) analisou a composição química da torta de babaçu, sendo o seu valor nutritivo comparado ao do milho. O resultado obtido revelou que a torta de babaçu possui teores mais elevados de proteína bruta, fibra e matéria mineral, o que a torna um alimento em potencial a ser utilizado, com mais frequência, na alimentação animal.

1.4 Impacto ambiental e gestão de resíduos

A questão ambiental relacionada à minimização da geração de resíduos originados de universidades, indústrias e demais instituições, bem como a sua disposição adequada, também tem levado a busca de alternativas metodológicas que não prejudiquem o meio ambiente e a saúde pública (JARDIM, 1998).

Sabe-se que a geração de resíduos não é exclusividade das indústrias, uma vez que em laboratórios de universidades, escolas e institutos de pesquisa também são gerados resíduos de elevadas diversidade e volume (TAVARES & BENDASSOLLI, 2005).

Atualmente, inclusive as indústrias estão gradualmente trocando processos tradicionais por tecnologias ambientalmente corretas, sendo que as universidades estão montando programas de gerenciamento de resíduos (PERGHER, 2004).

Particularmente, a prática de descarte de resíduos químicos dos laboratórios de ensino e pesquisa das universidades brasileiras tem sido uma preocupação nova, pois não existem ainda normas ou legislações no país que estabeleçam regras para o

descarte; sendo que a grande maioria descarta seus resíduos perigosos *in natura* diretamente nas pias, os quais seguem para a rede de esgotos, comprometendo a fertilidade do solo, o ecossistema marinho, a população e os animais que utilizam a água (FELLEMBERG, 1980).

Confrontados com esta realidade, as instituições de ensino superior têm sentido a necessidade de minimizar este problema que é inerente ao seu próprio funcionamento. Palestras, debates e conferências são realizados com a intenção de reverter esta prática que é considerada normal por muitos profissionais. Nesse sentido, pesquisas em busca de metodologias de análises que minimizem o descarte e consequentemente o impacto ambiental têm sido realizadas na esperança de minimizar o problema (CASTRO, 1996).

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas que se preocupem com as questões ambientais faz parte da chamada Química Verde (“Green Chemistry”, ou Química Sustentável) que foi introduzida há cerca de dez anos nos EUA pela “Environmental Protection Agency” (EPA), a Agência de Proteção Ambiental daquele país, em colaboração com a “American Chemical Society” (ACS) e o “Green Chemistry Institute”. Esta iniciativa norte-americana vem despertando o interesse de organizações governamentais e não-governamentais de vários países. Na Europa, Japão e Estados Unidos foram inclusive criados prêmios para incentivar pesquisadores de indústrias e universidades a desenvolverem tecnologias empregando os princípios da Química Verde. Desde 1996, quando o “Presidential Green Chemistry Awards” foi criado nos EUA, mais de uma dezena de corporações e investigadores foram premiadas (SANSEVERINO, 2002).

Na Europa, a “Royal Society of Chemistry” (RSC), com o apoio de setores industriais e governamentais, instituiu em 2001 o U.K. “Green Chemistry Awards”, para premiar empresas e jovens pesquisadores que desenvolverem processos químicos, produtos e serviços que levem a um ambiente mais sustentável, limpo e saudável. Além disso, a RSC criou a “Green Chemistry Network” (GCN), com o objetivo de promover a conscientização e facilitar a educação, treinamento e prática da “Green Chemistry” na indústria, academia e escolas. Outra importante iniciativa da RSC foi a criação, em

1999, da revista "Green Chemistry", de periodicidade bimestral, dedicada à publicação de artigos inéditos que, de alguma forma contribuem para o desenvolvimento da área-título do periódico (SANSEVERINO, 2002).

A Química Verde pode ser definida como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes ou geração de produtos e subprodutos tóxicos, que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente. Este conceito, não é novidade em aplicações industriais, principalmente em países com controle rigoroso na emissão de poluentes. Ao longo dos anos os princípios da Química Verde têm sido inseridos no meio acadêmico e em atividades de ensino e pesquisa (COLLINS, 1995; CANN & CONNELLY, 2000; COLLINS, 2001).

Nas determinações analíticas de teores de FDN e FDA utiliza-se uma quantidade expressiva de soluções químicas, que, na maioria das vezes, são descartadas *in natura*. O método consiste em determinar a parede celular insolúvel através da técnica da extração que tem como base a solubilização de constituintes do conteúdo celular em solução neutra de lauril sulfato de sódio e EDTA, denominada de FDN. No resíduo desta extração encontram-se proteínas insolúveis, nitrogênio ligado e alguns minerais. A solubilização da proteína insolúvel e da hemicelulose, pode ser conseguida em outro processo de extração denominado de FDA onde se utiliza o brometo de cetil-trimetilamônio. Estes procedimentos são rotineiros em laboratórios de nutrição animal e geram resíduos químicos em grande escala. Durante as duas determinações, também é necessário o uso da acetona em lavagens após a filtração das amostras. Geralmente essa acetona também é descartada *in natura* no meio ambiente.

A possibilidade de reutilização das soluções reagentes utilizadas na determinação dos teores de FDN e FDA sem a perda da precisão das medidas analíticas bem como a recuperação da acetona utilizada na etapa de lavagem fazem parte dos processos da Química Limpa, cuja meta é tornar úteis os resíduos gerados em laboratórios (AMARAL et al. 2001).

Considerando o exposto, o presente trabalho teve como

Objetivo Geral

Avaliar quantitativamente diferentes metodologias propostas para análises de FDN e FDA, visando a precisão dos resultados analíticos, a redução nos custos e no tempo das análises, bem como a minimização da geração de resíduos, avaliando a reutilização das soluções detergentes nas análises e do solvente acetona recuperado.

Objetivos Específicos

Avaliar quantitativamente a precisão analítica dos teores de FDN e FDA obtidos nas análises pelo método convencional nas formas não sequencial e sequencial,

Avaliar quantitativamente a precisão analítica dos teores de FDN e FDA obtidos nas análises provenientes de três métodos alternativos, nas formas não sequencial e sequencial,

Comparar os resultados experimentais dos teores de FDN e FDA obtidos nas análises desenvolvidas pela metodologia convencional e por três métodos alternativos, nas formas não sequencial e sequencial,

Avaliar o gerenciamento de resíduos químicos nas determinações dos teores de FDN e FDA, através da reutilização das soluções detergentes nas análises e também da recuperação do solvente acetona.

Avaliar a precisão analítica na determinação dos teores de FDN e FDA, comparando os resultados das análises desenvolvidas com reagentes e acetona originais, com os resultados obtidos nas análises com reagentes reutilizados e acetona recuperada, considerando o método convencional e três métodos alternativos, nas formas não sequencial e sequencial.

CAPÍTULO 2. ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO

RESUMO – O trabalho teve como objetivo avaliar diferentes metodologias propostas para análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), visando a precisão dos resultados, a redução nos custos operacionais, no tempo das análises e no descarte de resíduos químicos. Foram utilizados seis alimentos de uso corrente na alimentação de ruminantes sendo cinco alimentos volumosos: feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), silagem de milho (*Zea mays* L.), capim-xaraés (*Brachiaria brizanta* cv. Xaraés) e capim-marandu (*Brachiaria brizanta* cv. Marandu) e um concentrado protéico, o farelo de babaçu (*Orbignya phalerata*). Os teores de FDN e FDA obtidos pelo método convencional foram comparados com os resultados dos três métodos alternativos que utilizam a autoclave como sistema digestor. As metodologias alternativas permitiram ganhos consideráveis pela redução dos custos operacionais e do tempo da análise, minimizando os impactos ambientais. A precisão dos métodos alternativos bem como sua utilização, quando comparados ao convencional, foi medida aplicando-se a análise de variância, pelo procedimento General Linear Models (GLM) do Programa Statistical Analysis System (SAS 9.1®). As médias dos métodos alternativos foram comparadas com o método convencional pelo teste de Dunnette ($\alpha = 5\%$). O delineamento adotado na análise de cada alimento foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4x2 (4 metodologias e 2 formas de análises). Observou-se que a precisão do método alternativo depende do alimento a ser analisado. As determinações dos teores de FDN pelos métodos alternativos foram recomendadas no feno de Tifton 85, farelo de babaçu e cana-de-açúcar enquanto que as determinações dos teores de FDA pelos métodos alternativos não foram indicadas nos alimentos estudados com exceção das análises no farelo de babaçu, pelo método alternativo que utiliza a autoclave e saquinhos da ANKOM. Os teores de FDN e FDA não diferiram significativamente quanto à forma de

análise (não sequencial e sequencial), em todos os alimentos e métodos estudados, com exceção da determinação de FDA na silagem de milho, pelos métodos alternativos que utilizam digestão em autoclave e saquinhos da ANKOM e TNT onde a forma não sequencial diferiu ($p < 0,05$) da sequencial.

Palavras-Chave: análises, custos operacionais, métodos alternativos, parede celular, precisão

1. INTRODUÇÃO

A busca por novos métodos de análises químicas que produzam resultados confiáveis, com baixo custo e que minimizem o descarte de resíduos químicos tem sido objeto de estudo de várias instituições de pesquisa e ensino superior. Sabe-se que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma determinada amostra, ele deve sofrer um processo de validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento prático (INMETRO, 2007).

A análise dos alimentos é uma área de grande importância no setor de nutrição animal. Particularmente, as determinações analíticas dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) e em fibra em detergente ácido (FDA) são de extrema importância por estimar com maior precisão tanto os componentes totais da parede celular como os das frações mais indigestíveis desta. Conhecidas como “sistemas detergentes”, as marchas analíticas foram desenvolvidas por VAN SOEST (1963, 1967) e por VAN SOEST & WINE (1967, 1968) e oficialmente aceitas pela AOAC (1980). O método convencional de análise de alimentos apresenta como principal vantagem a precisão dos resultados, além de fornecer informações sobre importantes componentes da amostra (SILVA & QUEIROZ, 2002). Entretanto, a rotina laboratorial é bastante demorada, por possuir etapas que demandam muito tempo de execução tais como a digestão, lavagens e filtrações sucessivas das amostras que são desenvolvidas manualmente. Também é considerado um método de custo elevado e que gera resíduos químicos em proporções consideráveis. Na tentativa de otimizar o sistema, vários métodos alternativos têm sido adotados em rotinas laboratoriais, mas muitas vezes sem garantir a confiabilidade dos resultados, que requer uma avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar a precisão e exatidão dos resultados.

Na determinação do teor de FDN utiliza-se como reagente analítico uma solução composta de tetraborato de sódio, ácido etilenodiamintetracético (EDTA),

hidrogenofosfato de sódio, lauril sulfato de sódio e trietilenoglicol. O processo químico consiste na utilização de solução detergente aniônica (lauril sulfato de sódio) capaz de formar complexos polianiónicos conhecidos por sais de sódio, os quais são solúveis em pH acima de 6,0 o que promove a remoção das proteínas. A função do EDTA é prevenir a interferência de íons de metais pesados ou de metais alcalinos terrosos, quelando-os e facilitando a solubilização das proteínas e pectinas. A extração feita com solução neutra (pH 7,0) de lauril sulfato de sódio e EDTA gera um resíduo fibroso que recupera a maioria dos componentes da parede celular - lignina, celulose e hemicelulose. O resíduo contém também componentes menores da parede celular, algumas proteínas e nitrogênio ligado, minerais e cutina. As pectinas são removidas, apesar de serem componentes da parede celular (ROBERTSON & VAN SOEST, 1981). O tetraborato de sódio e o hidrogenofosfato de sódio funcionam como sistemas tampões mantendo o pH da solução de detergente neutro próximo a 7,0 evitando, assim, a solubilização da hemicelulose e da lignina. A ação do trietilenoglicol é promover a solubilização de amidos.

O método convencional, no entanto, não remove adequadamente o amido em alguns alimentos como grãos e silagem de grãos superestimando os valores da FDN. Desta forma foi desenvolvida uma modificação da técnica, incluindo o uso da alfa-amilase termoestável no procedimento e/ou uréia para remover o amido em amostras que contenham quantidades consideráveis deste carboidrato, reduzindo substancialmente essa contaminação e ainda, facilitando a filtração (VAN SOEST et al. 1991).

Ao longo dos anos, outras modificações foram propostas no método convencional de VAN SOEST & WINE (1967). Inicialmente o éter monoetilenoglicol era usado para promover a solubilização de amidos, entretanto, por ser teratogênico, foi substituído pelo trietilenoglicol (VAN SOEST et al. 1991). Utilizava-se também a decalina, agente antiespumante, que foi retirado por remover a lignina. O sulfito de sódio, utilizado para remover proteínas contaminantes da FDN partindo ligações disulfídicas e dissolvendo muitas ligações de proteína, também foi suprimido por não removê-las completamente e por possivelmente degradar a lignina e compostos

fenólicos (VAN SOEST et al. 1991) . Neste contexto, faz-se necessária a observação de cada método e suas respectivas modificações. O método de ROBERTSON & VAN SOEST (1981) não utiliza sulfito de sódio, mas utiliza amilase na remoção de amido, assim como MERTENS (1997) que apesar de recomendar o uso desta enzima não o faz para o sulfito. O método de VAN SOEST et al. (1991) não usa a decalina e recomenda o uso do trietilenoglicol, da amilase e da uréia (8 Mol.L^{-1}) para remover amido, sendo opcional o uso do sulfito de sódio.

A determinação do teor de FDA ou da lignocelulose foi desenvolvida para evitar a solubilização da lignina que ocorre parcialmente no método da fibra bruta. VAN SOEST (1963) desenvolveu o método que não utiliza álcali para isolar a fibra, propondo um detergente ácido específico composto de ácido sulfúrico concentrado e detergente brometo de cetil- trimetilamônio (CTAB), a fim de solubilizar o conteúdo celular e as hemiceluloses, obtendo um conteúdo insolúvel em detergente ácido, denominado fibra em detergente ácido. A função do ácido sulfúrico (1 Normal) é de solubilizar açúcares, amido, hemicelulose e algumas pectinas contidas na amostra enquanto que o CTAB é usado na remoção de proteínas.

A pesagem da amostra define a sequência laboratorial a ser seguida. A marcha analítica da forma não sequencial determina que uma nova amostra deva ser pesada na determinação do teor de FDA, enquanto que na forma sequencial procede-se com a determinação de FDA, utilizando-se o resíduo da determinação do teor de FDN (VAN SOEST et al. 1991).

A forma sequencial de análise deve ser empregada preferencialmente no caso de amostras ricas em pectina e sílica biogênica, pois a solução de detergente ácido remove parcialmente estas substâncias podendo os valores da FDA ser aumentados pela presença destes constituintes.

A etapa da digestão das amostras utiliza um sistema digestor constituído por chapas aquecedoras que são controladas individualmente e por condensadores resfriados à água, para manter o volume constante da solução. A filtração utiliza um frasco kitassato acoplado a uma bomba a vácuo. As amostras são transferidas para cadinhos filtrantes de vidro através de lavagem com água destilada quente. A seguir,

deve-se lavar a amostra transferida quantitativamente com acetona por duas vezes, e deixá-la em estufa à 105°C por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite. Por fim, as amostras são resfriadas em dessecador e a seguir pesadas. Os resultados são obtidos levando-se em conta o peso da amostra por se tratar de uma determinação quantitativa gravimétrica.

Na forma não sequencial, faz-se necessário, ainda, a etapa da calcinação das amostras, onde as mesmas são aquecidas a 550°C por três horas em forno mufla, para que as substâncias voláteis sejam decompostas pelo calor e eliminadas. Assim, a matéria orgânica é transformada em dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O). A obtenção de um resíduo claro indica a ausência de matéria orgânica na amostra calcinada.

O uso das autoclaves em substituição ao digestor convencional é um método alternativo (PELL & SCHOFIELD, 1993, DESCHAMPS, 1999 e SENGHER et al., 2008) que tem sido sugerido para as análises de FDN e FDA. As autoclaves não necessitam de termômetro para indicar a temperatura que se encontra a água no seu interior visto que existe uma relação direta entre a pressão do vapor de água saturado e a temperatura desse mesmo vapor. Assim, através desse sistema, é possível digerir as amostras de forma coletiva, não necessitando que as amostras sejam controladas individualmente e manualmente.

As análises desenvolvidas na autoclave oferecem a possibilidade de pesagem das amostras tanto em cadinhos filtrantes como em saquinhos. Na maioria das vezes, saquinhos de TNT, confeccionados no próprio laboratório de análises, têm sido preferencialmente utilizados ao invés dos saquinhos da marca ANKOM, visando a redução do custo da análise (CASALI et al. 2009).

Os cadinhos com placas porosas de vidro ou porcelana, já possuem o meio filtrante fundido ao corpo do cadinho, o que facilita o processo de filtração. Estes, sofrem via de regra, ataque das soluções alcalinas, por isso são utilizados em aplicações diversas, evitando-se apenas soluções alcalinas.

Todas as análises desenvolvidas em autoclave, tanto com o uso dos cadinhos filtrantes como dos saquinhos, seguem a marcha analítica descrita no método

convencional: pesagem das amostras, digestão, lavagem, secagem e pesagem do resíduo, com exceção da filtração que não é feita nas análises que utilizam saquinhos.

No caso da utilização dos cadinhos filtrantes, as amostras são pesadas no próprio cadinho previamente tarado que, em seguida, são acondicionados em béqueres plásticos onde será retida a solução detergente a ser adicionada sobre a amostra. Os cadinhos são acondicionados na cesta da autoclave para a etapa da digestão. Em seguida, a etapa da filtração é feita a vácuo utilizando-se uma trompa de água ou uma bomba de vácuo. Pelo vácuo criado no kitassato, a pressão atmosférica impele o líquido através dos poros do filtro, retendo a amostra. Durante a filtração, ocorre o processo de lavagem das amostras com água quente e acetona. A lavagem com água quente tem a finalidade de remover toda solução detergente contida no resíduo da fibra após a digestão, enquanto que a acetona facilita a secagem, em estufa, deste resíduo fibroso.

Quando as análises são desenvolvidas em saquinhos (KOMAREC, 1993, DESCHAMPS, 1999, SENGGER, 2008), as amostras são pesadas, individualmente, em saquinhos previamente tarados. A seguir, os saquinhos são selados à quente e acondicionados em um béquer plástico de volume maior ou igual a dois litros. A solução detergente é, então, adicionada a esse recipiente até que todos os sacos fiquem imersos e em seguida procede-se a etapa da digestão na autoclave de forma similar à descrita quando do uso dos cadinhos filtrantes. A principal vantagem desse método alternativo é a redução no tempo da análise, principalmente pela supressão da etapa da filtração e pela lavagem das amostras acondicionadas nos saquinhos ser feita de forma coletiva.

