

Anais da XVII Semana do Estudante - "Tópicos em Produção de Leite"**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ALIMENTOS PARA BOVINOS****Ana Rita Araújo Nogueira¹****Gilberto Batista de Souza²****1. Introdução**

A intensificação das atividades na pecuária de corte e de leite aumentou as necessidades quantitativas e qualitativas dos alimentos fornecidos aos animais, principalmente durante os períodos de escassez. Em sistemas de confinamento de bovinos, a alimentação representa cerca de 70% dos custos (NRC, 1996). A diminuição desses custos, inclusive mediante o desenvolvimento de técnicas que possibilitem aumentar a absorção de nutrientes pelo organismo, é uma das alternativas que deve ser perseguida.

A quantificação dos nutrientes biodisponíveis presentes na alimentação bovina proporciona maior conhecimento do real valor nutritivo dos alimentos, tomando possível adequar dietas alimentares mais eficientes e racionalizando a utilização dos recursos nos sistemas de produção.

A nutrição animal envolve reações químicas e processos fisiológicos que convertem os alimentos em produtos essenciais para sustentar as funções animais: manutenção, crescimento, reprodução e lactação. Os alimentos suplementam a energia e os nutrientes na forma de proteínas, vitaminas e minerais. Para os animais ruminantes, energia e proteínas são os principais fatores limitantes para seu adequado desenvolvimento e tem recebido maior atenção quanto ao conhecimento do seu valor nutritivo.

De acordo com o sistema de proteínas e carboidratos (CNPCS) os alimentos são constituídos de proteínas, carboidratos, gorduras, cinzas e água, sendo que as proteínas e os carboidratos são subdivididos de acordo com suas características químicas, físicas e pela degradação ruminal e digestibilidade pós-ruminal (Sniffen et al., 1992). Em geral as principais fontes de nutrientes empregadas na dieta alimentar de ruminante são provenientes de rações concentradas, silagens, fênos e gramíneas.

2. Processo Digestivo

Os componentes orgânicos dos alimentos estão na forma de grandes substâncias insolúveis que precisam ser quebrados em compostos menores para que possam atravessar a membrana do trato gastrintestinal. Para que possa ser deglutido após a

¹ Pesquisadora em Química Analítica. Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP. Endereço Eletrônico: anarita@cnpse.embrapa.br

² Químico, MS. Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP. Endereço Eletrônico: gilberto@cnpse.embrapa.br

ingestão, os alimentos sofrem a primeira mastigação onde ocorre a redução no tamanho das partículas. A segunda mastigação é realizada com maior eficácia e ocorre após a regurgitação do bolo alimentar (Andrigueto et al., 1999).

O estômago dos ruminantes são divididos em pré-estômago (rúmen, retículo e omaso) e estômago glandular (abomaso). É no rúmen e no retículo que se inicia a transformação do alimento através da digestão microbiana por processos de fermentação. No omaso ocorre grande parte da absorção de água e não se processa a digestão por fermentação. O abomaso é chamado de estômago verdadeiro, nele se inicia a digestão enzimática e ácida pelo suco gástrico (Andrigueto et al., 1999).

3. Com posição Química dos Alimentos

3.1. Carboidrato

Os carboidratos são a principal reserva da energia fotossintética nas plantas, constituindo cerca de 50 a 80% da matéria seca e são extremamente importantes para a nutrição animal, com o principal fonte primária de energia na dieta dos ruminantes (Van Soest, 1994). Podem ser classificados, de acordo com o número de unidades monoméricas, com o açúcar simples, polissacarídeos não estruturais e polissacarídeos estruturais (Moore & Hatfield, 1994).

Os açúcares simples, monossacarídeos (glicose, frutose, e etc.) e dissacarídeos (sacarose, celobiose, e etc.) são rapidamente fermentados no rúmen produzindo ácidos graxos voláteis, os quais são absorvidos pelo sangue através da parede do rúmen (Baldwin & Allinson, 1983).

Os polissacarídeos têm que ser degradados para açúcar simples para então serem utilizados: o amido e a pectina, os principais polissacarídeos não estruturais, apresentam taxa de degradação rápida e são geralmente degradados no rúmen (Hatfield, 1989) no entanto, os polissacarídeos estruturais são lentamente e incompletamente degradados, sendo que a degradabilidade da celulose de forrageiras varia de 25 a 90%, e da hemicelulose de 45 a 90% (Pigden & Heaney, 1969; Moore & Hatfield, 1994).

