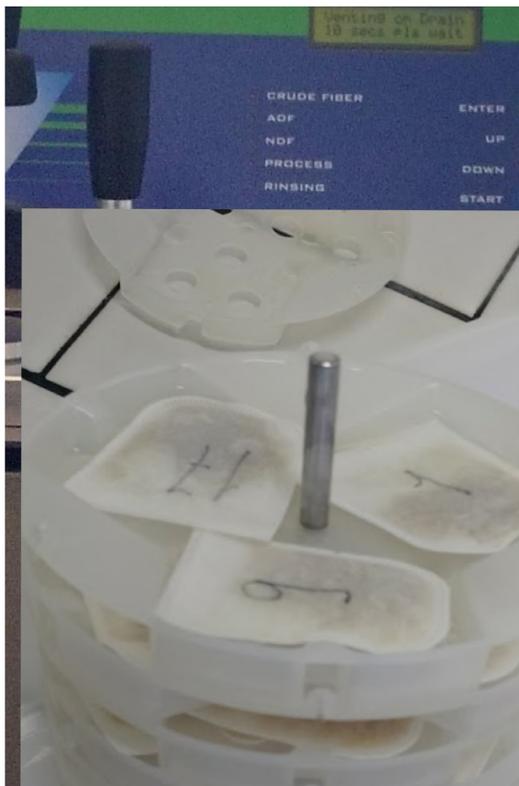


## Considerações metodológicas na determinação de fibra insolúvel em detergente para uso em equipamento semi-automático

Análise sequencial e tempo de secagem



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Pecuária Sul  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
42**

Considerações metodológicas na determinação  
de fibra insolúvel em detergente para uso em  
equipamento semi-automático

Análise sequencial e tempo de secagem

*Sérgio de Oliveira Juchem  
Andressa Navarrina Barela  
Clarice de Souza Tavares de Almeida*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Pecuária Sul**  
BR 153, Km 632,9 Caixa postal 242  
96401-970, Bagé, RS  
Fone: 55 (53) 3240-4650  
Fax: 55 (53) 3240-4651  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Fernando Flores Cardoso*

Secretária-Executiva  
*Márcia Cristina Teixeira da Silveira*

Membros  
*Elisa Köhler Osmari, Gustavo Martins da Silva, Fabiane Pinto Lamego, Graciela Olivella Oliveira, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Lisiane Brisolara, Robert Domingues, Sérgio de Oliveira Juchem*

Suplentes  
*Henry Gomes de Carvalho, Marcos Jun Iti Yokoo*

Supervisão editorial  
*Lisiane Brisolara*

Revisão de texto  
*Felipe Rosa*

Normalização bibliográfica  
*Graciela Olivella Oliveira*

Tratamento das ilustrações  
*Daniela Garcia Collares*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Daniela Garcia Collares*

Foto da capa  
*Sérgio O. Juchem*

1ª edição  
Publicação digitalizada (2020)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Pecuária Sul

---

Juchem, Sérgio de Oliveira

Considerações metodológicas na determinação de fibra insolúvel em detergente para uso em equipamento semi-automático : análise sequencial e tempo de secagem / Sérgio de Oliveira Juchem, Andressa Navarrina Barela, Clarice de Souza Tavares de Almeida. -- Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2020.

PDF (18 p.).— (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1983-0467 ; 42)

1. Nutrição animal. 2. Digestão. 3. Equipamento. I. Barela, Andressa Navarrina. II. Almeida, Clarice de S. Tavares de. III. Título. IV. Série.