Tanto o método convencional quanto os métodos alternativos nas análises de FDN e FDA, seguem a rotina de uma análise gravimétrica que utiliza uma série de operações para se determinar a quantidade de um constituinte de uma amostra, que pode ser por pesagem direta do elemento puro ou de um de seu derivado, cuja composição é conhecida e bem definida. O procedimento analítico gravimétrico constitui-se em um método de extensa aplicação, principalmente pelas etapas de laboratório de fácil execução e por utilizar equipamentos simples e de manuseio fácil. Entretanto, algumas desvantagens são observadas, tais como: o tempo muito longo na

execução de cada etapa, o que o torna um método sujeito a uma série de erros acumulativos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo

Avaliar diferentes metodologias propostas para análises de FDN e FDA, visando a precisão dos dados analíticos, a redução no tempo das análises e no descarte de resíduos químicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e época

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, no período de março a julho de 2010.

2.2 Amostras

Foram utilizadas seis amostras de uso corrente na alimentação de ruminantes sendo cinco amostras de alimentos volumosos: feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), silagem de milho (*Zea mays* L.), capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) e capim-marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e uma amostra de alimento concentrado protéico, de uso comum no estado do Maranhão, o farelo de babaçu (*Orbignya phalerata*).

As amostras oriundas de áreas pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, colhidas no mês de março de 2010, foram cana-de-açúcar e silagem de milho, provenientes do Laboratório de bovinocultura de leite; feno de Tifton 85 colhido na área de Caprinocultura e as amostras dos capins xaraés e marandu, obtidas na área de Forragicultura. A amostra do farelo de babaçu, por ser comum no Estado do Maranhão,

foi proveniente do município de Vargem Grande e adquirida na Distribuidora DAMABLA em São Luís-MA, em março de 2010.

2.3 Preparo das amostras

O farelo de babaçu foi processado na própria distribuidora que o comercializa sendo que, em uma primeira etapa, ocorreu a extração do óleo e, em seguida, a polpa seca foi moída e acondicionada para venda.

Tanto o farelo de babaçu quanto o feno de Tifton 85, por serem amostras com baixo teor de umidade, não necessitaram da etapa da pré-secagem. Todas as demais amostras foram pré-secas observando-se o procedimento descrito por SILVA & QUEIROZ (2002). As amostras de cana-de-açúcar, silagem de milho, capim-xaraés e capim-marandu foram submetidas à pesagem em balança semi-analítica digital (MARTE), com precisão de 0,01g e acondicionadas em sacos de papel perfurados a fim de facilitar a entrada de ar quente durante a pré-secagem. Em seguida, os sacos contendo as amostras foram colocados em bandejas de inox e submetidos à pré-secagem a 60°C, por 72 horas em estufa com renovação e circulação de ar (MA 037 – Marconi).

A seguir, o material foi esfriado sobre os balcões de laboratório por uma hora e em seguida pesado para determinação da matéria seca ao ar ou 1ª matéria seca (1ªMS). O próximo passo consistiu na moagem, de modo a se obter um pó bem fino, utilizando-se moinho de faca (TE-680, Tipo Willye – Tecnal) e peneiras com crivos de um e cinco milímetros. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos para serem submetidas, posteriormente, ao processo da secagem definitiva conforme descrito por SILVA & QUEIROZ (2002). Foram pesados cerca de um grama de cada amostra em cadinhos limpos e previamente tarados, e colocados em estufa de secagem e esterilização (315 SE – Fanem), à 105°C por 16 horas. O material foi então colocado em dessecador por uma hora aproximadamente, para que a temperatura

retornasse à ambiente e, em seguida, pesado para determinação da 2ª matéria seca (2ªMS).

Todas as determinações foram feitas em triplicata e os resultados médios obtidos com os desvios padrão, em cada amostra, estão dispostos na Tabela 1.

Tabela1. Valores médios obtidos na pré-secagem (1ªMS) e secagem definitiva (2ªMS) e desvios padrão

Amostras	1ªMS (%)	desvios padrão	2ªMS (%)	desvios padrão
feno de Tifton	---		90,28	0,015
farelo de babaçu	---		91,65	0,021
cana-de-açúcar	22,65	0,074	93,61	0,012
silagem de milho	32,08	0,045	94,95	0,011
capim-marandu	30,18	0,032	95,03	0,018
capim-xaraés	24,18	0,056	95,37	0,015

2.4 Preparo dos reagentes analíticos

Na preparação das soluções detergentes adotou-se a marcha descrita por VAN SOEST et al. (1991), dispensando o uso do sulfito de sódio.

Utilizaram-se duas soluções: solução de detergente neutro e solução de detergente ácido. Em cada método de análise adotado, foram preparados, separadamente, 15 litros de cada solução detergente com o objetivo de minimizar possíveis erros nas determinações quantitativas. O procedimento adotado considerou uma única preparação das soluções reagentes de concentrações conhecidas para cada método utilizado, visando a repetibilidade dos resultados.

A solução de detergente neutro foi preparada pesando-se, para cada litro, 18,61 gramas de ácido etilenodiamintetracético P.A (EDTA) e 6,81 gramas de tetraborato de sódio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), para posterior dissolução, em conjunto, por aquecimento. Paralelamente, outra solução composta por 30 gramas de lauril sulfato de sódio (detergente) e 10 mL de trietilenoglicol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$), foi preparada e misturada à primeira. Por fim, pesou-se 4,56 gramas de hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) e

adicionou-se aos demais reagentes, sendo este dissolvido também por aquecimento. Seguindo as recomendações de VAN SOEST et al. (1991), não foram utilizados a decalina (agente antiespumante), por remover a lignina e o sulfito de sódio (remoção de proteínas) por não remover as proteínas completamente e por degradar a lignina e compostos fenólicos.

O preparo de cada litro de solução de detergente ácido consistiu na dissolução de 20 gramas de brometo de cetil-trimetilamônio em 28 mL de ácido sulfúrico (1 Normal), à temperatura ambiente.

Todos os reagentes utilizados foram da marca Synth, com exceção do brometo de cetil-trimetilamônio, fabricado pela Vetec.

No procedimento de lavagem das amostras, foi utilizada acetona P.A (A.C.S – Synth) como solvente e nas determinações do teor de FDN nas amostras de silagem de milho utilizou-se a enzima alfa-amilase (VAN SOEST et al., 1991), termoestável Termamyl (Tecnoglobo).

Toda a água utilizada nos procedimentos analíticos foi deionizada em Sistema Purificador- Gehaka, modelo DG300.

2.5 Tratamentos

Na análise de cada alimento, o delineamento de tratamentos foi um fatorial cruzado 4x2 (4 metodologias e 2 formas de análises).

2.6 Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método convencional (não sequencial e sequencial)

Todo procedimento prático de uma análise gravimétrica consiste no desenvolvimento das seguintes etapas sucessivas: preparação da amostra, preparação da solução, pesagem da amostra, ataque químico da amostra, precipitação, digestão,

filtração, lavagem, calcinação ou secagem, pesagem e cálculos gravimétricos. Portanto, após o preparo das amostras e dos reagentes analíticos e seguindo-se o procedimento do método de VAN SOEST et al. (1991), prosseguiu-se com a pesagem das amostras. Considerando os seis alimentos estudados nas cinco repetições analíticas, cada uma em tréplica, e ainda, as duas determinações analíticas (FDN e FDA) desenvolvidas nos quatro métodos testados, observando-se as duas sequências de análises adotadas (não sequencial e sequencial), foram obtidos 360 resultados. Para tanto, considerou-se a repetitividade (“repeatability”) das análises, que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO (INMETRO, 2000). Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade (ANVISA, 2010). Assim, a repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações.

Em cada determinação na forma não sequencial, utilizaram-se cerca de meio grama da amostra, pesados em béqueres numerados com capacidade de 600 mL. As pesagens foram feitas utilizando-se balança analítica de precisão, Analytical Plus (Ohaus). A seguir, adicionou-se em cada béquer, contendo a amostra, cerca de 100 mL de solução de detergente neutro (nas análises de FDN) ou de solução de detergente ácido (nas análises de FDA). Cada béquer foi acoplado ao aparelho digestor formado por chapas aquecedoras com controle de temperatura individual e por condensadores resfriados com água.

O processo de digestão das amostras teve duração de uma hora, contada a partir da fervura da solução, sempre com o controle manual de cada amostra para manter o volume constante da solução nos béqueres. Conforme o método modificado por VAN SOEST et al. (1991), apenas nas determinações de FDN, foi adicionado 0,2 mL de enzima alfa-amilase termoestável, por amostra analisada de silagem de milho, antes da etapa da digestão.

A etapa da filtração das amostras utilizou um frasco kitassato acoplado a uma bomba a vácuo. Primeiramente as amostras foram filtradas para separação da solução detergente e posterior recuperação e reutilização. A filtração foi feita nos cadinhos filtrantes de vidro com placa sinterizada (porosidade nº 2), capacidade de 50 mL, marca Vidrolabor, previamente tarados, através de lavagem com água deionizada quente (90 até 100°C), por duas vezes. A seguir, lavou-se a amostra com acetona também por duas vezes. O volume médio de acetona utilizado em cada lavagem foi de 30 mL por amostra. Toda a acetona utilizada durante as análises foi acondicionada em frasco de vidro âmbar para posterior recuperação. A etapa da secagem consistiu em deixar os cadinhos filtrantes em estufa à 105°C por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite. Por fim, eles foram resfriados em dessecador e pesados na mesma balança usada nas pesagens iniciais. Os resultados analíticos foram obtidos levando-se em conta o peso da amostra, por se tratar de uma determinação quantitativa gravimétrica, utilizando-se a fórmula definida em (1), na determinação dos teores de FDN e FDA:

$$\% FDN \text{ ou } \% FDA = \frac{(PC - T)}{PA} \times 100 \quad (1)$$

onde,

PA = peso de matéria seca da amostra em gramas; PC = peso, em gramas, do cadinho mais resíduo da fibra detergente após a digestão e secagem; T = tara (peso inicial) do cadinho em gramas.

Posteriormente, em todas as determinações não sequenciais, seguiu-se a etapa da calcinação, onde por meio de aquecimento em altas temperaturas, todas as substâncias voláteis se decompõem pelo calor e são eliminadas e a matéria orgânica é transformada em dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O). O processo consistiu na queima das amostras, colocando-se os cadinhos filtrantes em forno mufla (Nova Técnica), a 550°C, por três horas. Obteve-se um resíduo claro, indicando ausência de matéria orgânica, o qual foi pesado em balança analítica digital.

As análises para determinação dos teores de FDN na forma sequencial seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente: pesagem da amostra em béquer, adição da solução reagente em cada béquer, digestão individual das amostras, filtração inicial com separação da solução detergente para posterior recuperação e reutilização da mesma, filtração das amostras com transferência para cadinhos filtrantes utilizando-se água deionizada quente e acetona, acondicionamento da acetona para recuperação posterior, secagem em estufa dos cadinhos filtrantes, resfriamento em dessecador e pesagem do resíduo. A partir desse ponto, as análises sequenciais, partem do princípio que se utilizará a mesma amostra já utilizada na marcha analítica de FDN para determinação do teor de FDA. Assim, os cadinhos com os resíduos das análises de FDN foram reutilizados e colocados em béqueres contendo cerca de 100 mL de solução de detergente ácido e, as amostras foram novamente acopladas ao aparelho digestor controlando-se manualmente e individualmente a temperatura de cada béquer até que, no momento da fervura, iniciou-se a contagem de 60 minutos para que ocorresse a digestão das amostras. A filtração, na forma sequencial de análise é mais simples e rápida, considerando que as amostras já se encontram nos cadinhos filtrantes. As etapas de secagem em estufa, resfriamento das amostras em dessecador e posterior pesagem, seguiram o procedimento já descrito anteriormente. Tanto a solução detergente quanto a acetona foram acondicionadas para serem recuperadas e reutilizadas em análises posteriores.

2.7 Métodos alternativos com uso da autoclave

A metodologia alternativa que adota o uso da autoclave (PELL & SCHOFIELD, 1993, DESCHAMPS, 1999 e SENGER et al. 2008) é uma simplificação dos procedimentos analíticos originais, sem alteração dos princípios do método proposto por Van Soest. Os procedimentos analíticos testados pelos autores tiveram como foco a precisão analítica dos resultados, redução no tempo e custo das análises desenvolvidas diariamente por laboratórios de análise de forrageiras e alimento animal.

O procedimento prático nas análises alternativas de FDN e FDA empregou um novo modelo de frasco de extração, pois a autoclave é um sistema hermeticamente fechado cuja vantagem se dá pelo aumento da pressão e consequente aumento da temperatura em menor tempo. Essa elevação de temperatura em menor tempo facilita a solubilização dos componentes da parede celular, diminuindo o tempo da análise.

Os métodos alternativos testados diferiram quanto ao material usado para o acondicionamento das amostras durante a análise. Para efeito de organização, os métodos alternativos foram, assim, denominados:

Método alternativo 1 - autoclave/ saquinhos ANKOM

Método alternativo 2 - autoclave/ saquinhos TNT

Método alternativo 3 - autoclave/ cadinhos filtrantes

Todos os três métodos alternativos foram testados tanto nas análises de FDN quanto de FDA, observando-se as duas formas de análises (não sequencial e sequencial), sempre nos seis alimentos, com cinco repetições, cada uma em tréplica, com a utilização de soluções detergentes originais. Assim, nesta etapa foram desenvolvidas 60 análises gerando 1080 resultados analíticos.

2.8 Determinação dos teores de FDN e FDA pelos métodos alternativos 1 e 2 (não sequencial e sequencial)

Os métodos alternativos 1 e 2 que utilizam saquinhos para acondicionamento das amostras e autoclave como sistema digestor, seguiram as recomendações descritas por KOMAREC (1993) quanto ao uso dos saquinhos em substituição ao cadinho filtrante e de PELL & SCHOFIELD (1993), DESCHAMPS (1999) e SENGGER et al. (2008), quanto ao uso da autoclave. O tempo e a temperatura utilizados na autoclave seguiram as recomendações propostas por SENGGER et al. (2008).

No método alternativo 1, os saquinhos da ANKOM foram adquiridos prontos para uso, em caixas contendo 100 unidades. Os saquinhos de tecido não tecido (TNT) utilizados no método alternativo 2, foram confeccionados manualmente, utilizando-se um TNT de 100 micras (μ) e um molde nas dimensões do saquinho da ANKOM (5 cm x 5 cm). Os sacos confeccionados foram colocados de molho com água e detergente neutro por aproximadamente 30 minutos, sendo agitados manualmente e depois enxaguados em água corrente diversas vezes até remoção completa do sabão. Este procedimento foi feito para retirar qualquer impureza contida no tecido (TNT) após ser manipulado na etapa da confecção dos saquinhos. Posteriormente, os saquinhos foram secos em estufa com renovação e circulação de ar (MA 037 – Marconi), à 65°C por cinco horas, seguidos de uma seleção daqueles que não apresentavam nenhum defeito na malha. A próxima etapa foi selar as bordas dos saquinhos de TNT utilizando uma seladora de pé (IMAP), finalizando a confecção dos mesmos.

No desenvolvimento das análises não sequenciais, tanto os saquinhos da ANKOM quanto os de TNT foram devidamente identificados, pré-secos a 105°C e tarados em balança analítica digital.

A etapa da digestão nos métodos alternativos 1 e 2 (não sequencial) foi feita de maneira simultânea, colocando-se todos os sacos selados, contendo as amostras, imersos em um único recipiente de plástico contendo 600 mL de solução de detergente neutro (nas análises de FDN) ou solução de detergente ácido (nas análises de FDA). Nessa etapa, observou-se redução significativa do volume gasto da solução reagente, considerando que no método convencional utilizaram-se 100 mL para cada uma das 18 amostras analisadas por repetição, perfazendo um total de 1800 mL. Após o término das análises, a solução detergente foi separada para posterior recuperação e reutilização.

Em cada repetição utilizou-se 19 sacos, sendo um saco na determinação do branco e os demais nas trélicas dos seis alimentos. O béquer plástico foi, então, acondicionado no cesto de inox da autoclave vertical (Phoenix) e colocado no interior do equipamento contendo água.

No caso das determinações de FDN das amostras de silagem de milho, após o acondicionamento dos 19 saquinhos no béquer plástico, adicionaram-se quatro mL (0,2 mL/amostra) de enzima alfa-amilase termoestável, seguindo-se a digestão das amostras (VAN SOEST et al. 1991).

A etapa da digestão, utilizando a autoclave, ocorreu em 40 minutos à uma temperatura de 110°C (SENGER et al., 2008), excluindo o tempo de aquecimento prévio da água e de resfriamento após a execução da análise. A autoclave é um sistema totalmente fechado, que permite que o vapor da água em aquecimento, bem como da solução reagente, não se dispersem, fazendo com que a pressão interna se torne superior à pressão atmosférica. Essa elevação de pressão faz com que ocorra um aquecimento mais rápido e que a temperatura no interior do equipamento permaneça constante. A grande vantagem deste sistema é que ele permite que um maior número de amostras seja analisada, de forma coletiva, ao mesmo tempo, sem que haja um controle individual e manual da temperatura.

Após a digestão, procedeu-se com a lavagem coletiva dos saquinhos, que foram submetidos a três enxágues com água deionizada quente durante cinco minutos e, posteriormente, escorridos e imersos em acetona por três minutos. O volume médio de acetona utilizado na lavagem dos 19 saquinhos, em cada repetição, foi de cerca de 250 mL, volume este, bem menor do que o utilizado no método convencional (cerca de 540 mL ou 30 mL por cada amostra). A acetona utilizada na lavagem foi acondicionada em frasco de vidro âmbar para ser recuperada e reutilizada em outras análises. Os saquinhos foram secos em estufa, à 105°C, por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite. Em seguida, foram colocados em dessecador e após atingirem a temperatura ambiente, foram pesados em balança analítica digital. A partir destes pesos foram calculadas as concentrações de FDN e FDA nas amostras analisadas, utilizando a fórmula definida em (2)

$$\% FDN \text{ ou } \% FDA = \frac{[PE - (T \times B)]}{PA} \times 100 \quad (2)$$

onde,

PA = peso de matéria seca da amostra em gramas; PE = peso, em gramas, do saquinho mais resíduo da fibra detergente após digestão e secagem; T = tara (peso inicial) do saquinho em gramas; B = valor do branco, em gramas (peso final do saquinho após secagem/ peso inicial do saquinho).

Nas determinações não sequenciais, após a etapa de pesagem dos saquinhos, estes foram colocados em cadinhos de porcelana, previamente limpos, numerados e tarados, e submetidos ao aquecimento em forno mufla (Nova Técnica), a 550°C, por três horas. A seguir, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados em balança analítica digital.