3.1.1. Amido

Principal polissacarídeo não estrutural encontrado nas plantas superiores, o amido é formado por unidades de D-glucose e ocorre em duas formas: amilose e amilopectina em concentrações que variam de acordo com a planta (Theurer, 1986). A amilose é uma molécula linear de d-glucose unidas com ligação α -1-4, contém peso molecular relativamente baixo, apresentando quantidade inferior a 2.000 unidades de d-glucose residual por molécula, é solúvel em água e apresenta conformação helicoidal quando em solução. No entanto, a amilopectina é altamente ramificada, contém moléculas de d-glucose unidas através de ligações α -1-4 e interligadas com ligações α -1-6 em intervalos ao longo da cadeia molecular, possuindo alto peso molecular, de 2.000 a 220.000 unidades de glicose residual por molécula (Moore & Hatfield, 1994).

O amido é hidrolisado para maltotriose, maltose e D-glucose por uma variedade de amilases que são produzidas por protozoários, fungos e bactérias do rúmen (Hoover &

Stokes, 1991). A amilase bacteriana é responsável pela maior parte da digestão do amido. Os microrganismos amilolíticos são: *Bacteroides amylophilus*, *Succinivibrio destrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium* e *Streptococcus bovis* (Van Soest, 1994; Russel & Hespell, 1981). A maior parte deste carboidrato ingerido pelos ruminantes, na dieta de forragens, é digerida no rúmen pelos microrganismos. Entretanto, o amido que escapa da digestão ruminal será digerido no intestino delgado pela ação da α -amilase pancreática (Nocek & Tamminga, 1991).

3.1.2. Celulose

Principal carboidrato estrutural, a celulose representa cerca de 20 a 40% da matéria seca das plantas superiores (Van Soest, 1994). É constituída de unidades de D-glucose unidas por ligação β -1,4 em longas cadeias lineares, não podendo ser digerida pela maioria dos animais mamíferos. No entanto, tem papel de grande importância no trato gastrintestinal. Os microrganismos que vivem no rúmen e no intestino grosso de diversos animais que incluem as bactérias, protozoários e fungos são capazes de sintetizar as enzimas que atacam a celulose. As bactérias celulolíticas mais importantes são: *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* e *Fibrobacter succinogenes* (Van Soest, 1994; Moore & Hatfield, 1994).

A disponibilidade nutricional da celulose pode variar de indigestibilidade total até digestibilidade completa, irá depender da sua associação com a lignina e com outros constituintes da parede celular a qual pode limitar a ação dos microrganismos do rúmen. Fator intrínseco com a cristalinidade também pode reduzir o ataque enzimático, diminuindo sua digestibilidade (Kerley et al., 1988; Moore & Hatfield, 1994).

3.1.3. Hemicelulose

A hemicelulose é o mais complexo polissacarídeo das plantas, faz parte de um grupo de substâncias que incluem as pentosanas e certas hexosanas, são muito menos resistentes ao tratamento químico do que a celulose. A hidrólise da hemicelulose de forragens produz os monossacarídeos D-glucose, arabinose, manose e galactose (Chesson & Forsberg, 1988). A proporção relativa de cada monossacarídeo pode variar com a espécie, refletindo diferenças na estrutura deste polissacarídeo. É hidrolisada pelas enzimas hemicelulases presentes no fluido ruminal, e que também são produzidas pelas mesmas bactérias celulolíticas. Alguns fungos e protozoários também têm atividade hemicelulolítica, embora sua atividade seja menor do que a das bactérias (Van Soest, 1994). A biodisponibilidade da hemicelulose também pode ser limitada quando está associada à lignina, prejudicando a atividade dos microrganismos do rúmen.

3.2. Lignina

É um polímero complexo, formado basicamente por três compostos fenólicos (tanto na função ácido como na função aldeído): ácido p-coumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico. É encontrada integralmente com o componente da parede celular das plantas e não pode ser digerida pelas enzimas dos animais mamíferos (Fukushima & Hatfield, 2001). Nas plantas, sua principal função é com o componente estrutural para

dar resistência e rigidez na parede celular, mas também é importante com o limitante na perda de água, reduzindo a permeabilidade da parede celular e impedindo a ação de microrganismos.