CDD 636.085

## Sumário

---

Resumo .....	4
Abstract .....	6
Introdução.....	8
Material e Métodos .....	10
Resultados e Discussão .....	13
Conclusões.....	18
Referências .....	18

# Considerações metodológicas na determinação de fibra insolúvel em detergente para uso em equipamento semi-automático

## Análise sequencial e tempo de secagem

Sérgio de Oliveira Juchem<sup>1</sup>

Andressa Navarrina Barela<sup>2</sup>

Clarice de Souza Tavares de Almeida<sup>3</sup>

**Resumo** – A caracterização da fração fibrosa em alimentos de acordo com a insolubilidade destes compostos em detergentes neutros e ácidos é a metodologia mais adequada para uso na nutrição dos ruminantes até o momento. O processo tradicional para determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) é lento, demanda envolvimento constante no processo. Alguns equipamentos semiautomáticos surgiram no mercado à medida que a determinação de FDN e FDA se tornou rotina nos laboratórios de nutrição animal, entre estes equipamentos, o ANKOM A2000 (Ankom, NY, EUA). O objetivo do estudo foi determinar o tempo de secagem ideal para a bolsa de fibra com amostra após o término do processo de digestão, assim como avaliar o efeito do método sequencial sobre as determinações de FDA em forragem.

Foram realizados dois ensaios, o primeiro (n=24) para avaliar o tempo de secagem, 3, 4 ou 5h, enquanto o segundo ensaio (n=48) avaliou o efeito do método sequencial sobre a determinação de FDA. Foi utilizado uma amostra

---

<sup>1</sup> Médico-veterinário, Ph.D. em Biologia nutricional, pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Bagé-RS

<sup>2</sup> Graduanda em Engenharia Química, bolsista CNPq/PIBIC, Unipampa, Bagé-RS

<sup>3</sup> Graduanda em Engenharia Química, bolsista FAPERGS/PROBIC, Unipampa, Bagé-RS

de referência, MRV16, repetida ao longo das 4 baterias, cada bateria compreende 24 amostras.

Cada amostra é acomodada em uma bolsa de filtro com porosidade de 25 micros. Os dados foram submetidos à análise de variância. O tempo de secagem de 3h (68,6%) resultou em maior ( $P = 0,04$ ) teor de FDN que 4h (68,3%), mostrando-se insuficiente. Por outro lado, não houve diferença ( $P > 0,15$ ) entre 4 ou 5h (36,2% e 36,4%) sobre a concentração de FDA nas amostras. O método sequencial, a determinação de FDA na mesma bolsa que passou pela digestão em detergente neutro, resultou em valores de FDA menores que o método tradicional (35,8 e 38,3%;  $P < 0,01$ ).

O presente estudo alcançou os objetivos propostos em sua plenitude. De acordo com os resultados encontrados, o tempo de secagem ideal para as condições utilizadas é de 4h, não havendo benefícios na extensão do tempo de secagem. Os tempos de secagem podem variar em função do equipamento e umidade local, portanto, é recomendável conduzir uma validação local para comprovar os tempos indicados neste estudo. O método sequencial de determinação de FDA produziu resultados claramente inferiores ao método direto, e de magnitudes consideráveis. O uso do método tradicional ainda é preferível em função de sua amplitude de utilização e do banco de dados já disponíveis com o uso desta metodologia.

**Palavras chave:** Forragem, parede celular, detergente neutro.

## Methodological aspects for determination of detergent insoluble fiber in semi-automatic equipment

### Sequential analysis and drying time

**Abstract** – The characterization of the fibrous fraction in foods according to the insolubility of compounds in neutral and acid detergents is the most acceptable methodology for use in ruminant nutrition so far. The traditional process for determining neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) is slow and labor intensive. Semiautomatic analyzers have appeared on the market as NDF and ADF determination became routine in animal nutrition laboratories, among them the ANKOM A2000 (Ankom, NY, USA). The objective of this study was to determine the optimal drying time after the digestion process was completed, as well as to evaluate the effect of the sequential method on ADF determination.

Two studies were performed, the first ( $n = 24$ ) to evaluate the drying time, 3, 4 or 5h, while the second ( $n = 48$ ) evaluated the effect of sequential method on the determination of ADF. A reference sample, MRV16, was utilized in the evaluations. Four batteries were ran, each battery composed of 24 samples. Each sample was placed in a 25 micron porosity filter bag. Data were subjected to analysis of variance. Drying time of 3h (68.6%) resulted in higher ( $P = 0.04$ ) NDF content than 4h (68.3%), which was insufficient. There was no difference ( $P > 0.15$ ) between 4 or 5h (36.2% and 36.4%) on the FDA concentration in the samples. The sequential method, the determination of ADF in the same bag that underwent neutral detergent digestion previously, resulted in lower ADF values than the traditional method (35.8 and 38.3%;  $P < 0.01$ ).