Na forma sequencial de análise, as determinações relativas aos teores de FDN foram desenvolvidas similarmente ao relatado nas análises desenvolvidas na forma não sequencial. A diferença entre as duas formas se dá na finalização das análises de FDN.

Na análise sequencial, após a pesagem dos saquinhos na determinação dos teores de FDN, estes foram reutilizados nas determinações de FDA. Assim, os 19 saquinhos foram acondicionados coletivamente em béquer plástico e imersos em 600 mL de solução detergente ácida, colocados em autoclave para digestão em 40 minutos, secos em estufa, à 105°C por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite, resfriados em dessecador e pesados para determinação das concentrações de FDA, utilizando-se a mesma equação. Aqui, não é feita a etapa de calcinação em mufla. Mais uma vez, tanto a solução detergente quanto a acetona utilizada foram recuperadas para serem reutilizadas posteriormente.

2.9 Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método alternativo 3 (não-sequencial e sequencial).

O método alternativo 3 utilizou cadinhos filtrantes no acondicionamento das amostras segundo as recomendações descritas por VAN SOEST et al. (1991), com digestão em autoclave de acordo com PELL & SCHOFIELD (1993), DESCHAMPS

(1999) e SENGGER et al. (2008). O tempo e a temperatura utilizados na autoclave seguiram as recomendações propostas por SENGGER et al. (2008).

Nas análises desenvolvidas na forma não sequencial, o procedimento prático adotado em cada repetição das análises consistiu em pesar os 18 cadinhos limpos, previamente secos em estufa por quatro horas e resfriá-los em dessecador. A seguir, foram pesados cerca de meio grama de cada amostra, em tréplica, nos cadinhos filtrantes, que foram acoplados em béqueres plásticos individuais, adicionando-se cerca de 600 mL de solução de detergente neutro (nas análises de FDN) ou solução de detergente ácido (nas análises de FDA) distribuídas nos 18 béqueres plásticos que, em seguida, foram ajustados na cesta de inox acondicionada dentro da autoclave contendo água, para o processo da digestão.

A digestão ocorreu em 40 minutos e logo após seguiu-se com a lavagem dos cadinhos. O processo da lavagem foi feito em kitassato acoplado à bomba de vácuo, utilizando água deionizada quente e acetona. O enxágue com água deionizada quente se deu até a remoção completa da solução detergente. Posteriormente, iniciou-se a secagem das amostras em estufa, à 105°C, por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite. As amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas na mesma balança analítica utilizada na pesagem inicial das amostras. A recuperação da solução detergente utilizada bem como da acetona usada no processo da lavagem das amostras (cerca de 500 mL) foi desenvolvida. Os teores de FDN e FDA foram calculados pela diferença entre a tara do cadinho e o peso do cadinho mais resíduo da fibra detergente após digestão e secagem, utilizando a fórmula definida em (1).

Ao final de cada análise de FDN ou de FDA, os cadinhos foram levados à mufla por três horas, em temperatura próxima de 550°C, para queima da matéria orgânica.

Nas análises desenvolvidas na forma sequencial o procedimento prático adotado na determinação de FDN foi o mesmo descrito anteriormente. Após a pesagem dos 18 cadinhos filtrantes contendo o resíduo da fibra detergente (obtido depois da digestão), estes foram reutilizados nas análises de FDA e para tanto, colocou-se cada um em béqueres plásticos individuais, adicionou-se cerca de 30 mL de solução de detergente

ácido em cada béquer, ajustou-se em cesta de inox procedendo com a digestão em autoclave por 40 minutos.

A seguir, foram desenvolvidas as mesmas etapas: filtração, acondicionamento da solução reagente e da acetona para recuperação posterior, secagem, resfriamento e pesagem dos cadinhos com os resíduos da fibra detergente, seguido dos cálculos através da fórmula definida em (1).

2.10 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4x2 (4 metodologias e 2 formas de análises).

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + MT_i + FM_j + (MT*FM)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

onde: Y_{ijk} = teores de FDN e FDA; μ = efeito geral da média; MT_i = efeito do método i; FM_j = efeito da forma j; $(MT*FM)_{ij}$ = efeito da interação entre o método i e a forma j; ε_{ijk} = erro residual.

O teste de Normalidade dos erros utilizado foi Cramer-von-miser ($\alpha = 5\%$) e o teste de homocedasticidade foi o Levene ($\alpha = 5\%$).

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo procedimento General Linear Models (GLM) do Programa Statistical Analysis System (SAS 9.1®). As médias foram comparadas pelo teste de Dunnette, tendo o método convencional como o “controle” ($\alpha = 5\%$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do descarte de resíduos químicos em análises de FDN e FDA pelos métodos convencional e alternativos (não sequencial e sequencial)

A avaliação do descarte de resíduos químicos em cada metodologia analítica adotada na determinação dos teores de FDN e FDA foi feita observando-se a quantidade de reagentes químicos utilizados e seu consequente despejo no meio ambiente. Em todas as análises desenvolvidas (não sequencial e sequencial) foram utilizadas soluções detergentes (neutra e ácida) na etapa da digestão das amostras e acetona na lavagem das mesmas. As determinações analíticas desenvolvidas com reagentes químicos e acetona originais perfizeram um total de 1440 análises. Na Tabela 2 estão apresentados os volumes médios gastos de soluções detergentes e acetona em cada análise desenvolvida com tréplicas, nos seis tipos de alimentos, em cada metodologia avaliada e os respectivos desvios padrão.

Tabela 2. Volumes médios (Vm) gastos de soluções detergentes e acetona e desvios padrão /metodologia

Metodologia	soluções detergentes Vm (mL)	acetona Vm (mL)	desvios padrão
convencional	1800	520	0,045
alternativo 1	600	250	0,056
alternativo 2	600	260	0,038
alternativo 3	600	510	0,042

Observou-se que o método convencional foi o que mais consumiu reagentes químicos; tanto as soluções detergentes quanto a acetona.

Todas as metodologias alternativas utilizaram uma quantidade bem menor de soluções detergentes quando comparadas ao método convencional. Isto foi decorrente das diferenças nas metodologias testadas e seus processos de digestão e lavagem distintos. Nos métodos alternativos 1 e 2 que utilizam saquinhos para acondicionar as amostras, a imersão em solução detergente é feita de forma coletiva em um único

béquer plástico, o que reduz consideravelmente o volume de reagente necessário para provocar a imersão dos saquinhos. No método alternativo 3 que utiliza cadinhos filtrantes, a imersão das amostras acondicionadas nos cadinhos é feita em recipientes plásticos individuais, o que também reduziu a quantidade de solução detergente utilizada. No método convencional, as amostras foram imersas em béqueres com capacidade de 600 mL, volume que requereu mais solução na imersão das amostras.

Em relação ao uso da acetona na etapa da lavagem, observou-se que todos os métodos alternativos requereram um volume menor de acetona sendo que não se observou uma diferença considerável entre os métodos convencional e alternativo 3 que fizeram uso dos cadinhos filtrantes. Estes necessitaram de maior volume de acetona na etapa da lavagem, por ser um processo manual e individual. Ao passo que a lavagem dos saquinhos (ANKOM e TNT) foi feita de maneira coletiva, requerendo menos tempo, solvente (acetona) e gerando menos resíduo, reduzindo, conseqüentemente, a poluição ambiental.

Vale ressaltar que quando comparado o tempo despendido na realização das análises que utilizam cadinhos filtrantes (métodos convencional e alternativo 3), este é extremamente maior do que o utilizado nos métodos alternativos 1 e 2 (saquinhos da ANKOM e TNT, respectivamente). Nos métodos alternativos 1 e 2 a etapa da lavagem se dá de forma mais rápida, pois a prática emprega a lavagem coletiva dos saquinhos ao passo que nos métodos convencional e alternativo 3, a lavagem é morosa, cansativa e uma importante fonte de erro, por ser executada separadamente em cada cadinho filtrante.

Assim, os resultados obtidos indicam que todos os métodos alternativos (1, 2 e 3) permitiram redução na quantidade de reagentes químicos utilizados com conseqüente redução no custo das análises, geraram menores impactos ambientais e aumentaram o rendimento de análises diárias.

3.2 Avaliação quantitativa das diferentes metodologias e formas propostas para análises de FDN e FDA

Na Tabela 3 são apresentados os valores de F com respectivas probabilidades p e dos coeficientes de variação (CV) obtidos na análise de variância dos teores de FDN, nos seis alimentos analisados.

Tabela 3. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDN nos alimentos analisados

ESTATÍSTICAS	ALIMENTOS					
	feno de Tifton	cana-de-açúcar	silagem de milho	farelo de babaçu	capim-xaraés	capim-marandu
F p/ MT ⁽¹⁾	21,05(p<0,01)	59,96(p<0,01)	60,45(p<0,01)	6,25(p<0,01)	24,54(p<0,01)	32,63(p<0,01)
F p/ FM ⁽²⁾	1,10 (p>0,10)	1,08 (p>0,10)	3,70 (p=0,05)	0,24 (p>0,10)	3,50 (p=0,05)	2,30 (p>0,10)
F p/ MT*FM ⁽³⁾	1,19 (p>0,10)	1,80 (p>0,10)	0,24 (p>0,10)	7,14 (p>0,10)	0,28 (p>0,10)	2,52 (p=0,05)
CV	2,04	2,86	6,06	6,58	2,24	2,12

(1) método; (2) forma; (3) interação método e forma

Observa-se que houve diferença significativa ($p<0,01$) dos métodos em todos os alimentos estudados. Em relação à forma adotada no procedimento analítico (não sequencial ou sequencial), esta não diferiu significativamente ($p\geq 0,05$) em todos os alimentos estudados. Não houve interação significativa ($p\geq 0,05$) entre o método e a forma de análise em todos os alimentos.

Os maiores coeficientes de variação obtidos foram na silagem de milho (6,06) e farelo de babaçu (6,58), observando-se nos demais alimentos, valores similares e mais baixos, confirmando a precisão das análises.

Apresentam-se na Tabela 4 as médias dos teores de FDN obtidas nos seis alimentos analisados, considerando os métodos e as formas analíticas adotadas.

Tabela 4. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, formas e métodos estudados na avaliação dos teores de FDN

ALIMENTOS	FORMAS	MÉTODOS				
		MTC ⁽¹⁾	MTA ₁ ⁽²⁾	MTA ₂ ⁽³⁾	MTA ₃ ⁽⁴⁾	GERAL
FENO DE TIFTON	NS ⁽⁵⁾	78,90	78,76	79,72	81,99	79,73^{a(II)}
	S ⁽⁶⁾	79,06	78,91	78,51	81,63	79,53^a
	GERAL	78,98	78,84	79,11	81,82^(I)	
CANA-DE-AÇÚCAR	NS	54,08	50,22	49,96	53,42	51,92^a
	S	52,89	50,24	49,50	53,94	51,64^a
	GERAL	53,48	50,23*	49,73*	53,68	
SILAGEM DE MILHO	NS	41,72	55,69	48,39	50,08	48,97^a
	S	44,07	54,52	48,03	49,01	48,91^a
	GERAL	42,90	55,11*	48,21*	49,54*	
FARELO DE BABAÇU	NS	70,94	62,81	67,77	65,07	66,73^a
	S	65,84	64,96	67,07	70,31	67,04^a
	GERAL	68,39	63,88*	67,42	67,99	
CAPIM-XARAÉS	NS	68,96	72,28	70,20	71,48	70,69^a
	S	68,33	71,34	69,75	71,30	70,18^a
	GERAL	68,64	71,81*	69,98*	71,39*	
CAPIM-MARANDU	NS	72,44	77,02	74,49	75,79	74,91^a
	S	72,57	75,21	74,21	75,97	74,48^a
	GERAL	72,51	76,15*	74,35*	75,89*	

(I) Médias dos métodos (2), (3) e (4) seguidas por (*) diferem do controle pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$)

(II) Média das formas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($\alpha = 0,05$)

(1) MTC – Método Convencional (bloco digestor/ cadinhos filtrantes)

(2) MTA₁ – Método Alternativo 1 (autoclave/ANKOM)

(3) MTA₂ – Método Alternativo 2 (autoclave/TNT)

(4) MTA₃ – Método Alternativo 3 (autoclave/cadinhos filtrantes)

(5) NS – Forma Não sequencial

(6) S – Forma Sequencial.

Nas análises de feno de Tifton observou-se que o MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) diferiu ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), considerado como padrão de referência. Assim, os resultados obtidos indicam que as análises de FDN desenvolvidas no feno de Tifton em autoclave com uso de cadinhos filtrantes não são indicadas e que as análises em autoclave com uso dos saquinhos (ANKOM e TNT), não diferem ($p > 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) sendo, portanto recomendadas.

Na cana-de-açúcar o MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT) diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), enquanto que o MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) não diferiu ($p > 0,05$). Neste caso, as análises

desenvolvidas com o uso dos cadinhos filtrantes com digestão em autoclave não perdem a precisão analítica dos resultados obtidos.

Nos alimentos silagem de milho, capim-xaraés e capim-marandu todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Assim, a análise dos teores de FDN pelos métodos alternativos diminui a precisão analítica dos resultados nestes alimentos.

No farelo de babaçu observou-se que apenas o MTA₁ (autoclave/ANKOM) diferiu ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), podendo-se então analisar teores de FDN sem perda da precisão analítica pelo MTA₂ (autoclave/TNT) e MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) neste alimento.

Em todos os métodos analíticos observou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) quanto às formas de análise (não sequencial e sequencial) em todos os alimentos estudados.

A variação obtida no teor de FDN no feno foi de 78,84% (MTA₁) à 81,82% (MTA₃). Estes valores são próximos aos que RODRIGUES et al. (2006) obtiveram em análise de FDN do feno de Tifton-85, de 80,80% em plantas com 28 dias e de 80,70% em plantas de 70 dias.

Os teores de FDN obtidos na cana-de-açúcar variaram de 49,73% (MTA₂) a 53,68% (MTA₃), sendo semelhantes aos valores apresentados por SANTOS et al. (2006) que analisaram a cana-de-açúcar em diferentes idades de corte (11 e 24 meses) apresentando percentuais médios de FDN iguais a 48,60% e 56,88%, respectivamente. Os teores obtidos também estão de acordo com os apresentados por RODRIGUES et al. (1997), que encontraram variação de 45,00% a 56,00% para FDN na avaliação de 11 variedades de cana-de-açúcar.

Variação mais ampla nos teores de FDN foi observada na amostra de silagem de milho: 42,90% (MTC) a 55,11% (MTA₁). Os valores mais próximos do extremo maior estão de acordo com o teor de 55,44% observado por VALADARES FILHO et al. (2006). Estudos realizados por FOX et al. (1990); VAN SOEST (1994) e CARVALHO (1995) relatam valores de FDN na silagem de milho variando entre 46,00% a 63,20%, faixa de variação mais ampla do que a obtida neste trabalho.

No farelo de babaçu o teor de FDN variou de 63,88% (MTA₁) a 68,39% (MTC). Teores observados (64,50% a 78,70%) por ROCHA JÚNIOR et al. (2003); CAVALCANTE et al. (2005) e VIEIRA et al. (2005), indicam uma faixa de variação mais ampla que engloba os resultados obtidos.

Ao se analisar os métodos, a variação obtida de FDN em amostras de capim-xaraés foi de 68,64% (MTC) a 71,81% (MTA₁), um pouco abaixo do teor (73,40%) relatado por EUCLIDES (2002).

No capim-marandu o teor médio de FDN variou na faixa de 72,51% (MTC) a 76,15% (MTA₁). ARAÚJO (2005) relata que em região subúmida, no período seco com uso de irrigação, o teor de FDN obtido, variou entre 69,80% a 74,31%, enquanto GEREDES et al. (2000) ao estudar o capim marandu, na região sudeste, nas estações do inverno e outono, encontrou valores de FDN iguais a 57,92% e 72,70%, respectivamente. Esta faixa ampla de variação deve-se a fatores ambientais como a luminosidade, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes que influenciam no crescimento das plantas (RODRIGUES, 2004).

Portanto, a utilização dos métodos alternativos sem a perda da precisão analítica e com a redução do custo e do tempo das análises constitui-se uma boa escolha nas análises dos teores de FDN em feno de Tifton, cana-de-açúcar e farelo de babaçu.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de F com respectivas probabilidades p e dos coeficientes de variação (CV) obtidos na análise de variância dos teores de FDA, nos seis alimentos analisados.

Nas análises para determinação de teores de FDA, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,01$) nos métodos em todos os alimentos estudados. Quanto à forma adotada no procedimento analítico (não sequencial e sequencial), esta não diferiu significativamente ($p > 0,10$) em todos os alimentos. Em relação à interação entre o método e a forma de análise não se observou diferença significativa ($p > 0,10$) em todas as amostras estudadas, com exceção da silagem de milho ($p < 0,01$).

Tabela 5. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDA nos alimentos analisados

ESTATÍSTICAS	ALIMENTOS					
	feno de Tifton	cana-de-açúcar	silagem de milho	farelo de babaçu	capim-xaraés	capim-marandu
F p/ MT ⁽¹⁾	77,95(p<0,01)	55,64(p<0,01)	79,74(p<0,01)	51,77(p<0,01)	76,78(p<0,01)	8,45(p<0,01)
F p/ FM ⁽²⁾	0,00 (p>0,10)	0,80 (p>0,10)	0,61 (p>0,10)	0,00 (p>0,10)	3,03 (p>0,10)	1,64 (p>0,10)
F p/ MT*FM ⁽³⁾	2,54 (p>0,10)	1,71 (p>0,10)	8,29 (p<0,01)	2,97 (p>0,10)	2,19 (p>0,10)	1,97 (p>0,10)
CV	13,73	10,59	9,18	12,26	12,43	13,29

(1) método; (2) forma; (3) interação método e forma

Os valores obtidos para os coeficientes de variação (CV) nas análises do teor de FDA variaram de 9,18 a 13,73, confirmando a precisão dos dados obtidos.

Na Tabela 6 encontram-se as médias dos teores de FDA obtidas nas análises dos seis alimentos estudados, considerando-se os métodos e as formas analíticas.

Foi observado o mesmo comportamento analítico nas determinações dos teores de FDA desenvolvidas nos alimentos feno de Tifton, cana-de-açúcar, capim-xaraés e capim-marandu. Todos os métodos alternativos diferiram significativamente ($p<0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Assim, considerando o MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) como padrão de referência, a determinação dos teores de FDA nos alimentos feno de Tifton, cana-de-açúcar, capim-xaraés e capim-marandu por todos os métodos alternativos diminui a precisão analítica dos resultados, em especial pelo MTA₂ (autoclave/saquinho TNT) que apresentou média mais elevada que os demais métodos.