A lignina é considerada o principal obstáculo para o ataque enzimático da fibra, limitando a utilização dos carboidratos estruturais da parede celular, porque se encontra associada através de ligações covalentes com a celulose e hemicelulose de forrageiras (Van Soest, 1994). A lignificação apresenta geralmente correlação negativa com a digestibilidade dentro de uma espécie sob vários estágios de crescimento. Entretanto, esta correlação não é comparável entre espécies. Por exemplo, a concentração de lignina é geralmente maior nas leguminosas do que nas gramíneas quando comparadas no mesmo estágio de desenvolvimento. Entretanto, para uma dada concentração de lignina, as leguminosas são mais digestíveis do que as gramíneas (Jung & Vogel, 1986). Buxton & Russell (1988) estudaram as relações entre lignina e digestibilidade da parede celular de algumas gramíneas e leguminosas, e encontraram que a lignina de gramíneas era 61% mais inibidora da digestão da parede celular do que a lignina de leguminosas.

3.3. Proteínas

As proteínas podem ser divididas em duas grandes classes: proteínas simples, apresentando apenas aminoácidos em sua composição e as proteínas conjugadas, formadas de aminoácidos (parte protéica) e de outras substâncias (parte não protéica). São compostos orgânicos extremamente complexos e de natureza coloidal, formados fundamentalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (Sgarbieri, 1996). Essas macromoléculas formadas por centenas de aminoácidos são unidas através de ligações peptídicas e têm como função nobre a formação dos tecidos (sangue, leite, carne, lã, e tc.). Podem ser de origem animal ou vegetal, sendo que as de origem animal apresentam maior valor biológico em relação às procedentes dos vegetais (Van Soest, 1994).

As proteínas das plantas podem ser classificadas em dois grupos: proteínas das folhas/caules e proteínas das sementes. As proteínas das folhas/caules podem ser divididas em citoplasmáticas, cloroplásticas e nucleoproteínas, sendo essencialmente solúveis no conteúdo celular das plantas. As proteínas extensinas, são menos solúveis e estão associadas através de ligação covalente com polissacarídeos da parede celular das plantas, sendo no entanto, digestíveis (Van Soest, 1994).

Para serem utilizadas pelos microrganismos do rúmen, as proteínas necessitam ser quebradas em moléculas mais simples, com aminoácidos ou pequenos peptídeos. Esse processo de quebra da molécula protéica é comumente chamado de proteólise e ocorre, através das enzimas proteases que estão aderidas à superfície dos microrganismos.

Cerca de 20 a 60% da proteína verdadeira passa diretamente através do rúmen sem sofrer ataque microbiano (bypass), sendo posteriormente digerida no abomaso pela pepsina e pela tripsina, quimiotripsina e carboxipeptase no intestino delgado (Van Soest, 1994). A porção da proteína verdadeira, cerca de 40 a 80%, juntamente com o nitrogênio não protéico (NNP), é metabolizada no rúmen, através principalmente das

bactérias que são consideradas os principais microrganismos proteolíticos, formando compostos nitrogenados simples (normamente a amônia) e cadeia carbônica (Fig. 1).

Estes compostos são os responsáveis pela síntese do corpo microbiano, formando a proteína microbiana (PM), a qual possui alto valor biológico (VB). A amônia não utilizada será absorvida pela parede do rúmen indo, para o fígado via corrente sanguínea onde será transformada em uréia, que poderá voltar para o rúmen através da saliva.

A proteína "bypass" assim como a porção da proteína microbiana, serão digeridas por processos enzimáticos nos intestinos e no abomaso, sendo transformadas em aminoácidos, os quais são absorvidos no trato digestivo, através da corrente circulatória.

O nitrogênio total (NT) presente nas plantas, apresenta-se sob as formas de proteína verdadeira (cerca de 60 a 80% do nitrogênio total), nitrogênio não-proteico e em pequena quantidade de nitrogênio lignificado (Van Soest, 1994).