According to these findings, the minimum drying time is 4h, with no benefits in the extension of drying time. Drying times may vary slightly depending on equipment, environmental humidity, so it is always advisable to conduct a pilot study for local validation. The sequential method for determination of ADF produced results clearly lower than direct method. The traditional method is still preferable given its use and acceptance across laboratories.

**Keyword:** Forage, cell wall, neutral detergent

## Introdução

---

A fração fibrosa dos alimentos é um componente importante para o efetivo balanceamento de dietas para ruminantes, que por sua vez, tem como objetivo final promover conjuntamente o desempenho zootécnico, a saúde e a longevidade do rebanho. Em muitos países, o principal alimento dos ruminantes ainda é o pasto, que contém quantidade variável de fibra, variando em média de 40 a 80% de fibra em detergente neutro (FDN) na matéria seca. Até meados da década de 80, a fibra bruta (FB) foi utilizada como medida de fibra em alimentos para ruminantes (National Research Council, 1984), em parte fruto da ausência de uma metodologia alternativa que tivesse potencial para produzir resultados mais precisos e, sobretudo, que fosse aceita por técnicos e pesquisadores. O uso da FB na nutrição de ruminantes tornou-se obsoleto há pelo menos 20 anos.

A metodologia, que serviu de base para os diferentes métodos de fibra insolúvel em detergente utilizados atualmente, teve sua primeira versão publicada em 1963 (Van Soest, 1963a, 1963b), porém passaram-se mais de 20 anos até que fosse utilizada na prática. A sexta edição do NRC de gado de corte (National Research Council, 1984) publicou pela primeira vez o percentual de parede celular para alguns alimentos, embora nesta edição o teor de FB ainda fosse o referencial para fibra. A partir desta época a utilização da fibra insolúvel em detergentes neutro (FDN) e ácido (FDA) tornou-se referência para a mensuração da porção fibrosa de alimentos para ruminantes (Van Soest et al., 1991; Van Soest, 1994; National Research Council, 2000; Mertens, 2002).

A primeira etapa do método de Van Soest é a fervura (100 °C) em detergente neutro, onde os conteúdos celulares e boa parte da pectina são solubilizados. A pectina é um constituinte estrutural da parede celular, mas sua digestibilidade em ruminantes é alta, mais próxima à digestibilidade do conteúdo celular. Os demais constituintes da parede celular, celulose, hemicelulose e lignina são insolúveis no detergente neutro durante o processo de fervura e, portanto, ficam retidos durante o processo de filtragem através do cadinho de Gooch. A segunda etapa do processo envolve a fervura (100 °C) em detergente ácido, uma solução mais forte, que retém teoricamente substâncias menos digestíveis, como celulose e lignina. Atualmente se tem

conhecimento que parte da lignina é solubilizada durante a fervura em detergente ácido, o que por parte pode explicar parte das variações na digestibilidade da fração FDA observada em ensaios com animais (Vranic et al., 2009).

Enquanto a utilização deste novo modelo de quantificação e qualificação da parede celular trouxe um grande avanço para o conhecimento na fisiologia digestiva e nutrição de ruminantes, para a parte laboratorial criou-se um novo entrave. A metodologia original desenvolvida por Van Soest (1963a, 1963b, 1994) e Van Soest et al. (1991) apresenta diferentes passos que requerem a intervenção contínua de um profissional treinado para a conclusão das análises com a qualidade necessária. Todas as amostras e suas replicatas são processadas individualmente, ou seja, cada replicata de uma amostra passa pelo processo de fervura, filtragem, secagem e pesagem individualmente. Este processo definitivamente cria dificuldades para a obtenção de replicatas com baixo coeficiente de variação intraensaio. A necessidade de adaptações operacionais que possibilitassem uma execução mais ágil era clara, no entanto, tais adaptações tinham como objetivo principal garantir a qualidade dos resultados semelhantes aos obtidos na técnica original. Alguns equipamentos de fervura e filtragem de frascos em bateria tornaram-se disponíveis, mas ainda assim, os avanços em melhorias no fluxo analítico foram reduzidos.