Quanto à forma de análise (não sequencial e sequencial) constatou-se que não houve diferença ($p>0,05$), em todos os métodos analíticos, nas análises desenvolvidas nos alimentos feno de Tifton, cana-de-açúcar, capim-xaraés e capim-marandu.

A silagem de milho foi a única amostra que apresentou interação significativa ($p<0,05$) entre método e forma de análise. Em todas as análises desenvolvidas nas formas não sequencial e sequencial observou-se diferença significativa ($p<0,05$) entre todos os métodos alternativos e o MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Verificou-se também que dentro do MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) não houve diferença ($p>0,05$) quanto as formas de análise, mas se evidenciou perda na precisão analítica. Portanto não se recomenda o uso de todos os métodos alternativos em análises de teores de FDA na silagem de milho.

Tabela 6. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, formas e métodos estudados na avaliação dos teores de FDA

ALIMENTOS	FORMAS	MÉTODOS				GERAL
		MTC ⁽¹⁾	MTA ₁ ⁽²⁾	MTA ₂ ⁽³⁾	MTA ₃ ⁽⁴⁾	
FENO DE TIFTON	NS ⁽⁵⁾	38,78	47,58	63,10	47,21	49,17^{a(II)}
	S ⁽⁶⁾	41,32	43,64	67,12	44,32	48,80^a
	GERAL	40,05	45,61^(I)	65,11*	45,77*	
CANA-DE-AÇÚCAR	NS	30,67	35,39	42,61	34,73	46,08^a
	S	31,38	32,23	43,19	34,15	46,03^a
	GERAL	31,02	33,81*	42,91*	34,44*	
SILAGEM DE MILHO	NS	26,27^a	32,10^{*a}	35,87^{*b}	31,54^{*a}	31,20
	S	25,94^a	28,46^{*b}	39,65^{*a}	30,07^{*a}	31,03
	GERAL	26,11	30,28	37,97	30,78	
FARELO DE BABAÇU	NS	37,82	43,66	56,83	46,01	46,08^a
	S	42,78	40,99	56,84	43,52	46,03^a
	GERAL	40,30	42,33	56,84*	44,77*	
CAPIM-XARAÉS	NS	36,74	46,83	57,19	42,68	45,86^a
	S	37,12	41,28	58,10	39,84	44,09^a
	GERAL	36,93	44,06*	57,65*	41,26*	
CAPIM-MARANDU	NS	38,42	49,12	60,44	44,66	48,16^a
	S	39,71	43,72	61,50	41,82	46,69^a
	GERAL	39,06	46,42*	60,97*	43,24*	

(I) Médias dos métodos (2),(3) e (4) seguidas por (*) diferem do controle pelo teste de Dunnette ($\alpha = 0,05$)

(II) Média das formas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($\alpha = 0,05$)

(1) MTC – Método Convencional (bloco digestor/ cadinhos filtrantes)

(2) MTA₁ – Método Alternativo 1 (autoclave/ANKOM)

(3) MTA₂ – Método Alternativo 2 (autoclave/TNT)

(4) MTA₃ – Método Alternativo 3 (autoclave/cadinhos filtrantes)

(5) NS – Forma Não sequencial

(6) S – Forma Sequencial.

No farelo de babaçu observou-se que o MTA₁ (autoclave/ANKOM) não diferiu ($p>0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), enquanto que o MTA₂ (autoclave/TNT) e MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes) diferiram significativamente ($p<0,05$). Assim, o MTA₁ (autoclave/ANKOM) mostrou-se preciso em análises de FDA no farelo de babaçu. Não foi observada diferença ($p>0,05$) quanto à forma de análise (não sequencial e sequencial).

Os teores médios de FDA obtidos na amostra de feno de Tifton, nos quatro métodos analisados, variaram de 40,05% (MTC) a 65,11% (MTA₂). WEST et al. (1998) *apud* GONÇALVES et al. (2003), trabalhando com feno de Tifton 85, encontraram

valores médios mais baixos (35,60%) em teores de FDA, com idade de corte de 25 dias.

Na cana-de-açúcar observaram-se valores médios de FDA nos quatro métodos analisados, variando entre 31,02% (MTC) a 42,91% (MTA₂). PATE et al. (2001), analisando o valor nutricional de 66 variedades comerciais de cana-de-açúcar plantadas no sul da Flórida, observaram uma ampla variação no teor de FDA (28,30% a 41,50%), compatível com os valores observados neste trabalho.

As análises desenvolvidas na silagem de milho na forma não sequencial revelaram uma variação no teor médio de FDA de 26,27% (MTC) à 35,87% (MTA₂). Quando utilizada a forma sequencial de análises, a variação foi de 25,94% (MTC) à 39,65% (MTA₂). A média obtida por VALADARES FILHO et al. (2002), ao analisarem 112 amostras, foi de 30,80%.

Os resultados obtidos no farelo de babaçu: 40,30% (MTC) a 56,84% (MTA₂), considerando os quatro métodos, estão próximos aos citados por CAVALCANTE et al. (2005) e VIEIRA et al. (2005) que obtiveram valores entre 32,90% a 53,80%. Ainda um teor de 48,30%, foi obtido por MOREIRA FILHO (2008), ao estudar a composição bromatológica de seis espécies nativas de farelo de babaçu do estado do Piauí consumidas por caprinos.

No capim-xaraés a variação das médias obtidas nos resultados dos quatro métodos, foi de 36,93% (MTC) à 57,65% (MTA₂). Observou-se que a média dos resultados obtidos no MTA₂ (autoclave/TNT) está bem mais alta em comparação às médias obtidas nos demais métodos usados. PEREIRA et al. (2008) obtiveram um valor médio de 38,96% em análises de teor de FDA em amostras de capim-xaraés, que é próximo ao valor obtido nas análises pelo MTC

. No capim-marandu a variação observada nas médias foi de 39,06% (MTC) a 60,97% (MTA₂). Os valores obtidos pelos métodos alternativos MTA₁ (46,42%) e MTA₃ (43,24%) se aproximam ao encontrado (46,42%) por PEREIRA et al. (2008), enquanto que a média (39,06%) obtida pelo MTC aproxima-se do teor médio (34,20%) relatado por SANTOS et al. (2008) ao estudar cultivares de capim-marandu submetidas a diferentes níveis de adubações. Observou-se ainda, que a média dos resultados obtidos

no MTA₂ é bem superior em comparação às médias obtidas nos demais métodos utilizados.

Durante todas as análises de determinação do teor de FDA observou-se que o MTA₂ (autoclave/TNT) foi o que apresentou maiores médias e maior divergência das médias obtidas no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes).

CASALI et al. (2009) no trabalho “Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos” relatam que o TNT, embora seja um tecido com estrutura de malha similar ao do ANKOM, não apresenta poros em sua totalidade. Esta característica é conferida ao TNT durante o processo de confecção onde a parte da superfície é vedada por calor. Essa estrutura do tecido poderia ampliar as estimativas de resultados analíticos. Assim, os resultados obtidos permitem sugerir que ainda é necessário averiguar melhor a generalização do uso dos saquinhos confeccionados com TNT em análises de teor de FDN e FDA.

A viabilidade da determinação dos teores de FDA nos alimentos estudados por qualquer uma das formas analíticas ($p > 0,05$) é um resultado de grande importância visto que a forma sequencial de análise é mais rápida e econômica que a não sequencial, por utilizar apenas uma amostra nas determinações dos teores de FDN e FDA. A forma sequencial também é considerada mais exata por estimar, por diferença, a hemicelulose e a celulose.

Vale ressaltar que a forma analítica sequencial não deve ser aplicada em todas as amostras porque existem situações específicas em que as frações de interesse podem ser perdidas no processo (ROBERTSON & VAN SOEST, 1981).

Apenas na silagem de milho observou-se que houve diferença ($p < 0,05$) entre as formas de análises nos métodos alternativos MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT), sendo que no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) e MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes) não foi verificada diferença ($p < 0,05$) entre as formas (não sequencial e sequencial).

Portanto, as determinações dos teores de FDA pelos métodos alternativos não são indicadas nos alimentos estudados, com exceção do farelo de babaçu, cujo teor de FDA poderá ser determinado pelo MTA₁ (autoclave/ANKOM).

4. CONCLUSÕES

As metodologias alternativas utilizadas nas determinações analíticas dos teores de FDN e FDA, com uso da autoclave, permitem ganhos relevantes pela redução dos custos operacionais e do tempo da análise, com a minimização dos impactos ambientais.

A precisão analítica dos métodos alternativos bem como sua utilização, quando comparados ao convencional, depende do alimento analisado.

Nas determinações dos teores de FDN, recomenda-se o MTA₁ (autoclave/ANKOM) em análises do feno de Tifton, o método MTA₂ (autoclave/TNT) em análises do feno de Tifton e farelo de babaçu e o método MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes) na cana-de-açúcar e farelo de babaçu. O método alternativo MTA₁ (autoclave/ANKOM) foi recomendado nas determinações de teores de FDA no alimento farelo de babaçu, sem perda da precisão analítica.

Os resultados de todas as análises não diferiram significativamente quanto à forma (não sequencial e sequencial), com exceção da determinação de FDA na silagem de milho, pelos métodos alternativos MTA₁ e MTA₂ que utilizam digestão em autoclave e saquinhos da ANKOM e TNT, respectivamente.

CAPÍTULO 3. ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO E FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO COM GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS

RESUMO – O trabalho teve como objetivos avaliar o custo, o descarte de resíduos químicos e a precisão das análises dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), desenvolvidas com a reutilização das soluções detergentes (neutra e ácida) e com acetona recuperada, utilizando os métodos convencional e alternativos de análises, nas formas não sequencial e sequencial. Os alimentos utilizados foram feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), silagem de milho (*Zea mays* L.), capim-xaraés (*Brachiaria brizanta* cv. *Xaraés*), capim-marandu (*Brachiaria brizanta* cv. *Marandu*) e o farelo de babaçu (*Orbignya phalerata*). A possibilidade de ganhos econômicos e ambientais foi avaliada através da redução do descarte de produtos químicos no meio ambiente, com a inclusão da etapa de reutilização das soluções detergentes e da recuperação da acetona, durante os procedimentos analíticos. A precisão dos resultados foi observada pela comparação dos resultados dos teores de FDN e FDA obtidos com o uso de soluções detergentes e acetona originais com aqueles provenientes das análises desenvolvidas com soluções detergentes e acetona recuperados. Aplicou-se a análise de variância, pelo procedimento General Linear Models (GLM) do Programa Statistical Analysis System (SAS 9.1®). As médias dos métodos alternativos foram comparadas com o método convencional pelo teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$). O delineamento adotado na análise de cada alimento foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x4x2 (2 utilizações, 4 metodologias e 2 formas de análises). A inclusão da etapa da recuperação da acetona na marcha analítica das determinações dos teores de FDN e FDA, pelos métodos convencional e alternativos, nas formas não sequencial e sequencial, promoveu ganhos tanto econômico como ambiental, observando-se uma taxa de recuperação de 84,12%. A reutilização das soluções detergentes (neutra ou ácida) nas determinações dos teores de FDN e FDA, pelos métodos analíticos convencional e alternativos, nas formas não sequencial e sequencial, promoveu a

redução no custo e no tempo das análises, e, em especial, no descarte de resíduos químicos no meio ambiente, constituindo-se uma alternativa viável, mas não uniforme, devendo-se considerar a combinação do método analítico com o alimento a ser analisado para preservar a precisão das análises. Nas análises dos teores de FDN observou-se a possibilidade de reutilização das soluções detergentes recuperadas na marcha analítica pelo método alternativo que utiliza autoclave e saquinhos da ANKOM, nos capins xaraés e marandu e também pelo método alternativo que utiliza a autoclave e cadinhos filtrantes, na silagem de milho e no capim-marandu. As análises dos teores de FDA podem ser desenvolvidas com reutilização de solução detergente recuperada pelo método alternativo que utiliza a autoclave e cadinhos filtrantes, na cana-de-açúcar.

Palavras-chave: métodos alternativos, precisão, recuperação de acetona, resíduos químicos, reutilização de soluções detergentes

1. INTRODUÇÃO

O questionamento global sobre os danos gerados ao planeta pelas atividades humanas produzidas nas áreas econômicas, científicas e também sociais tem sido objeto de destaque na mídia. Mesmo assim, uma falsa sensação de que a água é um recurso inesgotável tem feito com que o homem não tenha atitudes práticas cotidianas para minimizar os danos ambientais. Segundo RAINHO (1999), 95,1% da água existente no planeta é salgada, sendo imprópria para consumo humano. Dos 4,9% restantes, 4,7% estão na forma de geleiras ou regiões subterrâneas de difícil acesso, e somente 0,2% encontrados em lagos, nascentes e em lençóis subterrâneos, estão aptos para o consumo. Estimativas para o ano de 2050 feitas pela ONU (MACEDO, 2001) apontam cerca de 50 países sem quantidade de água suficiente para toda a população.

Neste contexto, estão inseridos os resíduos químicos gerados não só pelas indústrias, mas também pelos laboratórios de universidades, escolas e institutos de pesquisa (BENDASSOLI et al. 2005). O descarte destes resíduos, de elevada diversidade, gerados em processos químicos, tem feito com que o meio ambiente não consiga degradar e assimilar por processos naturais, estes subprodutos indesejáveis pois, em grande quantidade, não há como serem diluídos sem causar riscos ao homem ou ao meio ambiente.

O primeiro desafio é a conscientização sobre a importância do desenvolvimento de tecnologias limpas que substituam as tecnologias tradicionais que geram resíduos químicos em grandes proporções. As iniciativas da Química Verde englobam todas as áreas da ciência, sempre considerando os princípios fundamentais de sustentabilidade. Assim, a Química Verde é mais que um pensamento científico, é a adoção de práticas visando à prevenção da poluição desenfreada e a minimização no descarte de resíduos químicos.

A reutilização de reagentes químicos no mesmo processo em que foram gerados e a troca de processos tradicionais por metodologias ambientalmente corretas

aparecem como boas alternativas na redução aos danos ambientais (GERBASE et al. 2006).

A eficiência com que os animais utilizam os alimentos é a principal área de pesquisa e aplicação em nutrição animal porque envolve não apenas a comparação da eficiência produtiva dos diversos animais como também a avaliação das diversas fontes alimentares. As análises dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) ocupam papel importante e são metodologias desenvolvidas diariamente e em grande proporção, nos laboratórios de pesquisa.

As soluções de detergente neutro e de detergente ácido, utilizadas nestes procedimentos analíticos, são preparadas pela mistura de vários reagentes químicos, a saber: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tetraborato de sódio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), lauril sulfato de sódio (detergente), hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) e trietilenoglicol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$) utilizados no preparo da primeira solução e brometo de cetil-trimetilamônio (detergente CTAB) e ácido sulfúrico, no preparo da segunda solução. Portanto, uma variedade de resíduos químicos solubilizados nestas análises vem sendo descartada, *in natura*, no ambiente.

O descarte das soluções detergentes utilizadas nestas análises também contribui de forma significativa para a poluição ambiental. Antes mesmo do surgimento dos detergentes sintéticos, o sabão já prejudicava a qualidade das águas, deixando-as muito alcalinas, além de formar uma película insolúvel sobre a superfície dos corpos d'água. Além disso, os detergentes sintéticos amplamente utilizados formam uma espuma branca que reduz a penetração do oxigênio do ar na água, diminuindo assim o oxigênio disponível para respiração dos organismos aquáticos (BORSATO et al. 1999).

O lauril sulfato de sódio, designação genérica empregada para o dodecil sulfato de sódio, é um composto orgânico devidamente registrado no Chemical Abstract Service (CAS) que vem sendo usado na confecção de vários cosméticos e materiais de limpeza, tais como: banhos de espuma, cremes emolientes, cremes depilatórios, loções para mãos, xampus e detergentes domissanitários (WINTER, 1994). Também é utilizado como reagente químico em análises quantitativas. Este uso tem sido motivado por ser um tensoativo aniônico cuja cadeia graxa hidrófóbica está anexada a um grupo

hidrófilo carregado negativamente e por suas propriedades detergentes: molhante, espumógena, emulsificante e solubilizante. Por sua vez, o brometo de cetil-trimetilamônio (detergente CTAB) é um tensoativo catiônico que apresenta o grupo polar com carga positiva. É considerado um detergente de fácil aquisição, baixo custo, incolor e solúvel em água (BRANCINI et al.1983).

Na Química, as associações e misturas de reagentes são realizadas para se obter o máximo proveito das propriedades químicas que as soluções apresentam. Assim, quando se mistura um tensoativo com um agente quelante, como o EDTA, realiza-se a potencialização deste último porque a tensão superficial do líquido é reduzida, favorecendo o contato do agente quelante com a amostra. OSTBY (1957) e NILL (1959) citados por CRUZ-FILHO (1994) enfatizaram que a solução de EDTA deve ser associada ao brometo de cetil-trimetilamônio, para que a sua capacidade umectante seja melhorada. Esta associação ficou conhecida como EDTAC.

A umectação é a capacidade que uma substância líquida possui de umedecer ou molhar uma superfície sólida. Essa característica é muito importante nos agentes tensoativos, pois quanto maior for seu poder de umectância, mais rápido será sua ação. Segundo PÉCORA et al. (1987), os tensoativos aniônicos apresentam capacidade de umectação mais rápida que os tensoativos catiônicos. Eles constataram que os aniônicos, como o lauril sulfato de sódio, apresentava um tempo de umectação em torno de dez segundos em um fio de algodão, enquanto que o tempo gasto pelos catiônicos (CTAB) era em torno de três minutos.

Após a umectação, tem-se o fenômeno de adsorção, onde a parte hidrofóbica, que também é lipofílica une-se à gordura e, a parte hidrofílica liga-se à água. Assim, a cadeia hidrocarbônica funciona como uma ponte que tem uma das extremidades ligada a gordura e a outra (grupo polar) ligada à água. Esse fenômeno é observado até que haja o envolvimento de toda a partícula gordurosa (oleosa), havendo o deslocamento destas partículas das paredes as quais estavam aderidas. O final da adsorção se dá quando a superfície fica totalmente livre da contaminação gordurosa (oleosa) e protegida pelas moléculas do detergente fixadas a ela.

A partícula oleosa, após a adsorção, não pode se depositar novamente sobre a superfície a que ela estava associada. Assim, ela deve ser mantida em suspensão, o que acontece através do mecanismo de repulsão que ocorre entre as partículas oleosas que foram circundadas pelo detergente e que possuem agora, a mesma carga iônica.

As análises dos teores de FDN e FDA que utilizam as soluções detergentes baseiam-se na técnica da extração. A validação de resultados que comprovem a possível reutilização destas soluções sem a perda da precisão analítica nos resultados permitirá ganhos nas áreas econômica e ambiental.