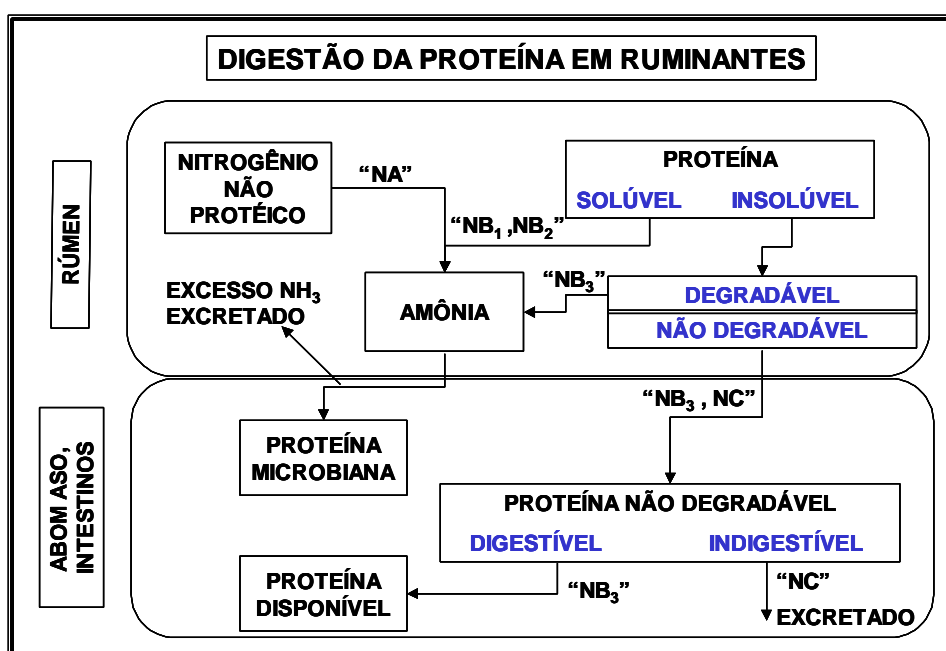


Figura 1. Esquema do metabolismo das frações nitrogenadas no rúmen.

4. Fracionamento de Constituintes dos Alimentos

Os métodos analíticos propostos por Weende são os mais antigos. Einhoff em 1809 preparou a fibra pela extração com álcool, alcali e ácidos diluídos (Van Soest, 1963). Estes procedimentos para avaliar a qualidade dos alimentos que são fornecidos na dieta de ruminantes, são empregados até hoje, há mais de 100 anos por alguns laboratórios. Consistem nas seguintes etapas: de terminação da matéria seca a 100°C (MS); extração com éter para estimar a concentração de lipídeos (Extrato Etéreo – EE); refluxo com solução diluída de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1,25% (v/v)) e hidróxido de sódio (NaOH 1,25% (m/v)) estimando o resíduo orgânico insolúvel com o fibra bruta (FB); teor

de cinzas de terminado pela calcinação da amostra a 600°C, e calcular a proteína bruta (PB) de terminada através do método Kjeldahl ($NT \times 6,25$) (Silva, 2002; Van Soest, 1994).

Erros estão embutidos nestas análises, pois as plantas contêm uma variedade de constituintes nitrogenados como ácidos nucléicos, nitrogênio não proteico (nitrato, amônio, aminoácidos livres, etc.) e frações associadas com a lignina, as quais são consideradas com a proteína. O conteúdo de nitrogênio nas proteínas das plantas pode variar de 15 a 16% (Van Soest, 1994). Outro erro grave é devido à solubilização da lignina (fração solúvel em álcali diluído) e hemicelulose na preparação da FB.

Com o objetivo de determinar a parede celular insolúvel e fracionar seus componentes (hemicelulose, celulose e lignina), Van Soest (1963) propôs método de extração baseado na solubilização de constituintes do conteúdo celular através do emprego de uma solução neutra de lauril sulfato de sódio (pH 7,0) e EDTA, denominada de Fibra em Detergente Neutro (FDN) a qual recupera a maior parte dos componentes da parede celular. No entanto, no resíduo insolúvel poderá conter proteínas insolúveis, nitrogênio ligado e alguns minerais.

Com o objetivo de solubilizar a proteína insolúvel e a hemicelulose, outro procedimento de extração foi proposto, denominado de Fibra em Detergente Ácido (FDA), o qual, através de fracionamento, possibilita determinar o teor de lignina e celulose (Van Soest & Wine, 1968). O nitrogênio lignificado, a lignina e a celulose são insolúveis em solução fortemente ácida (H_2SO_4 , 0,5 mol L⁻¹), contendo um detergente quaternário brometo de cetil trimetilamônio (C₁₆H₃₃N(CH₃)₃Br). Na (Fig. 2.9), é possível observar que a lignina é insolúvel a pH > 7,0, sendo a hemicelulose solúvel tanto em condições fortemente ácida, como em alcalinas.

Na FDN alguns contaminantes como amido, compostos de "Maillard", e minerais do solo poderão interferir nos resultados. A proteína insolúvel, bem como os compostos de "Maillard" presentes no resíduo poderão ser quantificados e subtraídos. Através da calcinação do resíduo é possível determinar a percentagem dos constituintes inorgânicos. O amido poderá ser eliminado através do pré-tratamento com amilase termossensível durante a solubilização do conteúdo celular (Van Soest *et al*, 1991; Souza *et al*, 1999).