Os grandes ganhos em eficiência surgiram com a comercialização de equipamentos semiautomatizados que possibilitaram a execução de análises em bateria, várias amostras de uma vez. Este evento só foi possível através da utilização de bolsas filtro, onde cada amostra fica acondicionada em uma bolsa que é permeável à solução detergente e, ao mesmo tempo, capaz de reter as minúsculas partículas de amostra (Vogel et al., 1999; Neutral..., 2017). A individualização de amostras em cada bolsa filtro trouxe também a possibilidade operacional de realizar, com facilidade e segurança, o método sequencial.

O objetivo deste estudo foi determinar o tempo de secagem ideal da bolsa após o processo de digestão, assim como avaliar o efeito do método sequencial sobre as determinações de FDA.

## Material e Métodos

---

A amostra de referência para análise de forragens, MRV16, foi fornecida pelo Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, como parte do ensaio de proficiência de laboratórios de nutrição animal (EPLNA) para o ano de 2016, conduzido anualmente por aquele centro de pesquisa (Souza et al., 2006). A amostra MRV16 foi obtida a partir da forrageira tropical *Brachiaria decumbens*, cv. Basilisk, seca e moída. A amostra de referência MRV16 apresentava 94,16% de MS (cv=0,8%; n=167), 8,40% de PB (cv=8,6%; n=153), 69,43% de FDN (cv=5,0%; n=127), 37,29% de FDA (cv=7,1%; n=128), 1,64% de EE (cv=26,3%; n=123) e 9,93% de cinzas (cv=3,9%; n=157).

As soluções detergentes foram preparadas no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sul, conforme inicialmente descrito em Robertson (1978) e Van Soest et al. (1991). Com o objetivo de ampliar o uso da metodologia de determinação de fibra para amostras com maior teor de amido, como por exemplo, grãos, silagem de milho e dietas totais, o uso de  $\alpha$ -amilase resistente ao calor foi incorporado à metodologia original ao longo do tempo (Mertens, 2002). No presente estudo, a enzima  $\alpha$ -amilase resistente ao calor não foi adicionada à solução detergente, uma vez que apenas amostras de forragem foram analisadas. Os resultados apresentados incluem a cinza residual, ou seja, não houve determinação de cinza na porção insolúvel em detergente neutro.

O equipamento semiautomatizado (Fiber Analyzer A2000; Ankom, NY, EUA) tem capacidade para analisar 24 bolsas por bateria. Cada bolsa (F57, porosidade de 25 micrômetros) acomoda entre 0,45 a 0,50g da amostra a ser analisada, neste caso forragem. Após a colocação das amostras no interior da bolsa, as bolsas são cuidadosamente seladas com seladora térmica e identificadas com um marcador resistente à acetona, e que também resiste ao processo de digestão (Tabela 1).

Tabela 1: Cuidados importantes para a obtenção de resultados confiáveis e com boa repetibilidade nesta metodologia semiautomatizada.

a) Ter cuidado durante a pesagem para não derrubar farelos sobre a balança, ou para que durante o processo de selagem não caia amostra ou pó para fora da bolsa. Todo empenho colocado no processo de pesagem poderá ser comprometido por eventos indesejáveis que resultem na perda de amostra.

b) Certifique-se que o processo de selagem foi bem efetuado, do contrário, haverá perda de amostra durante o processo de fervura. Erros desta natureza geralmente estão associados a grandes desvios do resultado, seja alto coeficiente de variação entre duplicatas ou valores muito baixos de fibra para o tipo de amostra.

c) Embora o marcador seja insolúvel em acetona, não é incomum que após o procedimento de FDA alguns números de identificação das bolsas estejam um pouco apagados. É importante conferir todos os números ao final de cada etapa: FDN e FDA. Esta etapa é particularmente importante para amostras que seguirão o processo para determinação de lignina.