O uso da acetona (propanona) e seu consequente descarte, também fazem parte da rotina laboratorial nas análises de FDN e FDA. Quando descartada no solo, a acetona é biodegradável e não se bioacumula, mas sabe-se que é um produto tóxico à vida aquática, principalmente para os peixes. Quando lançada ao ar, pode ser degradada moderadamente através de reação fotoquímica produzindo radicais hidroxilas (MOZETO & ZAGATTO, 2006).

A inclusão da etapa de recuperação da acetona utilizada durante as determinações de FDN e FDA evitará seu descarte ambiental e contribuirá para a melhoria econômica do processo, pois poderá ser reutilizada nos processos analíticos. Segundo KRAEMER (2002), a análise custo-benefício foi o primeiro método formal de avaliação ambiental conhecido, sendo ainda hoje o mais aceito.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos

Avaliar o custo e o descarte de resíduos químicos na determinação dos teores de FDN e FDA, através da reutilização das soluções detergentes nas análises e também da recuperação da acetona.

Avaliar a precisão analítica na determinação dos teores de FDN e FDA, comparando os resultados das análises desenvolvidas utilizando-se soluções detergentes e acetona originais com os resultados obtidos nas análises com os reagentes reutilizados e acetona recuperada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e época

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, no período de março a julho de 2010.

2.2 Amostras e Reagentes

As amostras e os reagentes analíticos utilizados nas determinações quantitativas dos teores de FDN e FDA na comparação de metodologias analíticas convencional e alternativas com uso da autoclave, descritas no capítulo 2, foram os mesmos utilizados na avaliação da precisão analítica e do impacto econômico-ambiental ao se reutilizar soluções e recuperar solvente durante a marcha analítica. Para tanto, utilizaram-se os seguintes alimentos: feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), silagem de milho (*Zea mays* L.), capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés), capim-marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e farelo de babaçu (*Orbignya phalerata*). Primeiramente, estes foram processados para a determinação da 1ª matéria seca (1ªMS), com exceção do feno de Tifton e do farelo de babaçu. Em seguida, todos os alimentos foram acondicionados em recipientes plásticos e guardados sob refrigeração, até o momento da pesagem para determinação da 2ª matéria seca (2ªMS) e posterior utilização nas análises.

Os reagentes analíticos foram as soluções de detergente neutro, de detergente ácido e a acetona recuperados, após serem utilizadas nas análises anteriores descritas no capítulo 2 e a enzima alfa-amilase termoestável (Termamyl – Tecnoglobo), utilizada nas análises do teor de FDN em silagem de milho (VAN SOEST et al. 1991).

Toda a água utilizada nos procedimentos analíticos foi deionizada em Sistema Purificador (DG300, Gehaka).

2.3 Tratamentos

Na análise de cada alimento, o delineamento de tratamentos foi um fatorial cruzado 2x4x2 (2 utilizações dos reagentes, 4 metodologias e 2 formas de análises).

2.4 Recuperação das soluções detergentes

Tanto as soluções de detergente neutro quanto as de detergente ácido foram recuperadas, sempre após o seu uso inicial, através de filtração simples utilizando um funil de vidro de cano longo (analítico) e papel de filtro qualitativo. A filtração teve por finalidade separar qualquer eventual partícula sólida retida na solução detergente após seu uso inicial. O processo consistiu em passar a solução detergente através de um papel de filtro (material poroso) que reteve as partículas sólidas.

Também foi feito o monitoramento do valor do pH das soluções, em cada análise, tanto nas soluções originais quanto nas soluções recuperadas. Do ponto de vista analítico o pH é um dos parâmetros mais importantes em procedimentos quantitativos, sendo um parâmetro de medida de acidez. Utilizou-se um potenciômetro de bancada (710A – Orion) em todas as medições.

Imediatamente após as medidas de acidez e filtração das soluções, estas foram reutilizadas nas análises de FDN e FDA.

Considerando que as medidas de acidez foram feitas nas duas formas de análise: não sequencial e sequencial, com todos os métodos adotados: método convencional, método alternativo 1 - autoclave/ saquinhos ANKOM; método alternativo 2 - autoclave/ saquinhos TNT e método alternativo 3 - autoclave/cadinhos filtrantes, foram realizadas 80 medidas no potenciômetro, para controle da acidez das soluções detergentes originais e recuperadas. Os resultados médios das medidas de pH das soluções detergentes (neutra e ácida), utilizadas nas análises dos teores de FDN e FDA, bem como os respectivos desvios padrão podem ser observados na Tabela 1.

Tabela1. Valores médios de pH e desvios padrão das soluções detergentes neutra e ácida utilizadas nas análises de FDN e FDA, considerando as formas de análises – não sequencial (NS) e sequencial (S), os métodos - MTC– método convencional; MTA₁ – método alternativo 1; MTA₂ – método alternativo 2 ; MTA₃ – método alternativo 3 e as utilizações das soluções - solução original (SO) e solução recuperada (SR)

FORMA	MÉTODOS	ANÁLISE DE FDN				ANÁLISE DE FDA			
		SO ⁽⁷⁾	DP ⁽⁸⁾	SR ⁽⁹⁾	DP	SO	DP	SR	DP
NS ⁽¹⁾	MTC ⁽³⁾	7,14	0,092	7,16	0,041	1,92	0,083	1,86	0,090
	MTA ₁ ⁽⁴⁾	7,11	0,083	7,15	0,064	1,91	0,062	1,89	0,043
	MTA ₂ ⁽⁵⁾	7,19	0,055	7,18	0,058	1,93	0,052	1,90	0,094
	MTA ₃ ⁽⁶⁾	7,11	0,086	7,10	0,072	1,92	0,051	1,88	0,082
S ⁽²⁾	MTC	7,11	0,082	7,14	0,04	1,91	0,092	1,88	0,026
	MTA ₁	7,08	0,047	7,07	0,09	1,93	0,054	1,87	0,082
	MTA ₂	7,17	0,061	7,12	0,06	1,95	0,062	1,90	0,051
	MTA ₃	7,10	0,090	7,15	0,09	1,95	0,031	1,89	0,086

(1) NS– forma não sequencial ; (2) S– forma sequencial; (3) MTC– bloco digestor/ cadinhos filtrantes; (4) MTA₁ – autoclave/ANKOM; (5) MTA₂ – autoclave/TNT; (6) MTA₃ – autoclave/ cadinhos filtrantes; (7) SO – solução original; (8) DP–desvio padrão; (9) SR – solução recuperada

Em todas as análises (não sequenciais e sequenciais) não foram observadas grandes variações nos valores de pH, indicando bom acondicionamento das soluções reagentes originais e das soluções recuperadas por filtração, bem como ausência de contaminações que provocassem alterações na acidez das mesmas.

2.5 Recuperação da acetona

Toda a acetona utilizada durante o processo de lavagem das amostras nas análises desenvolvidas utilizando-se as soluções detergentes originais (1440 análises), foi acondicionada e recuperada para reuso nos procedimentos das análises com as soluções detergentes recuperadas.

O solvente foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, original do próprio fabricante, e em seguida, recuperado em evaporador rotativo (Tecnal).

A recuperação consistiu em um processo de destilação simples, que permitiu a separação do líquido (acetona) de substâncias não voláteis (resíduos). Todo o processo desenvolvido na recuperação da acetona iniciou com a medição, em proveta, de 500 mL da acetona utilizada nas análises, com posterior transferência para um balão de destilação acoplado a um condensador e imerso em banho-maria. Sob rotação mecânica e aquecimento, a acetona utilizada nas análises foi, simultaneamente, agitada e aquecida, sendo que ao se atingir a temperatura de ebulição da acetona (56,1°C), o vapor foi forçado a passar pelo condensador (tubo de vidro cercado por um fluxo contínuo de água termostatzada), sendo que ao entrar em contato com as paredes frias do condensador, foi condensado. A seguir, a acetona, já pura, foi recolhida em outro recipiente de vidro. Assim, os resíduos contidos na acetona utilizada nas lavagens durante as análises foram separados do solvente.

Toda a acetona empregada nas análises que utilizaram solução detergente recuperada foi proveniente deste processo de purificação. No desenvolvimento das 1440 análises com reagentes originais, o solvente *in natura* não foi descartado no meio ambiente. Com este procedimento foi possível obter ganhos tanto ambientais quanto econômicos.

De acordo com os métodos de análises utilizados (convencional e alternativos 1, 2 e 3), o volume gasto de acetona variou. Isto foi decorrente das diferenças nas metodologias testadas e seus processos de lavagens distintos.

A Tabela 2 mostra os volumes médios gastos (Vm) de acetona nas análises de FDN e FDA e os desvios padrão, durante uma repetição de análise composta por dezoito (18) amostras (tréplica dos seis alimentos), em cada metodologia empregada.

Tabela 2. Volumes médios gastos (Vm) de acetona em uma repetição analítica e desvios padrão/ metodologia

Metodologia	Vm (mL) acetona	desvios padrão
convencional	520	0,034
alternativo 1	250	0,026
alternativo 2	260	0,031
alternativo 3	510	0,038

Observa-se que houve uma considerável variação na quantidade de acetona empregada no processo de lavagem de acordo com a metodologia adotada. Os métodos que fizeram uso dos cadinhos filtrantes (convencional e alternativo 3) foram os que mais consumiram acetona no processo de lavagem. Já aqueles que utilizaram os saquinhos ANKOM e TNT (métodos alternativos 1 e 2, respectivamente), permitiram uma redução no uso do solvente, pela lavagem que se dá de forma coletiva. Assim, o uso dos saquinhos nas metodologias para FDN e FDA permite, além do ganho econômico através da redução de solvente empregado no procedimento analítico, a diminuição do descarte de resíduos químicos.

2.6 Determinação dos teores de FDN e FDA pelo método convencional (não sequencial e sequencial).

De posse das soluções detergentes e da acetona, ambos recuperados, prosseguiu-se com o desenvolvimento das análises dos teores de FDN e FDA seguindo o procedimento do método de VAN SOEST et al. (1991). Foram desenvolvidas 10 determinações para cada tipo de sequência adotada (formas não sequencial e sequencial), perfazendo um total de 20 análises. Utilizaram-se os seis alimentos, pesados em tréplica com cinco repetições analíticas, obtendo-se 360 resultados analíticos. Em cada repetição, a reprodução do mesmo procedimento, pelo mesmo analista, com os mesmos aparelhos usados sob as mesmas condições e mesmo local, foi preservada, para obtenção da repetitividade dos resultados (ANVISA, 2010).

Em cada determinação na forma não sequencial, utilizaram-se cerca de meio grama da amostra, pesados em béqueres numerados com capacidade de 600 mL. As pesagens foram feitas utilizando-se balança analítica de precisão, Analytical Plus (Ohaus). A seguir, adicionou-se em cada béquer, contendo amostra, cerca de 100 mL de solução de detergente neutro (nas análises de FDN) ou solução de detergente ácido (nas análises de FDA). Cada béquer foi acoplado ao aparelho digestor formado por

aquecedores e condensadores resfriados com água cujo controle de temperatura se dá individualmente.

O processo de digestão das amostras teve duração de uma hora, contado a partir da fervura da solução, sempre com o controle manual de temperatura em cada amostra para manter o volume constante da solução nos béqueres. Conforme o método modificado por VAN SOEST et al. (1991), nas amostras de silagem de milho, apenas nas determinações de FDN, foi adicionado 0,2 mL por amostra, de enzima alfa-amilase termoestável, antes da digestão.

A etapa da filtração das amostras utilizou um sistema a vácuo. Nesta etapa, a solução detergente reutilizada foi descartada e as amostras transferidas para cadinhos filtrantes de vidro com placa sinterizada, porosidade nº 02, capacidade de 50 mL (Vidrolabor) previamente tarados, através de lavagem com água deionizada quente (90 – 100°C), por duas vezes.

Utilizou-se a acetona recuperada na última lavagem, por duas vezes. A média de volume de acetona utilizada em cada lavagem foi de 30 mL por amostra, sendo descartada após o processo. Na secagem das amostras utilizou-se uma estufa de secagem (315 SE- Fanem), à 105°C, deixando as amostras por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite. Após serem resfriadas em dessecador, as amostras foram pesadas na mesma balança usada nas pesagens iniciais.

Os resultados analíticos foram obtidos utilizando-se a fórmula definida em (1), na determinação dos teores de FDN e FDA:

$$\% FDN \text{ ou } \% FDA = \frac{(PC - T)}{PA} \times 100 \quad (1)$$

onde: PA = peso de matéria seca da amostra em gramas; PC = peso, em gramas, do cadinho mais resíduo da fibra detergente após a digestão e secagem; T = tara (peso inicial) do cadinho em gramas.

Nas determinações não sequenciais, seguiu-se com a etapa da calcinação, realizada em forno mufla (Nova Técnica), à 550°C, por três horas. Por meio de

aquecimento em altas temperaturas, as substâncias voláteis foram decompostas pelo calor e eliminadas. A matéria orgânica contida no resíduo foi transformada em dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), obtendo-se um resíduo claro, o qual foi pesado em balança analítica digital.

As análises de determinação dos teores de FDN na forma sequencial seguiram a mesma marcha analítica descrita anteriormente: pesagem da amostra em béquer, adição da solução reagente recuperada em cada béquer, digestão e filtração individual das amostras, lavagem das mesmas, em cadinhos filtrantes, com água deionizada quente e acetona recuperada, secagem em estufa, resfriamento em dessecador e pesagem do resíduo. A partir desse ponto, a análise sequencial de FDA é feita partindo-se do princípio que se utilizará a mesma amostra proveniente da marcha analítica para FDN. Assim, os cadinhos com os resíduos das análises de FDN foram reutilizados e colocados em béqueres contendo cerca de 100 mL de solução detergente ácida recuperada e, as amostras foram novamente acopladas ao aparelho digestor controlando-se manualmente e individualmente a temperatura de cada béquer até que, no momento da fervura, iniciou-se a contagem de 60 minutos para a digestão das amostras. O processo da filtração, na forma sequencial, é bem mais simples e rápido, considerando que as amostras já se encontram nos cadinhos filtrantes, sendo, apenas, lavados com água deionizada quente e em seguida com acetona recuperada, por duas vezes cada. As etapas de secagem em estufa, resfriamento das amostras em dessecador e posterior pesagem, seguiram o procedimento descrito anteriormente.

Todas as soluções detergentes e a acetona foram descartadas após a realização das análises utilizando reagentes recuperados, ou seja, foram reutilizadas uma só vez.

2.7 Métodos alternativos com uso da autoclave

Os métodos alternativos testados foram os mesmos utilizados nas análises com uso de soluções originais. Estes diferiram quanto ao material usado no

acondicionamento das amostras durante a análise tendo sido denominados da seguinte forma:

Método alternativo 1 - autoclave/ saquinhos ANKOM

Método alternativo 2 - autoclave/ saquinhos TNT

Método alternativo 3 - autoclave/ cadinhos filtrantes

Os três métodos alternativos foram testados tanto nas análises de FDN quanto de FDA, observando-se as duas formas de análises (não sequencial e sequencial), nos seis alimentos, com cinco repetições, cada uma em tréplica. Assim, nesta etapa foram desenvolvidas 60 determinações, obtendo-se 1080 resultados analíticos.

2.8 Determinações dos teores de FDN e FDA pelos métodos alternativos 1 e 2 (não sequencial e sequencial)

Nos métodos alternativos 1 e 2, o acondicionamento das amostras em saquinhos seguiu as recomendações descritas por KOMAREC (1993). A digestão das amostras em autoclave foi feita observando-se o descrito por PELL & SCHOFIELD (1993), DESCHAMPS (1999) e SENGGER et al. (2008), sendo que o tempo e a temperatura utilizados na autoclave seguiram as recomendações propostas por SENGGER et al. (2008).

Os saquinhos da ANKOM (método alternativo 1) foram adquiridos prontos para uso. Já os saquinhos de TNT utilizados no método alternativo 2, foram confeccionados manualmente, como descrito no capítulo 2, identificados e pesados em balança analítica digital.

De posse dos saquinhos preparados, procederam-se com as análises não sequenciais.

A digestão consistiu em colocar todos os sacos selados, contendo as amostras, imersos em um único béquer de plástico contendo 600 mL de solução detergente

recuperada (neutra nas análises de FDN e ácida nas análises de FDA). Ao final, descartaram-se as soluções reutilizadas.

Em cada repetição utilizou-se 19 sacos, sendo um saco para a determinação do branco e os demais para as réplicas dos seis alimentos. O béquer plástico foi, então, acondicionado no cesto de inox da autoclave vertical (Phoenix) e colocado no interior do equipamento.

No caso das determinações de FDN nas amostras de silagem de milho, adicionou-se 0,2 mL de enzima alfa-amilase termoestável por amostra (VAN SOEST et al. 1991).

Observou-se um ganho considerável em relação ao tempo requerido no desenvolvimento da análise pelo método convencional, pois foi possível analisar um maior número de amostras em um menor tempo, sem o desgaste do operador em controlar manualmente e individualmente cada aquecedor e condensador do aparelho digestor.

A etapa da lavagem também ocorreu de forma mais rápida e econômica, por ser coletiva: os saquinhos foram submetidos a três enxágues com água deionizada quente durante cinco minutos e, posteriormente, escorridos e imersos em acetona recuperada por três minutos. Procedeu-se o descarte da acetona recuperada e reutilizada. A secagem dos saquinhos foi feita em estufa de secagem e esterilização (315SE – Fanem), à 105°C, por um período mínimo de oito horas e máximo de uma noite. Em seguida, foram colocados em dessecador e após atingirem a temperatura ambiente, foram pesados em balança analítica digital. A partir destes pesos foram calculadas as concentrações de FDN e FDA nas amostras analisadas, utilizando a fórmula definida em (2).

$$\% \text{ FDN ou } \% \text{ FDA} = \frac{[\text{PE} - (\text{T} \times \text{B})]}{\text{PA}} \times 100 \quad (2)$$

onde: PA = peso de matéria seca da amostra em gramas; PE = peso, em gramas, do saquinho mais resíduo da fibra detergente após digestão e secagem; T = tara (peso

inicial) do saquinho em gramas; B = valor do branco, em gramas (peso final do saquinho após secagem/ peso inicial do saquinho).

Nas análises desenvolvidas na forma não sequencial, foi feita a etapa da calcinação: os saquinhos foram colocados em cadinhos de porcelana previamente limpos, numerados e tarados, e submetidos ao aquecimento em forno mufla (Nova Técnica), a 550°C, por três horas, para a obtenção de um resíduo sem matéria orgânica. A seguir, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados e balança analítica digital.