Já a FDA possui algumas vantagens, pois a solução de detergente ácido remove todo amido e hemicelulose e o resíduo poderá ser empregado para, através de análise sequencial, estimar o conteúdo de celulose, lignina e nitrogênio indigestível (nitrogênio lignificado e composto de "Maillard"), cutina e sílica. Na Fig. 2 está representada a relação entre o sistema de Weende e o sistema de detergente proposto Van Soest (1963) na divisão da matéria orgânica de forrageiras.

Em amostras de forrageiras e outros alimentos, convencionalmente a proteína bruta (PB) é expressa através do nitrogênio total (NT x 6,25). A determinação do NT proposta por Kjeldahl em 1883, fundamenta-se na decomposição da matéria orgânica dos alimentos pelo ácido sulfúrico, em presença de sulfato de cobre com o catalisador, à aproximadamente 400°C. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é

de terminado através de destilação por arraste a vapor seguida de titulação com ácido diluído (AOAC, 1990).

Baseado na disponibilidade nutricional da proteína, Sniffen et al., (1992) propuseram o fracionamento dos compostos nitrogenados e dos carboidratos, conforme estão representadas na Fig. 3.

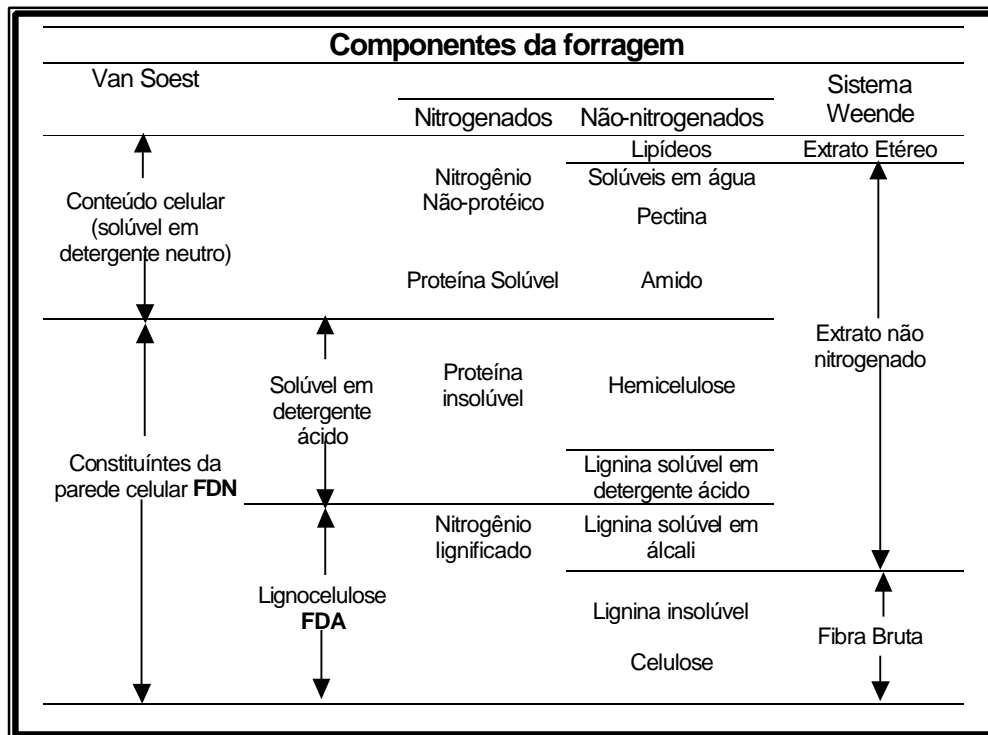


Figura 2. Comparação entre os métodos Van Soest e Weende na divisão da matéria orgânica de forrageiras (Silva, 2002).

As metodologias empregadas para as frações nitrogenadas foram sugeridas por Krishnamoorthy et al. (1982) e Licitra et al. (1996), onde, a fração "NA" representada pelo nitrogênio não protéico (NNP) composta principalmente de amônio, peptídeos, aminoácidos e nitrato, é solúvel no rúmen sendo rapidamente convertidos em amônia, pode ser determinada pela diferença entre o NT e o nitrogênio insolúvel em ácido tricloroacético a 10% (m/v). A fração "NB1" representada por proteínas solúveis e rapidamente degradada no rúmen; é composta de peptídeos e oligopeptídeos, pode ser determinada através da diferença entre o nitrogênio solúvel em tampão borato-fosfato a pH 6,8 (TBF) e o NNP. Pela diferença entre o nitrogênio insolúvel em TBF e o insolúvel na FDN (NIDN), é determinada as proteínas da Fração "NB2" que apresentam taxa de degradação ruminal intermédia.