A metodologia do fabricante (Acid..., 2017; e 2017b) contempla alternativas para a determinação de um número menor de bolsas por bateria através da redução no volume de solução detergente, no entanto, esta alternativa não foi utilizada nos ensaios apresentados. Todos os ensaios foram realizados com a capacidade máxima do equipamento, 24 bolsas. As bolsas com amostras são acomodadas em um cilindro de plástico resistente ao calor, este cilindro é composto por nove bandejas, que se encaixam uma na outra sobrepostas. Cada bandeja deste cilindro (Figura 1) comporta 3 bolsas, sendo que a última bandeja (a nona) funciona apenas como tampa para a bandeja inferior (a oitava) e assim não recebe amostras.

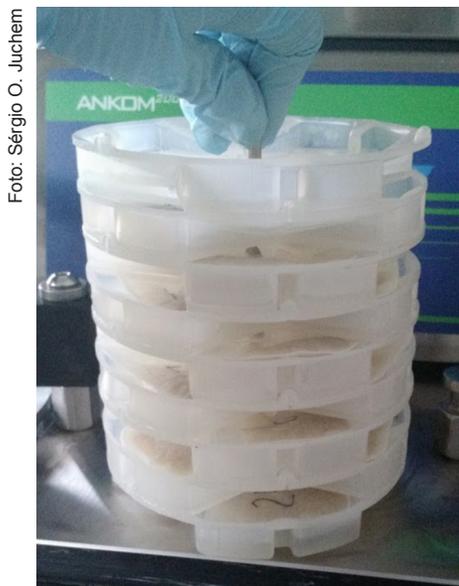


Foto: Sérgio O. Juchem

**Figura 1.** Bandejas para colocação das bolsas com amostras no analisador de fibras semiautomatizado Ankom A2000.

O equipamento utilizado nesta avaliação, o ANKOM A2000, admite a injeção automática das soluções detergentes, esta função não foi utilizada durante estes ensaios. As soluções detergentes, 2L, foram adicionadas manualmente antes de cada processo de digestão. O processo de digestão em FDN utilizou temperatura de 100 °C por 75 min., seguido de 4 enxagues de 5 min. cada um (Neutral..., 2017). O procedimento de FDA teve duração de 60 min. a 100° C, seguido de 4 enxagues de 5 min. cada (Acid..., 2017). As bolsas com amostras foram retiradas do equipamento, submersas em acetona por 5 min., e então levadas a estufa a 105 °C, após o término de cada digestão.

Após o processo de digestão, seja com detergente ácido ou detergente neutro, a metodologia recomenda secagem a 105 °C, entre 2 a 4 horas, e posterior pesagem. Duas a quatro horas é um intervalo relativamente amplo, sem contar que este tempo também é dependente das condições de cada estufa. Esta etapa é muito importante, pois toda a água que eventualmente não for retirada da bolsa em consequência de uma secagem ineficiente, será contabilizada na balança como fibra, ou seja, os resultados podem ser

superestimados. Por outro lado, tempos excessivos de secagem (8 a 12h) atrasam a logística de análise e podem danificar a estrutura de filtragem das bolsas. O fabricante recomenda que as bolsas de fibra não sejam secas por períodos extensos em estufa (> 6h) nem tão pouco submetidas a temperaturas superiores a 105 °C (Acid..., 2017; Neutral..., 2017). O primeiro ensaio comparou o efeito do tempo de secagem (3 ou 4h) sobre a quantificação de FDN (n=24) e FDA (4 ou 5h; n=24) na forragem. No segundo ensaio, foram analisadas duas baterias de 24 amostras cada (n=48) para a comparação da determinação de FDA diretamente, ou sequencial, na mesma bolsa utilizada para a determinação de FDN. As amostras (n=24) utilizadas para determinação de FDA sequencial foram submetidas ao processo de FDN previamente em uma bateria específica. Após a determinação de FDN, as amostras foram separadas em 2 subgrupos de 12 amostras para então compor as 2 baterias para análise de FDA, direto ou sequencial.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando um modelo estatístico que incluiu o efeito de tempo de secagem para o ensaio 1. Para o ensaio 2, o modelo estatístico incluiu o efeito da bateria, método de FDA (direto ou sequencial) e a interação de método e bateria. O programa estatístico STATA 13 foi utilizado para a execução das análises.