Na forma sequencial, as determinações relativas aos teores de FDN foram desenvolvidas similarmente ao relatado nas análises na forma não sequencial. As análises de FDA iniciaram-se com a reutilização dos saquinhos empregados em FDN. Assim, os 19 saquinhos foram acondicionados coletivamente em béquer plástico e imersos em 600 mL de solução detergente ácida recuperada, colocados em autoclave para digestão por 40 minutos, lavados com água deionizada quente e acetona recuperada, secos em estufa (MA 037 – Marconi), à 105°C por no mínimo oito horas e máximo uma noite, resfriados em dessecador e pesados para determinação das concentrações de FDA, utilizando-se a fórmula definida em (2). Não foi feita a etapa de calcinação em forno mufla. Ao final da análise, tanto a solução detergente quanto a acetona reutilizada foram descartadas.

2.9 Determinações dos teores de FDN e FDA pelo método alternativo 3 (não sequencial e sequencial)

A combinação da pesagem das amostras em cadinhos filtrantes de vidro com placa sinterizada porosa nº 02 com a digestão em autoclave é a base do método alternativo 3. O acondicionamento das amostras em cadinhos filtrantes seguiu as recomendações descritas por VAN SOEST et al. (1991), enquanto a digestão em autoclave foi realizada segundo PELL & SCHOFIELD (1993), DESCHAMPS (1999) e

SENGER et al. (2008). O tempo e a temperatura utilizados na autoclave seguiram as recomendações propostas por SENGER et al. (2008).

Nas análises não sequenciais, o procedimento prático adotado em cada repetição das análises consistiu nas seguintes etapas: pesagem dos 18 cadinhos limpos e secos, previamente aquecidos em estufa à 105°C e resfriados em dessecador, pesagem de cerca de meio grama de cada amostra, em tréplica, nos cadinhos filtrantes e acondicionamento em béqueres plásticos individuais, adição de cerca de 600 mL de solução detergente neutra recuperada (nas análises de FDN) ou solução detergente ácida recuperada (nas análises de FDA) distribuída nos 18 béqueres plásticos e, em seguida, ajuste na cesta de inox, no interior da autoclave, para digestão por 40 minutos.

A lavagem dos cadinhos em kitassato acoplado à bomba de vácuo foi feita com enxágues de água quente deionizada e acetona recuperada. As soluções detergentes e a acetona reutilizada foram descartadas em seguida.

Posteriormente, foram realizadas, de forma similar, as etapas de secagem das amostras, resfriamento e pesagem. Os teores de FDN e FDA foram calculados pela diferença entre a tara do cadinho e o peso do cadinho mais resíduo de FDN ou FDA após digestão e secagem, utilizando a fórmula definida em (1).

Ao final de cada análise de FDN ou de FDA, os cadinhos foram levados ao forno mufla por três horas, a temperatura de 550°C, para queima da matéria orgânica.

O mesmo procedimento prático nas determinações de FDN não sequenciais é o adotado nas determinações sequenciais. Na determinação dos teores de FDA, os cadinhos filtrantes oriundos da análise de FDN foram reutilizados. Assim, foram reutilizados os (18) cadinhos, em cada repetição analítica, imersos em solução detergente ácida recuperada em autoclave, para digestão das amostras por 40 minutos. A seguir, procedeu-se a filtração e lavagem das amostras com água quente deionizada e acetona recuperada, secagem, resfriamento e pesagem dos cadinhos com os resíduos, seguido dos cálculos através da fórmula definida em (1). A calcinação não faz parte das determinações sequenciais. A solução detergente ácida bem como a acetona reutilizada foram descartadas.

2.10 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x4x2 (2 utilizações, 4 metodologias e 2 formas de análises).

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + UT_i + MT_j + FM_k + (UT*MT)_{ij} + (UT*FM)_{ik} + (MT*FM)_{jk} + (UT*MT*FM)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

onde: Y_{ijkl} = teores de FDN e FDA; μ = efeito geral da média; UT_i = efeito da utilização i; MT_j = efeito do método j; FM_k = efeito da forma k; $(UT*MT)_{ij}$ = efeito da interação entre a utilização i e o método j; $(UT*FM)_{ik}$ = efeito da interação entre a utilização i e a forma k; $(MT*FM)_{jk}$ = efeito da interação entre o método j e a forma k; $(UT*MT*FM)_{ijk}$ = efeito da interação entre a utilização i, o método j e a forma k; ε_{ijkl} = erro residual.

O teste de Normalidade dos erros utilizado foi Cramer-von-miser ($\alpha = 5\%$) e o teste de homocedasticidade foi o Levene ($\alpha = 5\%$).

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo procedimento General Linear Models (GLM) do Programa Statistical Analysis System (SAS 9.1®). As médias foram comparadas pelo teste de Dunnette, tendo o método convencional como o “controle” ($\alpha = 5\%$).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Recuperação das soluções detergentes

No ambiente laboratorial foram observados grandes benefícios com a inclusão da etapa de recuperação das soluções detergentes. Tanto o ganho na minimização do tempo gasto no preparo de soluções quanto os ganhos econômico e ambiental foram sentidos em grandes proporções.

Em cada metodologia adotada, foram utilizados 15 litros das soluções detergentes no desenvolvimento de uma repetição analítica composta de 18 amostras

(seis alimentos em tréplica). Considerando que foram comparadas quatro metodologias, no desenvolvimento de análises dos teores de FDN e FDA, com a utilização de soluções detergentes originais, foram preparados 60 litros de solução de detergente neutro e 60 litros de solução de detergente ácido para o desenvolvimento destas análises (1440 análises). Estes 120 litros de soluções detergentes, utilizados nas análises e recuperados posteriormente em laboratório, foram reutilizados na execução de mais 1440 análises. Assim, não foi empreendido tempo no preparo das soluções detergentes a serem usadas na segunda etapa das análises (análises com soluções recuperadas). Sabe-se que a redução do tempo de trabalho em rotinas laboratoriais intensas minimiza os custos operacionais, pois cada minuto trabalhado também representa custo.

A economia também foi computada como vantagem no uso de soluções recuperadas, pois os 120 litros preparados para as análises com soluções originais foram recuperados para serem reutilizados nas análises posteriores, reduzindo os gastos com reagentes químicos em 50%.

As Tabelas 3 e 4 indicam os valores de mercado, em reais, dos reagentes químicos utilizados no preparo de um litro das soluções detergentes neutra e ácida, respectivamente.

Tabela 3. Valores de mercado (R\$) dos reagentes químicos utilizados em análises de FDN

Reagentes/ análises de FDN	UNID.	Quantidade/Litro de Solução	
		Quantidade	R\$
sulfato láurico de sódio,P.A	g	30,00	0,90*
EDTA	g	18,61	1,58
tetraborato de sódio hidratado	g	6,81	0,12
fosfato ácido de sódio anidro	g	4,56	0,10
2-metoxietanol,P.A	mL	10,00	0,26
custo/reagentes			2,96

*valor pesquisado em julho/2010

Observando a Tabela 3, o custo com os reagentes analíticos necessários na preparação de um litro da solução detergente neutra (solução original) foi de R\$ 2,96. Portanto, na preparação dos 60 litros utilizados na realização das 720 análises de FDN desenvolvidas foi necessário R\$ 177,60, isto porque foram recuperadas as soluções detergentes e reutilizadas nas próximas 720 análises de FDN.

Tabela 4. Valores de mercado (R\$) dos reagentes químicos utilizados em análises de FDA

Reagentes/ análises de FDA	UNID.	Quantidade/Litro de Solução	
		Quantidade	R\$
brometo-cetil-trimetilamônio	g	20,00	1,69*
ácido sulfúrico P.A	mL	28,00	0,28
custo/reagentes			1,97

* valor pesquisado em julho/2010

Quanto às 720 análises de FDA desenvolvidas em solução original, o levantamento do custo com os reagentes analíticos utilizados no preparo de um litro de solução foi R\$ 1,97. Portanto, o preparo dos 60 litros de solução de detergente ácido atingiu R\$ 118,20. Estas soluções também foram recuperadas e reutilizadas em mais 720 determinações analíticas, denominadas de análises com uso de soluções recuperadas. Vale ressaltar que os custos referentes a vidrarias, equipamentos, energia elétrica e mão-de-obra não foram computados neste trabalho.

No aspecto da conservação ambiental, a redução de 50% no descarte das soluções detergentes (neutra e ácida) *in natura* teve impacto significativo.

3.2 Recuperação da acetona

Em busca de melhorias ambientais e com a intenção de colocar em prática os valores da Química Verde, decidiu-se implementar a recuperação do solvente acetona utilizado em grande proporção nas determinações das concentrações de FDN e FDA.

Primeiramente, foi necessário um investimento na ordem de R\$ 6.000,00 na aquisição de um evaporador rotativo ou rotoevaporador (TE-210 – Tecnal).

Em seguida, a etapa da recuperação foi incluída na marcha laboratorial e desenvolvida sempre partindo de 500 mL de acetona.

Os volumes médios gastos de acetona em cada metodologia utilizada foram:

Método convencional – 520 mL

Método alternativo 1 – 250 mL

Método alternativo 2 – 260 mL

Método alternativo 3 – 510 mL

Considerando que cada metodologia foi repetida 20 vezes, os volumes médios (Vm) gastos de acetona por método e os desvios padrão podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Volumes médios (Vm) gastos de acetona e desvios-padrão/metodologia

Metodologias	volumes médios (L)/ acetona	desvios padrão
convencional	10,40	0,034
alternativo 1	5,00	0,028
alternativo 2	5,20	0,022
alternativo 3	10,20	0,031
V(m) total	30,80	

Portanto, o processo de recuperação foi repetido em torno de 62 vezes, até que todos os 30,80 litros fossem purificados. O volume médio de acetona recuperado em todo o processo atingiu 420,6 mL que corresponde a 84,12% de taxa de recuperação.

O valor de mercado atual para um litro de acetona P.A./ACS (Synth), equivale a R\$ 11,55. Como na realização deste trabalho utilizou-se 30,80 litros de acetona, ao custo de R\$ 355,74 e recuperaram-se 84,12%, a inclusão da nova etapa de recuperação permitiu um ganho de R\$ 299,25.

Quanto ao ganho ambiental é inegável que a redução de 84,12% no descarte tenha minimizado consideravelmente o impacto ambiental.

3.3 Avaliação quantitativa dos teores de FDN e FDA com uso das soluções detergentes recuperadas

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de F com respectivas probabilidades p e os coeficientes de variação (CV) obtidos na análise de variância dos teores de FDN, nos alimentos estudados.

Tabela 6. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDN nos alimentos estudados

ESTATÍSTICAS	ALIMENTOS					
	feno de Tifton	cana-de-açúcar	silagem de milho	farelo de babaçu	capim-xaraés	capim-marandu
F p/ UT ⁽¹⁾	55,74(p<0,01)	19,31(p<0,01)	47,63(p<0,01)	25,51(p<0,01)	22,17(p<0,01)	21,77(p<0,01)
F p/ MT ⁽²⁾	81,05(p<0,01)	184,14(p<0,01)	75,63 p<0,01)	24,43(p<0,01)	30,10(p<0,01)	27,30(p<0,01)
F p/ FM ⁽³⁾	2,23(p>0,10)	1,10(p>0,10)	0,21(p>0,10)	13,38(p<0,01)	14,21(p<0,01)	3,25(p=0,05)
F p/ UT * MT	25,46(p<0,01)	9,62(p<0,01)	7,75(p<0,01)	7,25(p<0,01)	25,78(p<0,01)	18,90(p<0,01)
F p/ UT * FM	0,00(p>0,10)	0,18(p>0,10)	2,50(p>0,10)	5,44(p=0,05)	1,95(p>0,10)	1,22(p>0,10)
F p/ MT*FM	1,33(p>0,10)	2,12(p=0,05)	2,41(p=0,05)	18,35(p<0,01)	1,78(p>0,10)	2,62(p=0,05)
F p/ UT* MT*FM	2,29(p>0,10)	0,45(p>0,10)	0,42(p>0,10)	0,67(p>0,10)	1,04(p>0,10)	0,50(p>0,10)
CV	2,01	2,83	7,64	5,92	2,49	2,34

(1) utilização; (2) método; (3) forma

Observa-se que houve diferença significativa ($p<0,01$) na utilização e nos métodos em todos os alimentos estudados. Em relação à forma adotada no procedimento analítico (não sequencial ou sequencial), esta diferiu significativamente ($p<0,01$) apenas no farelo de babaçu e no capim-xaraés. Houve interação significativa ($p<0,01$) entre a utilização e o método de análise (UT*MT) em todos os alimentos. Quanto às interações utilização e forma (UT*FM) e utilização, método e forma analítica (UT*MT*FM) estas não foram significativas ($p\geq 0,05$) em todos os alimentos estudados. A interação método e forma (MT*FM) foi significativa ($p>0,01$) apenas no farelo de babaçu.

O maior coeficiente de variação obtido foi na silagem de milho (7,64), sendo que todos indicam boa precisão dos dados.

As médias relativas aos teores de FDN nos seis alimentos estudados, considerando a utilização e os métodos analíticos, estão dispostas na Tabela 7.

Tabela 7. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, utilizações e métodos estudados na avaliação dos teores de FDN

ALIMENTOS	UTILIZAÇÕES	MÉTODOS				GERAL
		MTC ⁽¹⁾	MTA ₁ ⁽²⁾	MTA ₂ ⁽³⁾	MTA ₃ ⁽⁴⁾	
FENO DE TIFTON	SO ⁽⁵⁾	78,98^{b(II)}	78,84^a	79,11^a	81,81^{*b}	79,62
	SR ⁽⁶⁾	83,22^a	79,05^{*(I)a}	78,70^{*a}	84,05^a	81,19
	GERAL	81,10	78,94	78,91	82,95	
CANA-DE-AÇÚCAR	SO	53,48^b	50,23^{*a}	49,73^{*a}	53,68^b	51,78
	SR	55,98^a	50,29^{*a}	49,65^{*a}	54,55^{*a}	52,62
	GERAL	54,73	50,26	49,69	54,12	
SILAGEM MILHO	SO	44,90^b	55,10^{*b}	48,21^{*b}	48,53^{*a}	49,20
	SR	49,87^a	59,01^{*a}	53,85^{*a}	47,92^a	52,66
	GERAL	47,39	57,06	51,03	48,23	
FARELO BABAÇU	SO	67,79^b	63,88^{*b}	67,42^a	67,69^b	66,71
	SR	74,06^a	65,95^{*a}	66,87^{*a}	70,52^{*a}	69,35
	GERAL	70,95	64,91	67,14	69,31	
CAPIM- XARAÉS	SO	68,64^b	71,81^{*a}	69,98^{*a}	71,39^{*b}	70,43
	SR	72,87^a	71,96^a	68,68^{*b}	72,73^a	71,57
	GERAL	70,72	71,89	69,34	72,09	
CAPIM- MARANDU	SO	72,51^b	76,37^{*a}	74,36^{*a}	74,93^{*a}	74,70
	SR	76,18^a	76,02^a	73,77^{*a}	75,55^a	75,73
	GERAL	74,34	76,20	74,07	76,31	

(I) Médias dos métodos (MTA₁), (MTA₂) e (MTA₃) (linhas) seguidas por (*) diferem do controle pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$)

(II) Média das utilizações (SO) e (SR) (colunas) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($\alpha = 0,05$)

(1) MTC – Método Convencional

(2) MTA₁ – Método Alternativo (Autoclave/ANKOM)

(3) MTA₂ – Método Alternativo (Autoclave/TNT)

(4) MTA₃ – Método Alternativo (Autoclave/Cadinhos Filtrantes)

(5) SO – Utilização da Solução Original

(6) SR – Utilização da Solução Recuperada.

Considerando que houve interação significativa ($p < 0,01$) entre a utilização e o método (UT*MT) em todos os alimentos, observaram-se resultados diferentes quanto à precisão dos métodos alternativos quando comparados ao método convencional e quanto à utilização das soluções detergentes (SO e SR) nas análises.

Os resultados do teor de FDN obtidos no feno de Tifton utilizando solução detergente original (SO) variaram de 78,84% (MTA₁) a 81,81% (MTA₃) sendo que o MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) foi o único que diferiu ($p < 0,05$) do MTC (bloco

digestor/ cadinhos filtrantes). A realização das análises a partir da solução detergente recuperada (SR) ampliou a faixa de variação no teor de feno de Tifton de 78,70% (MTA₂) a 84,05% (MTA₃). Houveram também alterações ao se comparar os métodos alternativos com o convencional, pois o MTA₁ (autoclave/ANKOM) e o MTA₂ (autoclave/TNT) diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Observou-se, ainda que no MTC e MTA₃, que utilizam cadinhos filtrantes, as utilizações das soluções detergentes (SO e SR) diferiram ($p < 0,05$), enquanto que no MTA₁ e MTA₂, que utilizam saquinhos da ANKOM e TNT, respectivamente, as utilizações das soluções detergentes (SO e SR) não diferiram ($p > 0,05$), mas ocorreu perda da precisão analítica dos métodos em relação ao MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), não sendo indicada a análise com reutilização destas soluções.

Os dados relativos à cana-de-açúcar, quando utilizada a solução detergente original (SO) variaram entre 49,73% (MTA₂) a 53,68% (MTA₃). Os resultados obtidos a partir da solução detergente reutilizada (SR) foram mais variáveis, 49,65% (MTA₂) a 55,98% (MTC). Na primeira utilização (SO), as médias obtidas no MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT) diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) enquanto que na segunda utilização (SR), todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC. Quanto à utilização das soluções detergentes (SO e SR), observou-se diferença ($p < 0,05$) no MTC e MTA₃, que utilizam cadinhos filtrantes, enquanto que no MTA₁ e MTA₂, que utilizam saquinhos da ANKOM e TNT, respectivamente, houve perda da precisão analítica quando comparados ao MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) e as utilizações das soluções detergentes (SO e SR) não diferiram ($p > 0,05$), não se recomendando a marcha analítica com a reutilização das soluções detergentes.

Na silagem de milho, os valores médios de FDN obtidos com a utilização da solução detergente original (SO) variaram entre 44,90% (MTC) a 55,10% (MTA₁) enquanto que ao se utilizar a solução recuperada (SR) os resultados foram mais altos, variando entre 47,92% (MTA₃) a 59,01% (MTA₁). Evidenciou-se, ainda, que houve diferença significativa ($p < 0,05$) de todos os métodos alternativos testados em relação ao MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) nas análises com solução detergente

original (SO) e que o MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT) diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes) nas análises com solução detergente recuperada (SR). Considerando as utilizações das soluções detergentes (SO e SR), esta diferiu ($p < 0,05$) no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT), enquanto que no MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes) as análises desenvolvidas com solução detergente recuperada (SR) não diferiram ($p > 0,05$) das análises com solução detergente original (SO), não se evidenciando perda da precisão deste método em comparação ao método convencional (MTC). Portanto, torna-se viável o desenvolvimento das análises utilizando solução detergente recuperada pelo MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes).