As proteínas que correspondem a Fração "NB3" com preendem as proteínas extensinas, possuem taxas de degradação muito lenta sendo pouco solúvel no rúmen, devido sua associação com componentes da parede celular das plantas, são determinadas pela subtração do NIDN e do nitrogênio insolúvel na FDA (NIDA). Finalmente as formas de nitrogênio indisponíveis, fração "NC", são determinadas através do teor de NIDA, esta fração é composta pelas formas de nitrogênio associado com a lignina e taninos e pelos compostos de "Maillard". Os componentes desta fração são resistentes ao ataque microbiano e enzimático, é totalmente insolúvel no trato gastrintestinal.

Ainda segundo o CNPCS, os carboidratos podem ser classificados como estruturais (celulose e hemicelulose) e não estruturais (açúcares solúveis, amido e pectina), e subdivididos de acordo com a taxa de degradação ruminal: a fração "CA", rapidamente degradada, é o açúcar solúvel; a fração "CB1" apresenta taxa de degradação intermediária, é composta pelo amido e pela pectina; a fração "CB2" é de degradação lenta e compreende a parede celular disponível, composta de celulose e hemicelulose, e a fração "CC" representa o conteúdo indisponível da parede celular e que não é digerida ao longo de sua permanência no trato gastrintestinal, composta principalmente de lignina (Sniffen et al., 1992).

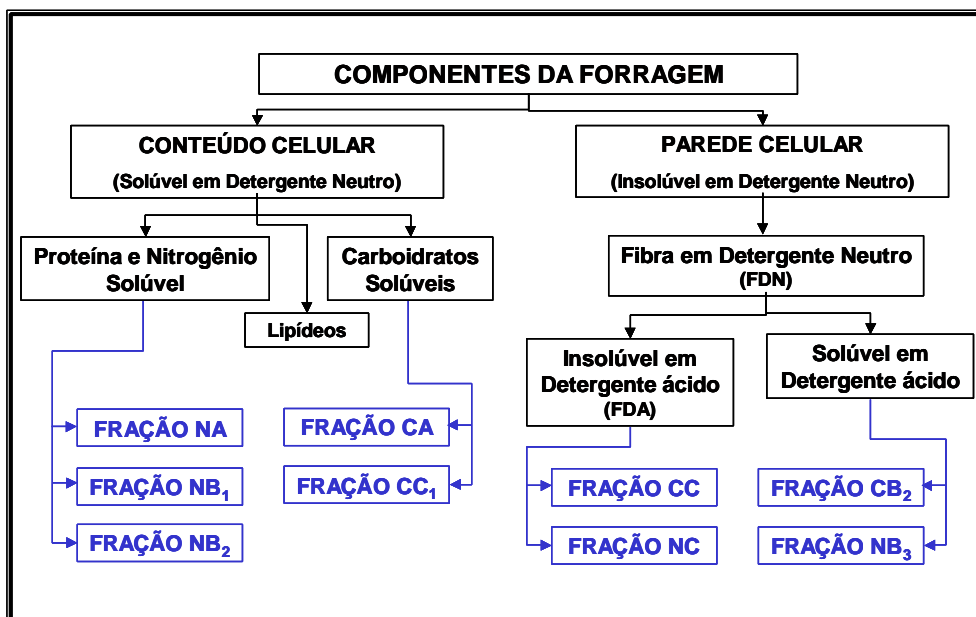


Figura 3. Esquema de fracionamento das formas nitrogenadas e dos carboidratos de alimentos proposto pelo sistema de proteínas e carboidratos (CNPCS – The Cornell Net Carbohydrate and Protein System).

5. Preparação das Amostras

5.1. Recebimento

As amostras aqui abordadas são: plantas forrageiras, feno, silagem, resíduos agrícolas ou agro-industriais e concentrados.

Com relação ao recebimento de amostras, é importante ressaltar que:

- a) São necessários, no mínimo, 15 g de material pré-seco (65°C) e moído para que se possa realizar as principais determinações em estudos de nutrição animal (nitrogênio total, matéria seca a 105°C, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, digestibilidade "in vitro" da matéria seca, matéria orgânica (cinzas), extrato etéreo, energia bruta, macro e micronutrientes minerais);
- b) Em experimentos que produzam pequena quantidade de amostras, devem ser discriminadas as determinações necessárias com a quantidade de material possível de se obter;
- c) Para determinação de pH, ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal em silagem, coletar de 1,0 a 2,0 kg de amostra;
- d) A perda de umidade, durante o transporte, não terá grande importância, desde que os resultados sejam expressos apenas na matéria seca total. No entanto, em amostras provenientes de silagem, a umidade é um bom indicador de sua qualidade, devendo-se após a coleta transferi-las para saco plástico, com pactando para expelir o ar e imediatamente encaminhá-las para o laboratório para serem processadas;
- e) Quando as determinações não forem realizadas imediatamente em amostras de forragens verdes, fezes, urina, e tc., é necessário que as amostras sejam conservadas em baixas temperaturas (entre -18 e -20°C).