## Resultados e Discussão

---

A descrição, por mais detalhada que seja, de metodologias analíticas não isenta a necessidade de validação local do método. Não é incomum, particularmente entre aqueles profissionais com pouca experiência de “bancada”, deixar-se seduzir pela falsa impressão de economia de tempo, e desconsiderar etapas metodológicas desta natureza. Cada laboratório, por mais parecido que seja, apresenta peculiaridades referentes a equipamentos, condições ambientais e humanas que precisam ser confrontadas com a descrição teórica para que, através do processo de implementação metodológica, as condições locais para a obtenção de resultados confiáveis possam ser definidas e confirmadas. Os resultados apresentados a seguir compõem uma pequena etapa do processo de implementação da metodologia de determinação de FDN e FDA para o equipamento semiautomatizado ANKOM A2000 no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sul.

Com o surgimento de equipamentos semiautomatizados houve a necessidade de adaptações em algumas etapas da metodologia original para adequação ao novo procedimento, sem perder a fidelidade aos resultados originais (Vogel et al., 1999). Diante da recomendação original do fabricante de secagem de 2 a 4 horas após o processo de digestão, foram avaliados os tempos de 3, 4 e 5 horas. Períodos maiores que 6 h podem ser prejudiciais à estrutura física das bolsas e não são aconselhados. As comparações entre os tempos foram feitas em baterias distintas, de FDN e FDA, por uma questão de disponibilidade de tempo. O tempo de 2h não foi avaliado, pois antecipamos, inicialmente, que seria insuficiente.

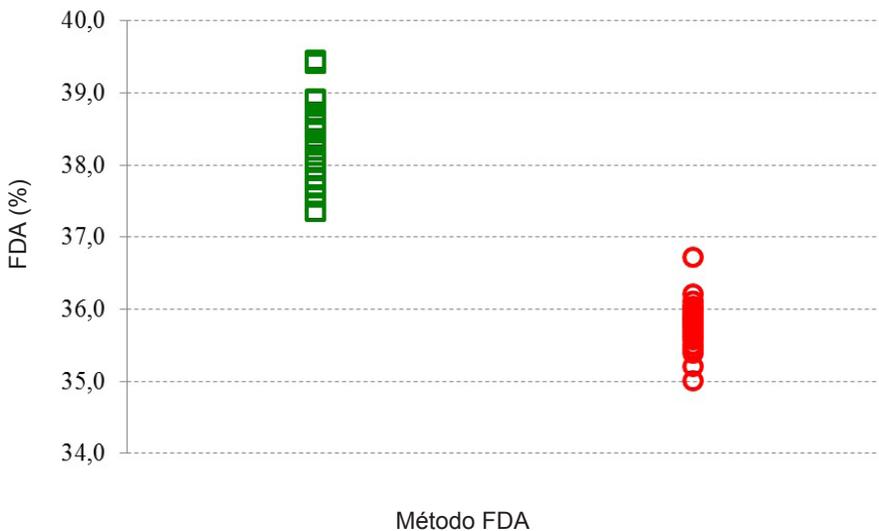
O teor de FDN foi superior ( $P=0,04$ ) em amostras secas por 3h comparado a 4h (Figura 2). É interessante observar que a diferença entre 3 e 4h foi numericamente muito pequena, menos de 0,5%, porém a variação dos teores de FDN foi consideravelmente mais ampla para amostras secas por 3h. A maior dispersão dos resultados certamente aumentaria a variação dentro da bateria entre amostras duplicatas em um ensaio real, resultando em aumento na repetição de amostras, tempo de análise e custo de operação. Os resultados referentes às análises de FDA são apresentados na Figura 3. Quando o tempo de secagem foi aumentado para 4 e 5h, não houve diferença nas concentrações de FDA, demonstrando que não há benefícios em estender o processo de secagem além de 4h nas condições avaliadas.