No farelo de babaçu, observou-se na primeira utilização (SO), variação no teor de FDN entre 63,88% (MTA₁) a 67,79% (MTC) e que o MTA₁ (autoclave/ANKOM) diferiu ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Na segunda utilização (SR) a variação observada também foi maior, ficando entre 65,95% (MTA₁) a 74,06% (MTC) e todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). As utilizações das soluções detergentes (SO e SR) diferiram ($p < 0,05$) no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes). Já o MTA₂ (autoclave/TNT), apesar de diferir ($p < 0,05$) quanto à precisão em relação ao MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), não demonstrou diferença ($p > 0,05$) quanto à reutilização de soluções detergentes (SO e SR). Devido à perda da precisão não é indicado reutilizar soluções detergentes como reagente analítico.

As análises realizadas no capim-xaraés obtidas com solução detergente original (SO) apresentaram médias variando entre 68,64% (MTC) a 71,81% (MTA₁) e todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Com a reutilização da solução detergente (SR), as médias variaram entre 68,68% (MTA₂) a 72,87% (MTC) e o MTA₂ (autoclave/TNT) diferiu ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). As utilizações das soluções detergentes (SO e SR) diferiram ($p < 0,05$) no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), MTA₂ (autoclave/TNT) e MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes). Assim, as análises com soluções recuperadas

podem ser desenvolvidas pelo MTA₁ (autoclave/saquinho ANKOM), por não se observar perda na precisão analítica deste método.

O capim-marandu apresentou variação das médias, na primeira utilização (SO) da solução detergente entre 72,51% (MTC) a 76,37% (MTA₁). Esta variação sofreu aumento ao se reutilizar a solução detergente (SR), oscilando entre 73,77% (MTA₂) a 76,18% (MTC). Na primeira utilização (SO) todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Na segunda utilização (SR) apenas o MTA₂ (autoclave/ TNT) diferiu do ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Quanto às utilizações das soluções detergentes (SO e SR) observou-se diferença ($p < 0,05$) apenas no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Em todos os métodos alternativos não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre as utilizações das soluções detergentes (SO e SR), mas apenas nos métodos MTA₁ (autoclave/ ANKOM) e MTA₃ (autoclave/ cadinhos filtrantes) não houve perda na precisão analítica em comparação ao método convencional (MTC). Assim, as análises com solução detergente recuperada podem ser desenvolvidas pelo MTA₁ (autoclave/saquinhos ANKOM) e MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes).

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de F com respectivas probabilidades p e dos coeficientes de variação (CV) obtidos na análise de variância dos teores de FDA, nos alimentos estudados.

Tabela 8. Valores de F com respectivas probabilidades p e CV obtidos na análise de variância dos teores de FDA nos alimentos estudados

ESTATÍSTICAS	ALIMENTOS					
	feno de Tifton	cana-de-açúcar	silagem de milho	farelo de babaçu	capim-xaraés	capim-marandu
F p/ UT ⁽¹⁾	87,52(p<0,01)	47,44(p<0,01)	42,04(p<0,01)	48,41(p<0,01)	72,00(p<0,01)	60,23(p<0,01)
F p/ MT ⁽²⁾	130,02(p<0,01)	52,53(p<0,01)	74,35(p<0,01)	58,59(p<0,01)	87,84(p<0,01)	77,11(p<0,01)
F p/ FM ⁽³⁾	5,17(p= 0,05)	0,16 (p>0,10)	0,98(p>0,10)	2,03(p>0,10)	8,82 (p<0,01)	4,48 (p =0,05)
F p/ UT * MT	71,01(p<0,01)	31,72(p<0,01)	32,99(p<0,01)	16,61(p<0,01)	43,31(p<0,01)	32,29(p<0,01)
F p/ UT * FM	2,94(p=0,05)	1,23(p>0,10)	0,06 (p>0,10)	2,23(p>0,10)	0,04(p>0,10)	0,01(p>0,10)
F p/ MT*FM	29,25(p<0,01)	9,47(p<0,01)	13,12(p<0,01)	11,54(p<0,01)	7,57(p<0,01)	5,93(p<0,01)
F p/ UT* MT*FM	10,24(p<0,01)	1,75(p>0,10)	5,53(p<0,01)	0,82(p>0,10)	0,42(p>0,10)	0,06(p>0,10)
CV	8,65	9,23	8,56	11,75	10,21	11,42

(1) utilização; (2) método; (3) forma

Nas determinações dos teores de FDA, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,01$) nos dois tipos de utilização da solução detergente e também nos quatro métodos utilizados ($p < 0,01$) nas determinações analíticas em todos os alimentos estudados.

Quanto à forma adotada na análise (não sequencial ou sequencial), não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) em todos os alimentos com exceção do capim-xaraés ($p < 0,01$).

Quanto às interações, as diferenças foram significativas ($p < 0,01$) para utilização e método (UT*MT) e para método e forma (MT*FM), em todos os alimentos. Não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) na interação entre utilização e forma (UT*FM) em todos os alimentos.

A interação entre utilização, método e forma (UT*MT*FM) foi significativa ($p < 0,01$) nas amostras de feno de Tifton e silagem de milho.

O menor coeficiente de variação obtido foi na silagem de milho (8,56) e o maior no farelo de babaçu (11,75), indicando que as análises foram desenvolvidas com boa precisão.

Apresentam-se na Tabela 9 as médias relativas aos teores de FDA em todos os alimentos estudados, considerando a utilização do reagente e o método de análise.

Na amostra de feno de Tifton, a variação no teor de FDA obtida em análises com uso da solução detergente original (SO) situou-se entre 40,05% (MTC) a 64,29% (MTA₂). Quando reutilizada a solução (SR) a variação diminuiu ficando entre 42,35% (MTA₁) a 46,36% (MTA₂). Observou-se ainda que na utilização da solução detergente original (SO) todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Já na utilização da solução detergente recuperada (SR) o MTA₂ (autoclave/TNT) e MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). No MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT) observaram-se diferenças ($p > 0,05$) entre as utilizações das soluções detergentes (SO e SR). Já no MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) observou-se perda da precisão analítica em relação ao método convencional

(MTC) e que as utilizações das soluções detergentes não diferiram ($p>0,05$). Assim, não se recomenda análises com solução detergente recuperada.

Tabela 9. Médias obtidas na análise de variância nos alimentos, utilizações e métodos estudados na avaliação dos teores de FDA

ALIMENTOS	UTILIZAÇÕES	MÉTODOS				GERAL
		MTC ⁽¹⁾	MTA ₁ ⁽²⁾	MTA ₂ ⁽³⁾	MTA ₃ ⁽⁴⁾	
FENO DE TIFTON	SO ⁽⁵⁾	40,05^{b(II)}	45,61^{*a}	64,29^{*a}	45,77^{*a}	48,12
	SR ⁽⁶⁾	42,69^a	42,35^b	46,36^{*b}	44,79^{*a}	44,05
	GERAL	41,37	43,98	54,33	45,28	
CANA-DE-AÇÚCAR	SO	31,03^b	33,81^{*a}	42,90^{*a}	34,44^{*a}	35,54
	SR	33,11^a	30,94^{*b}	33,98^b	32,93^a	32,74
	GERAL	32,07	32,37	38,44	33,69	
SILAGEM MILHO	SO	26,10^b	30,28^{*a}	37,76^{*a}	30,81^{*a}	31,11
	SR	28,30^a	28,03^b	30,52^{*b}	29,38^b	29,06
	GERAL	27,20	29,15	34,05	30,07	
FARELO BABAÇU	SO	40,30^a	42,33^a	56,84^{*a}	44,77^{*a}	46,06
	SR	40,35^a	37,24^{*b}	44,78^{*b}	43,38^{*a}	41,44
	GERAL	40,32	39,78	50,81	44,07	
CAPIM-XARAÉS	SO	36,93^a	44,06^{*a}	57,65^{*a}	41,26^{*a}	44,97
	SR	38,24^a	40,22^{*b}	42,26^{*b}	40,13^{*a}	40,21
	GERAL	37,58	42,13	49,95	40,70	
CAPIM-MARANDU	SO	39,06^a	46,42^{*a}	60,97^{*a}	43,24^{*a}	47,42
	SR	39,40^a	42,91^{*b}	44,81^{*b}	42,03^{*a}	42,29
	GERAL	39,23	44,67	52,89	42,64	

(I) Médias dos métodos (MTA₁), (MTA₂) e (MTA₃) (linhas) seguidas por (*) diferem do controle pelo teste de Dunnette ($\alpha = 0,05$)

(II) Média das utilizações (SO) e (SR) (colunas) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($\alpha = 0,05$)

(1) MTC – Método Convencional

(2) MTA₁ – Método Alternativo (Autoclave/ANKOM)

(3) MTA₂ – Método Alternativo (Autoclave/TNT)

(4) MTA₃ – Método Alternativo (Autoclave/Cadinhos Filtrantes)

(5) SO – Utilização da Solução Original

(6) SR – Utilização da Solução Recuperada.

Nas determinações analíticas em cana-de-açúcar observaram-se variações diferentes no teor de FDA quanto às utilizações das soluções detergentes. Na utilização da solução detergente original (SO) obtiveram-se resultados de 31,03% (MTC) a 42,90% (MTA₂), enquanto que na utilização da solução detergente recuperada (SR) os teores ficaram entre 30,94% (MTA₁) a 33,98% (MTA₂). Na primeira utilização (SO), todos os métodos alternativos diferiram ($p<0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Comportamento diferente foi observado após a reutilização da solução detergente (SR), pois apenas o MTA₁ (autoclave/ANKOM) diferiu ($p<0,05$) do MTC

(bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Houve diferença ($p < 0,05$) entre as utilizações das soluções detergentes (SO e SR) no MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes), MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT). Portanto, as análises com reutilização de soluções detergentes são viáveis pelo MTA₃ (autoclave/cadinho filtrante) por não ter havido perda na precisão analítica.

Na silagem de milho as variações observadas nas médias dos teores de FDA foram: primeira utilização (SO) - 26,10% (MTC) a 37,76% (MTA₂) e segunda utilização (SR) - 28,03% (MTA₁) a 30,52% (MTA₂). Nas análises com solução detergente original (SO) todos os métodos alternativos foram diferentes ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Ao se reutilizar a solução detergente (SR), apenas o MTA₂ (autoclave/TNT) diferiu ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Em todos os métodos observou-se diferença ($p < 0,05$) entre as utilizações das soluções detergentes (SO e SR), não sendo recomendada a reutilização das mesmas por nenhum método estudado, neste alimento.

Os resultados obtidos na amostra de farelo de babaçu, em análises que utilizaram solução detergente original (SO) variaram no intervalo de 40,30% (MTC) a 56,84% (MTA₂). Nas análises com solução detergente reutilizada (SR) o intervalo de variação foi de 37,24% (MTA₁) a 44,78% (MTA₂). Na primeira utilização (SO), observou-se que o MTA₂ (autoclave/TNT) e MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). Na segunda utilização (SR), todos os métodos alternativos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao MTC (bloco digestor/ cadinhos filtrantes). As análises utilizando solução original (SO) diferiram das análises com solução recuperada (SR) no MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT), enquanto que no MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) houve perda na precisão analítica e não se observou diferença ($p > 0,05$) entre as utilizações das soluções detergentes (SO e SR), não sendo recomendada análise com reutilização destas soluções.

O comportamento observado nas análises do capim-xaraés também indicou diferença nos resultados quanto às utilizações da solução detergente. Assim, na primeira utilização (SO) obtiveram-se médias compreendidas no intervalo de 36,93%

(MTC) a 57,65% (MTA₂) e na segunda utilização (SR) a variação ficou entre 38,24% (MTC) a 42,26% (MTA₂).

Os teores de FDA obtidos nas análises do capim-marandu com solução detergente original (SO) situaram-se no intervalo de 39,06% (MTC) a 60,97% (MTA₂) e com a reutilização da solução detergente (SR), em 39,40% (MTC) a 44,81% (MTA₂).

Nos capins xaraés e marandu foi observado o mesmo comportamento nos métodos, pois todos os métodos alternativos diferiram ($p < 0,05$) do MTC (bloco digestor/cadinhos filtrantes) nas duas utilizações das soluções detergentes (SO e SR). Comportamento idêntico também foi observado no MTA₁ (autoclave/ANKOM) e MTA₂ (autoclave/TNT), onde as duas utilizações das soluções detergentes (SO e SR) diferiram ($p < 0,05$). No MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) observou-se perda na precisão analítica e não se observou diferença ($p > 0,05$) entre as utilizações das soluções detergentes (SO e SR). Portanto, não se recomenda análise com reutilização destas soluções.

Em todas as determinações de teores de FDA nos seis alimentos estudados foram observadas as maiores médias, sempre obtidas pelo MTA₂ (autoclave/TNT), o que possivelmente está relacionado à porosidade não uniforme do tecido TNT (CASALI et al. 2009).

Apenas um trabalho foi encontrado na literatura compondo o relatório do Encontro nacional sobre metodologias de laboratórios - MET relativo à reutilização de soluções detergentes em análises de teores de FDN e FDA. Realizado pelo grupo de análise instrumental aplicada, Pecuária Sudeste, do Instituto de Química de São Carlos (USP), os autores SOUZA et al. (2006) estudaram a possibilidade de reutilização (três vezes) das soluções detergentes empregadas nos ensaios de FDN e FDA utilizando um analisador de fibras 220 (ANKOM Technology, EUA) e saquinhos de TNT. As amostras utilizadas foram de forrageiras e alimentos concentrados sem especificação das mesmas. O trabalho não disponibiliza uma tabela com os resultados obtidos, apenas cita que não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados encontrados nas três extrações e também entre os teores obtidos na primeira e demais

extrações. Também não há informação quanto à aplicação de algum procedimento nas soluções detergentes antes de serem reutilizadas.

Assim, não há relatos de teores de FDN e FDA obtidos em análises desenvolvidas com reutilização de soluções detergentes.

Os resultados obtidos neste trabalho quanto à possibilidade de reutilizar soluções detergentes (neutra e ácida) em análises dos teores de FDN e FDA, por alguns métodos analíticos estudados e em alguns alimentos, indicaram a perda da precisão analítica. Este comportamento pode estar relacionado à saturação das soluções detergentes, considerando que para cada conjunto de condições (temperatura, pressão) existe uma quantidade limite de uma dada substância que consegue se dissolver num determinado volume de solvente, fenômeno denominado solubilidade.

A ação das soluções detergentes (neutra e ácida) consiste em solubilizar espontaneamente um conjunto de macromoléculas contidas em um soluto (alimento a ser analisado) utilizando uma solução contendo um tensoativo (detergente). O mecanismo resultante envolve a adsorção destas moléculas do soluto (já solubilizadas) em estruturas denominadas micelas, formadas no processo da digestão da amostra onde ocorre a ação gradativa e continuada do tensoativo no sistema.

A solução de detergente neutro solubiliza o conteúdo celular e pectina enquanto a solução de detergente ácido solubiliza o conteúdo celular e também a fração hemicelulose. Todos estes componentes solúveis em soluções detergentes formam um conjunto de macromoléculas diversas e diferenciadas quanto ao tamanho, massa, forma, densidade e reatividade. Assim, após a digestão das amostras, as soluções detergentes possuem um conjunto de macromoléculas dissolvidas e diversificadas em seu interior.

Observou-se que em algumas análises, ao se reutilizar estas soluções detergentes na mesma marcha analítica visando a solubilização das mesmas macromoléculas anteriormente já solubilizadas (provenientes da digestão anterior), possivelmente houve a perda da ação de solubilização da solução detergente por esta ter atingido o ponto de saturação para as macromoléculas em questão.

A saturação é uma propriedade das soluções que indica a capacidade das mesmas em suportar quantidades crescentes de solutos, mantendo-se homogêneas. Uma solução está em seu ponto de saturação quando o seu poder de dissolução para um determinado soluto atinge o máximo, não sendo possível mais dissolvê-lo, a uma determinada temperatura (JEFFREY et al. 2002).

A exatidão e a precisão analítica são critérios considerados prioritários no desenvolvimento de análise química, pois se referem à veracidade e reprodutibilidade das medidas, respectivamente. Neste sentido, ganhos econômicos, ambientais e no tempo requerido no desenvolvimento da análise são importantes, mas secundários, que nem sempre podem ser conseguidos em uma determinação analítica.

4. CONCLUSÕES

Considerando as determinações dos teores de FDN e FDA, pelos métodos analíticos convencional e alternativos, nas formas não sequencial e sequencial, conclui-se que:

A recuperação e posterior reutilização das soluções detergentes nas análises dos teores de FDN e FDA, com uso da autoclave, promove a redução no custo e no tempo necessário para o desenvolvimento das análises, permitindo, em especial, a redução no descarte de resíduos químicos no meio ambiente.

A inclusão da etapa de recuperação do solvente acetona na marcha analítica promove ganhos tanto econômico como ambiental.

A reutilização das soluções detergentes (neutra ou ácida) constitui-se uma alternativa viável, mas não uniforme, devendo-se considerar a combinação do método analítico com o alimento a ser analisado para preservar a precisão das análises.

As determinações dos teores de FDN com utilização de soluções detergentes recuperadas sem a perda da precisão analítica podem ser desenvolvidas pelo MTA₁ (autoclave/ANKOM) nos capins xaraés e marandu enquanto o MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) pode ser utilizado em análises de silagem de milho e capim-marandu.

Nas análises dos teores de FDA com utilização de soluções detergentes recuperadas sem a perda da precisão analítica, recomenda-se apenas o uso do MTA₃ (autoclave/cadinhos filtrantes) na cana-de-açúcar.

CAPÍTULO 4. IMPLICAÇÕES

Enfrentar os problemas ambientais atuais é algo que depende diretamente da inovação tecnológica e neste novo contexto as universidades e instituições de pesquisa ocupam um espaço importante na busca de novas tecnologias pró-meio ambiente. As metodologias alternativas de análises químicas com a eficiência similar ou superior à das metodologias já existentes, sendo economicamente viáveis, para que possam ser adotadas em larga escala, associadas à redução do descarte de resíduos químicos constitui-se um campo abrangente de pesquisa que ajudará o país a construir um modelo industrial sustentável a médio e longo prazo, o que é desejado mundialmente.

Poucas são as pesquisas desenvolvidas na área de nutrição animal com foco ambiental. Neste sentido, o trabalho desenvolvido além de integrar as áreas de nutrição animal e química visou a validação da precisão de metodologias sustentáveis em consonância com os ideais da cidadania contemporânea, considerando como padrão de referência o método convencional de análise dos teores de FDN e FDA.