5.2. Identificação e Registro

A identificação e o registro das amostras permitirão o rastreamento dos dados gerados, possibilitando ao pesquisador ou o cliente relacionar os códigos atribuídos pelo laboratório à identificação mais detalhada do experimento ou do trabalho a que os resultados se destinam.

O mínimo que é preciso incluir na etiqueta de identificação e registro é (Silva, 2002; AOAC, 1990; Bruno et al., 1995; EMBRAPA, 1996):

- ? nome do solicitante da análise;
- ? data de coleta;
- ? data de recebimento das amostras;
- ? tipo de material;
- ? determinações a serem realizadas;
- ? número-código de cada amostra; e
- ? documentação de informações relevantes.

5.3. Pré-Secagem

A pré-secagem das amostras tem os seguintes objetivos: facilitar o processo de moagem, conservar e prolongar a conservação da amostra pela destruição de enzimas responsáveis pelo processo de decomposição (Jones Jr. & Steyn, 1973) e pela diminuição da atividade microbiológica (facilitada pela umidade) e permitir a determinação da ASA. No caso de ser necessário o valor da porcentagem de matéria seca, deve-se pesar a amostra antes e depois da pré-secagem.

Amostras de plantas destinadas a determinações de macro e microelementos minerais podem necessitar descontaminação antes da pré-secagem, devido a poeira ou resíduos de pulverização no local da coleta, dependendo dos elementos a serem determinados e das possibilidades de contaminação. Caso necessário, lavar as amostras com solução de detergente neutra (entre 0,1 e 0,3% v/v) e em seguida com água desionizada. Este procedimento deve ser rápido, para se evitar perda de nutrientes durante a lavagem. Se as amostras estiverem secas ou murchas, é aconselhável não lavar com água (Nogueira et al., 1998).

A secagem é feita em sacos de papel ou de algodão limpos, em estufa com circulação de ar a temperatura de 65°C, por um período de 48 h ou até peso constante (Silva, 2002; Bruno et al., 1995). Para o caso de silagem, a pré-secagem deve ser feita a 45°C por 72 h. A carga de cada estufa deve estabelecida de tal modo que a circulação interna de ar não seja prejudicada.

Amostras de fezes que serão analisadas após secagem e moagem devem ser colocadas em bandejas limpas e secadas a 65°C durante 48 h ou até peso constante. Amostras que serão analisadas frescas devem ser colocadas em sacos plásticos, sendo então retirado o ar e congeladas até a sua manipulação.

A pré-secagem é necessária quando a amostra possui alto teor de umidade.

Após secagem, a bandeja ou o saco de papel é retirado da estufa e posto sob condições ambientais do laboratório por pelo menos 1 h. Esse tempo é necessário para que a umidade da amostra entre em equilíbrio com a umidade do ambiente e atinja peso constante e para evitar erros de pesagem (movimentação de ar ascendente sobre a balança).

No caso de grãos, o seguinte procedimento para controle de qualidade da matéria prima é adotado nas indústrias: pré-secagem a 45°C por 24 h; em seguida, o grão é triturado ou quebrado e colocado em estufa por 1 h a 130°C para determinação da matéria seca.

5.4. Moagem

A moagem das amostras é feita em moedor do tipo Wiley, com facas, com peneiras de 1 mm, sendo coletado apenas o que passa na peneira (Silva, 2002; AOAC, 1990; PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR, 1995; EMBRAPA, 1996). Toda superfície que tenha contato com a amostra deve ser de aço inoxidável.

A moagem é realizada em amostras que apresentam elevado teor de matéria seca (> 80%). Se a amostra for constituída de pó fino, capaz de atravessar a peneira

de malha 40, bastará homogeneizá-la e reduzi-la, com auxílio do quarteador, à porção destinada à análise.

O procedimento a ser utilizado na moagem, entre uma amostra e outra, é o seguinte:

- a) ao retirar a amostra, abrir o moedor e limpar adequadamente seu interior, não deixando material que possa contaminar a amostra seguinte;
- b) fechar novamente o moedor, colocando pequena quantidade da próxima amostra;
- c) descartar esta quantidade moída;
- d) colocar o restante do material, coletando o material moído.