Para a realidade brasileira, o uso da metodologia sequencial traz uma grande vantagem econômica, a redução do custo com bolsas filtro pela metade. Cotadas em dólar, estes consumíveis respondem por um percentual elevado do custo da análise. Atualmente seria prematuro a implementação deste método, em função da sua baixa difusão e poucos estudos de pesquisa sobre o tema. Para que esta metodologia venha a ser utilizada como rotina no futuro, é necessário um conhecimento mais aprofundado sobre os fatores envolvidos na redução do teor de FDA e potenciais interações entre o método sequencial e outros constituintes da amostra, como por exemplo o teor de pectina. Acreditamos que o método sequencial seja uma oportunidade promissora para aperfeiçoar a qualidade das determinações de FDA em amostras diversas, em um futuro próximo.

**Figura 4.** Teor de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA; %) de material de referência (MRV16; n=48) analisado pelo método tradicional (quadrado verde; 38,31%) ou sequencial (círculo vermelho; 35,79%;  $P < 0,01$ ; EPM=0,18).



## Conclusões

---

O tempo de secagem em estufa das bolsas filtro após o processo de digestão é um procedimento simples, porém a exata duração do processo é importante para garantir a boa repetibilidade do método. Os tempos de secagem podem variar em função das condições locais, portanto, é recomendável conduzir uma validação local. Nas condições deste estudo, 4h de secagem a 105 °C foram suficientes para a completa remoção de umidade das bolsas. O método sequencial de determinação de FDA produziu resultados inferiores ao método direto, sugerindo que o método direto superestime a concentração de FDA. Ainda assim, dado à amplitude de adoção do método tradicional e a pouca informação referente ao desempenho do método sequencial, o primeiro se mostra a escolha mais lógica até o presente momento.

## Referências

---

- ACID detergent fiber in feeds: filter bag technique (for A2000 and A2000I). [Macedon]: Ankom Technology, 2017. 2 p. (Ankom Technology. ADF Method, 12). Disponível em: <[https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method\\_12\\_ADF\\_A2000.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_12_ADF_A2000.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2018.
- NEUTRAL detergent fiber in feeds: filter bag technique (for A2000 and A2000I). [Macedon]: Ankom Technology, 2017. 2 p. (Ankom Technology. NDF Method, 13). Disponível em: <[https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method\\_13\\_NDF\\_A2000.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_13_NDF_A2000.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2018.
- CASSIDA, K. A. TURNER, K. E. FOSTER, J. G. HESTERMAN, O. B. Comparison of detergent fiber analysis methods for forages high in pectin. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 3-4, p. 283-295, June 2007.
- JUNG, G. H. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 810-813, May 1997. Supplement.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, Nov./Dec. 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 6th rev. ed. Washington, DC: National Academy of Science, 1984. 90 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th rev. ed. Washington DC: National Academy of Science, 2000. 242 p.

ROBERTSON, J. B. The detergent system of fiber analysis. In: SPILLER, G. A.; AMEN, R. J. **Topics in dietary fiber research**. New York: Plenum, 1978. cap. 1, p. 1-35.

SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. A.; GUIMARÃES, E. S. **Ensaio de proficiência de laboratório de nutrição animal**: relatório anual - ano 8 - 2005. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. 59 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 64).

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**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 825-829, 1963a.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963b.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VOGEL, K. P.; PETERSON, J. F.; MASTERSON, S. D.; TOY, J. J. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. **Crop Science**, v. 39, n. 1, p. 276-279, Jan./Feb. 1999.

VRANIC, M.; KNEZEVIC, M.; PERCULIJA, G.; BOSNJAK, K.; LETO, J. Intake, digestibility in vivo, N utilization and in sacco dry matter degradability of grass silage harvested at three stages of maturity. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 2, p. 225-231, Feb. 2009.

**Embrapa**

---

**Pecuária Sul**

CGPE: 15837

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