As metodologias alternativas que utilizam saquinhos da ANKOM, de TNT e cadinhos filtrantes de vidro em acondicionamento das amostras e digestão em autoclave mostraram-se sistemas efetivos na determinação de teores de FDN e FDA sem perda da precisão analítica, em alguns alimentos estudados, resultado que corrobora com as conclusões observadas por Van Soest. É importante a continuação de pesquisas quanto às interações entre os alimentos e os métodos alternativos de análises considerando que ficou comprovado que a redução nos custos e no tempo das análises, bem como a minimização do descarte de resíduos químicos são fatores inerentes a todos estes métodos.

O resultado obtido na comparação das formas de análises (não sequencial e sequencial) revelou que a forma sequencial poderá ser adotada nos laboratórios, nas determinações de FDN e FDA, considerando todos os métodos e alimentos estudados, com exceção da determinação de FDA na silagem de milho, pelos métodos alternativos que utilizam saquinhos (ANKOM e TNT). Este resultado possivelmente está associado

à estrutura do tecido do saquinho (porosidade), indicando a necessidade de mais pesquisas sobre a porosidade dos tecidos utilizados na confecção dos saquinhos.

A proposta de incluir a etapa da recuperação da acetona na marcha analítica por qualquer método de análise reduziu o descarte de rejeitos, minimizou os custos financeiros e o impacto ambiental, sinalizando o compromisso da ciência com a sociedade em busca da melhoria da qualidade de vida.

A reutilização das soluções detergentes (neutra e ácida) em análises de FDN e FDA revelaram uma alternativa viável, mas ainda sem uniformidade quanto à metodologia e alimento analisado. A proposta de pesquisa continuada quanto à recuperação uniforme destas soluções sem a perda da precisão analítica é um desafio às instituições de pesquisa que focam o mundo real e o domínio de bases tecnológicas que não agredam o meio ambiente.

Portanto, a possibilidade de se recuperar as soluções detergentes de maneira uniforme, com entendimento quanto à combinação metodologia/alimento e sobre o comportamento de solubilização de macromoléculas pelas soluções detergentes, constitui-se um novo campo de investigação.

Sugere-se a observação do uso da técnica da centrifugação diferenciada em trabalhos futuros quanto a sua ação em recuperar as soluções detergentes, considerando que esta técnica promove a separação do material celular solúvel do material insolúvel por diferença de massa e densidade. A ultra-centrifugação, por ser usada na sedimentação de macromoléculas não uniformes, sob determinadas condições, poderá também ser avaliada futuramente como uma técnica de obtenção uniforme de soluções detergentes recuperadas. Vale ressaltar a necessidade de se avaliar o custo-benefício, considerando que estes procedimentos são caros e demorados.

A continuação das pesquisas em nutrição animal com enfoque no gerenciamento 3R (reduzir, reutilizar e reciclar) pode afetar consideravelmente a qualidade de vida e do ambiente das gerações futuras.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C. da; GODOI, A. R. de; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. esp., p. 260-268, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S1516-35982008001300030.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 11 maio 2010.

ALBUQUERQUE, N. I. de. **Emprego do Babaçu (*Obignya phalerata*) como fonte energética para catetos (*Tayassu tajacu*)**. 2006. 79 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

AMARAL, S. T.; MACHADO, P. F.; PERALBA, M. C. R.; CÂMARA, M. R.; SANTOS, T.; BERLEZE, A. L.; FALCÃO, H. L.; MARTINELLI, M.; GONÇALVES, R. S.; OLIVEIRA, E. R.; BRASIL, J. L.; ARAÚJO, M. A.; BORGES, A. C. Relato de uma experiência: recuperação e cadastramento de resíduos dos laboratórios de graduação do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 419-423, 2001.

ANKOM. **Frequently asked questions**. 2000. Disponível em: <<http://www.ankom.com/faqs.html>>. Acesso em: 08 maio 2010.

ARAUJO, D. L. C. **Avaliação dos capins tifton (*Cynodon spp*), Tanzânia (*Panicum maximum*) e marandu (*Braquiária brizanta*) e terminação de ovinos em pastagens cultivadas com uso de suplementação**. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official methods of analysis**. 12th ed. Washington, 1975.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official methods of analysis**. 13th ed. Washington, 1980.

BAILEY R. W.; ULYATT, M. J. Pasture quality and ruminant nutrition: II – Carbohydrate and lignin composition of detergent extracted residues from pasture grasses and legumes. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, Wellington, v. 13, n. 3, p. 591, 1970.

BENDASSOLLI, J. A.; MÁXIMO, F.; TAVARES, G. A.; IGNOTO, R. F. Gerenciamento de resíduos químicos e águas servidas no laboratório de isótopos estáveis do CENA/USP. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2005.

BENEDETT, E.; SPERS, E. Digestibilidade aparente do farelo de babaçu (*Orbignya* sp) com bezerros de um ano de idade. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 19-28, 1995.

BERCHIELLI, T. T.; SADER, A. P. O.; TONANI, F. L.; PAZIANI, S. F.; ANDRADE, P. de. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKOM. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1572-1578, 2001.

BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; MOREIRA, I. **Detergentes naturais e sintéticos**: um guia técnico. Londrina: Editora da UEL, 1999. 184 p.

BORTOLASSI, J. R.; SANTOS, G. T. dos; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; ZAMBOM, M. A.; FURLAN, A. C. Comparação dos métodos convencional e Filter Bag Technique da Ankom (FBT) para determinação de fibra em detergente neutro e fibra em

detergente ácido. **Acta Scientiarum: animal science**, Maringá, v. 22, n. 3, p. 807-811, 2000.

BRANCINI, M. R.; BRAMANE, C. M.; BERBERT, A. Poder de limpeza de algumas soluções irrigadoras analisadas pela microscopia de varredura. **Revista Paulista de Endodontia**, São Paulo, v. 4, n. 1/14, 116-123, 1983.

CANN, M. C.; CONNELLY, M. E. **Real world cases in green chemistry**. Washington: American Chemical Society, 2000. v. 2.

CARVALHO, M. P. *Citrus*. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS 6.; 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 171-241.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; CUNHA, M. da; DETMANN, K. S. C.; PAULINO, M. F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em saco de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 130-138, 2009.

CASTRO, N. de (Coord.). **A questão ambiental: o que todo empresário precisa saber**. Brasília: SEBRAE, 1996. 71 p.

CAVALCANTE, R. R.; FIGUEIRÊDO, A. V.; CARVALHO, M. A. M.; LOPES, J. B.; ALMEIDA, M. M. Digestibilidade aparente de nutrientes de rações balanceadas com alimentos alternativos para cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) em crescimento. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 3, p.163-171, 2005.

CENTRAL DA PECUÁRIA. **Híbridos de milho para silagem**: as diferenças que fazem a diferença. Disponível em: <<http://www.centraldapecuaria.com.br/>>. Acesso em: 13 set. 2010.

CICHOSKI, E.; SANTOS, G. T.; SILVA, D. C.; CECATO, U.; SANTOS, W. B. R.; MARTINS, E. N.; GASPARINO, E. Diferentes tipos de sacos para análise da digestibilidade *in vitro* de forrageiras. **Archivos Zootecnia**, Córdoba, v. 58, n. 224, p. 749-752, 2009.

COLLINS, T. Essays on science and society: toward sustainable. **Science**, Washington, v. 291, n. 5501, p. 48-49, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1126/science.291.5501.48.

COLLINS, T. J. Introducing green chemistry in teaching and research. **Journal of Chemical Education**, Madison, 72, n. 11, p. 965, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1021/ed072p965.

CORDEIRO, C. F. A.; PEREIRA, M. L. A.; MENDONÇA, ALMEIDA, P. J. P.; AGUIAR, L. V.; FIGUEIREDO, M. P. de. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes e produção e composição do leite de vacas alimentadas com teores crescentes de proteína bruta na dieta contendo cana-de-açúcar e concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 2118-2126, 2007. Suplemento.

CRUZ FILHO, A. M. **Ação do EDTAC sobre a microdureza da dentina radicular, após diferentes tempos de aplicação**. 1994, 86 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1994..

DESCHAMPS, F. C. Implicações do Período de Crescimento na Composição Química e Digestão dos Tecidos de Cultivares de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n.6, p. 1358-1369, 1999. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Babaçu - Programa Nacional de Pesquisa**. Brasília: EMBRAPA, 1991. Disponível em:< http://www.cpafro.embrapa.br/embrapa/Artigos/frut_amaz.htm>. Acesso em: 20 set. 2010.

EUCLIDES, V. P. B. Novidades em forrageiras para pecuária em regiões Tropicais. In: SEMINÁRIO DE PASTURAS Y SUPLEMENTACION ESTRATÉGICA EM GANADO BOVINO IICA. 2002, Asunción. Universidad Nacional de Asuncion - Facultad de Ciências Veterinárias, 2002. p. 12.

FELLEMBERG, G. **Problemas da poluição ambiental**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. p. 70-104

FERREIRA, W. M. Os componentes da parede celular na nutrição de não-ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE NÃO RUMINANTES, 1994, Maringá. **Anais...** Maringá: SBZ, 1994. p. 85-113.

FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010.p. 30-78

FOX, D. G., SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D.; RUSSELL, J. B.; VAN SOEST, P. J. 1990. **The Cornell net carbohydrate and protein system for evaluating diets. Part I- A model for predicting cattle requirements and feedstuff utilization**. search agriculture. New York: Cornell University, 1990. 128 p. (Agricultural Experimental Station, 334).

GERBASE, A. E.; GREGÓRIO, J. R.; CALVETE, T. Gerenciamento dos resíduos da disciplina química inorgânica ii do curso de química da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 397-403, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S0100-40422006000200036

GEREDES, L.; WERNER, J. C.; COLOZZA, M. T.; POSSENTI, R. A.; SCHAMMAS, E. A. Avaliação de características de valor nutritivo das gramíneas forrageiras marandu, setária e tanzânia nas estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 955-963, 2000.

GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. dos; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C.; CECATO, U.; BRANCO, A. F. Determinação do consumo, digestibilidade e frações protéicas e de carboidratos do feno de tifton 85 em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 804-813, 2003.

HILL, G. M.; GATES, R. N.; WEST, J. W.; BURTON, G. W. Tifton 85 bermuda grass utilization in beef, dairy, and hay production. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DO GÊNERO *CYNODON*; 1996, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1996. p.140-150.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 2. ed. Brasília, 2000. 75 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: documento de caráter orientativo**. Brasília, 2007. (DOQ-CGCRE-008 – revisão 02 de junho/2007).

JARDIM, W. F. Gerenciamento de resíduos químicos em laboratórios de ensino e pesquisa. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 671-673, 1998.

JEFFREY, G. H.; BASSET, J.; MEDHAN, R. C; DENNEY, R. C.; VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 6. ed. São Paulo: LTC, 2002. p. 2.

JERACI, J. L.; HERNANDEZ, T.; ROBERTSON, J. B. New and improved procedure for neutral-detergent fiber. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 66, n. 1, p. 351, 1988.

KELLEY, C. L. **Operator's manual**: Ankom technology. New York, 1998.

KOMAREK, A. R. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. **Journal Dairy Science**, v. 76 , suppl. 1, p. 250, 1993.

KOMAREK, A. R.; ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. Comparison of the methods for determining ADF using the filter bag technique versus conventional filtration. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 77, suppl. 1, p. 1, 1993.

KOMAREK, A. R.; ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. Comparison of the filter bag technique to conventional filtration in the Van Soest NDF analysis of 21 feeds. In: NATIONAL CONFERENCE ON FORAGE QUALITY. EVALUATION AND UTILIZATION, 1994, Nebraska. **Proceedings...** p. 2.

KRAEMER, T. H. **Modelo Econômico de Controle e Avaliação de Impactos Ambientais – MECAIA**. 2002. 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia da Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MACEDO, J. A. B. **Águas & águas**. São Paulo: Varela, 2001. 1000 p.

MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de brachiaria brizantha cultivar Marandu. In: BARBOSA, R. A. (Ed.) Morte de pastos de braquiárias, Campo Grande. MS: Embrapa Gado de Corte, 2006. p. 35-65.

MACEDO, N. **Variedades de cana-se-açúcar**. ComCiência: revista eletrônica de jornalismo científico. 2008. Disponível em: <
<http://www.comciencia.br/comciencia/?section=23hjd=258>>. Acesso em: 02 maio 2010.

MELLO, A. O. A. Alternativas de alimentação para engorda intensiva. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 29, p. 13-22, 1999.

MERTENS, D. R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ, 1992. p. 188-219.

MERTENS, D. R.; BRODERICK, G. A.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for improving utilization of N in alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, suppl. 1, p. 240, 1994. Abstract.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 1463, 1997.

MERTENS, D. R. **Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA-FAEPE, 2001. p. 25-36.

MOREIRA FILHO, M. A. Composição bromatológica de seis espécies nativas do estado do Piauí consumidas por caprinos. **Pubvet**, v. 2, n. 34, ed. 45, art. 219, 2008.

MOZETO, A. A., ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006. p. 295-320.

OLIVEIRA, A. P.; MELO, G. M. P.; BERNARDES, T. F. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2005. p. 187-238.

PATE, F. M.; ALVAREZ, J.; PHILLIPS, J. D.; EILAND, B.R. **Sugarcane as a cattle feed: production and utilization**. Florida: University of Florida/Cooperative Extension Service, 2001. 25 p.

PÉCORA, J. D.; MURGEL, A. F.; SAVIOLI, R. N.; COSTA, W.F.; VANSAN, L.P. Studied by titrimetry the loss of chloride content in Dakin solution. **Revista Odontológica**, USP, v.1, n.1, p. 3-7, 1987.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, 1993.

PEREIRA, R. C; RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, O. G.; RIGUEIRA, J. P. S.; SILVA, J. L.; SANTOS, J. M. Composição químico-bromatológica em cultivares de *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SAVANAS TROPICAIS, 2008, Brasília. **Anais...**

PERGHER, S. B. C. Programa de Gerenciamento de Resíduos dos laboratórios de graduação da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Erechim. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 674-677, 2004.

RAINHO, J. M. Planeta água. **Revista Educação**, São Paulo, v. 26, n. 221, p. 48-64, 1999.

ROBERTSON J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: Marcel Dekker. 1981. p. 123-158.

ROCHA JÚNIOR, V. R.; VALADARES FILHO, S. C.; BORGES, A. M.; MAGALHÃES, K. A.; FERREIRA, C. C. B.; VALADARES, R. F. D.; PAULINO, M. F. Determinação do valor energético de alimentos para ruminantes pelo sistema de equações. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 473-479, 2003.

RODRIGUES, D. C. **Produção de forragem de cultivares de *Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich) Stapf e modelagem de respostas produtivas em função de**

variáveis climáticas. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

RODRIGUES, A. A.; PRIMAVESI, O.; ESTEVES, S. N. Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 12, p. 1333-1338, 1997.

RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D.; REIS, R. A.; SOARES FILHO, C. V. Produção de massa seca e composição química de cinco cultivares de *Cynodon*. Acta Scientiarum: **Animal Science**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 251-258, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.4025/actascianimsci.v28i3.38.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, R. V.; EVANGELISTA, A. R.; PINTO, J. C.; COUTO FILHO, C. C. C.; SOUZA, R. M. de. Composição química da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e das silagens com diferentes aditivos em duas idades de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1184-1189, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S1413-70542006000600022.

SANTOS, L. C.; BONOMO, P.; SILVA, C. C. F.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; PATÊS, N. M. S. Produção e composição química da *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens* submetidas a diferentes adubações. **Ciência Animal Brasileira**, Joãoia, v. 9, n. 4, p. 856-866, 2008.

SENGER, C. C. D.; KOZLOSKI, G. V.; SNACHEZ, L. M. B.; MESQUITA, F. R.; ALVES, T. P.; CASTAGNINO, D. S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146,

p. 169-174, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.12.008.

SILVA, D. J.; QUEIRÓZ, A. C. **Análise de alimentos:** métodos químicos e biológicos. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235 p.

SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; SUMI, L. M.; BATISTA, L. A. R. **Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. 21 p. (Boletim de Pesquisa, 4).

SOUZA, G. B.; DEL SANTO, V. R.; CARRILHO, E. N. V. M.; NOGUEIRA, A. R. A. Reutilização de solução extratora na determinação de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. In: MET ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIAS DE LABORATÓRIO, 11., 2006, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. p. 37.

TAVARES, G. A.; BENDASSOLLI, J. A. Implantação de um programa de gerenciamento de resíduos químicos e águas servidas nos laboratórios de Ensino e Pesquisa no CENA/USP. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 732-738, 2005.

TEIXEIRA, J. C. **Alimentação de bovinos leiteiros.** Lavras: FAEPE, 1997. 267 p.

TEIXEIRA, A. S. **Alimentos e alimentação dos animais.** Lavras: FAEPE, 1998. 402 p.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. Quantitative analysis of cell wall components. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D.R., HATFIELD, J. R. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility.** Madison: American Society of Agronomy, 1993. p. 83-104.

VALADARES FILHO, S. C.; ROCHA JR., V. R.; CAPPELLE, E. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/DZO, 2002. 279 p.

VALADARES FILHO, S. C.; MACHADO, P. A. S.; CHIZZOTTI, M. L.; AMARTAL, H. F.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CAPELLE, E. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 502 p.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; PEREIRA, J. M.; VALÉRIO, J. R.; PAGLIARINI, M. S.; MACEDO, M. C. M.; LEITE, G. G.; LOURENÇO, A. J.; FERNANDES, C. D.; DIAS FILHO, M. B.; LEMPP, B.; POTT, A.; SOUZA, M. A. **O capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) na diversificação das pastagens de braquiária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. 36 p. (Documentos, 149).

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II - a rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, New York, v. 46, p. 829-835, 1963.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 26, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, New York, v. 50, p. 50-55, 1967. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, New York, v. 50, p. 50-55, 1967.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. **Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate**. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, New York, v. 51, p. 780, 1968.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Analysis of forages and fibrous foods. AS 613 Manual, Dep. **Animal Science**, Cornell Univ., Ithaca, NY, 1985.

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

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Comstock Publishing Association, 1994. 476 p.

VIEIRA, M. M. M.; CAVALCANTE, M. A. B.; NEIVA, J. N. M. Valor nutritivo de silagens de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) contendo diferentes níveis de farelo de babaçu (*Orbignya* sp). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBZ, 2005. 1 CD-ROM.

VITTORI, A.; SILVA, J. F. C.; VASQUEZ, H. M.; MORENZ, M. J. F.; AROEIRA, L. J. M.; GAMA, R. V. F. Frações de carboidratos de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. p. 569-571.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

WINTER, R. **A consumer's dictionary of cosmetics ingredients**. New York: Three Rivers Press, 1994. 576 p.