Para quantidades pequenas de amostras, o melhor é empregar micromoedores. Não sendo possível, aproveitar todo o material, inclusive o que fica retido na peneira. No caso de algumas amostras, com o por exemplo caroço de algodão, é necessário usar moedor especial ou tratar a amostra (HCl p.a., concentrado), para facilitar a moagem.

5.5. Acondicionamento

Após a moagem, as amostras são acondicionadas em frascos com tampa, com capacidade aproximada de 150 mL, identificados com o número-código (Vogel et al., 1992; Ferreira & Gomes, 1995).

Alguns cuidados devem ser tomados nesta fase:

- a) utilizar embalagem limpa e seca, que garanta a ausência de interação entre o ambiente e a amostra;
- b) a embalagem deverá estar adequadamente rotulada;
- c) ideal é analisar as amostras logo após a moagem. Não sendo possível, armazenar em local fresco (de preferência refrigerado) e protegido da luz; e,
- d) é necessário lavar as embalagens destinadas ao armazenamento, levando-se em conta os tipos de deterrações a serem realizadas. No caso de sedimentar macromoléculas e microssólidos, além da lavagem com solução de detergente neutro, recomenda-se a lavagem com solução de HCl p.a., a 10% (v/v) e em seguida com água desionizada.

Ao final do acondicionamento, as amostras seguem para o laboratório, acondicionadas de formulário de registro, estando prontas para serem analisadas.

Quando se tratarem de amostras de fezes contendo marcadores, como, p. ex., cromo ou cobalto, procurar agrupar os tempos de coleta (um grupo: T₀ - Animal 1, T₀ - Animal 2, ...; outro grupo: T₁ - Animal 1, T₁ - Animal 2, ...; e etc.). Com isso, o que se pretende é minimizar contaminações entre as amostras, ou seja, processa-se primeiro as de baixa concentração, indo em direção às mais concentradas.

Em todo o trabalho de preparo de amostra é recomendável o uso de luvas e máscara.

6. Análise de Alimentos para Bovinos

A seguir são listados alguns dos procedimentos analíticos atualmente realizados no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste.

6.1. Determinação da matéria seca: (AOAC, 1990):

- a) Pré-secagem - em estufa calibrada a 65°C por 72 h, ou até peso constante.
- b) Moagem - em moinho de facas tipo Wiley, coletando a amostra que passou pela peneira de malha 40.
- c) Secagem a 105°C - transferir para pesa-filtro de 1 a 2 g de amostra moída, deixar em estufa calibrada a 105°C por aproximadamente 8 h ou até peso constante.

6.2. Determinação da proteína bruta: (AOAC, 1990):

Método micro - baseado na decomposição da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico e na quantificação do nitrogênio utilizando sistema de destilação por arraste a vapor (método proposto por Kjeldahl, em 1883).

6.3. Determinação da fibra em detergente neutro, FDN: (Van Soest, 1965, Goering & Van Soest, 1970):

Com solução de detergente neutra solubiliza-se o conteúdo celular com posto basicamente de proteínas solúveis, açúcares, lipídeos, nitrogênio não-proteico, pectina, amido e outros constituintes solúveis em água. A porcentagem dos constituintes da parede celular, parte da forragem insolúvel em detergente neutro, que é basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada, é obtida por diferença entre as pesagens da amostra antes e depois de sua solubilização.

6.4. Determinação da fibra em detergente ácido FDA, (Van Soest, 1965):

Utilizando-se de reagentes específicos, a amostra é tratada com uma solução denominada de detergente ácido (SDA), a qual solubiliza o conteúdo celular, a hemicelulose e a maior parte da proteína insolúvel; no entanto, o nitrogênio lignificado, a lignina solúvel em álcali, a lignina insolúvel, a celulose e a sílica, fazem parte do resíduo, denominado de fibra em detergente ácido (FDA).

6.5. Determinação da lignina (Van Soest & Wine, 1968):

Butler & Bailey (1973), referem-se à lignina com o um polímero 3-metóxi-fenil-propenol e 3-5-dimetóxi-fenil-propenol, ligados em proporções variadas e em sequência casualizada, originando assim grande variedade de produtos, o que dificulta a sua exata definição.

Por meio do resíduo lignocelulósico da fibra em detergente ácido, a lignina é oxidada e solubilizada por meio de uma solução de ácido sulfúrico a 72%.

6.6. Determinação das cinzas ou matéria mineral (Silva, 2002):

A amostra é calcinada em forno de mufla (550°C – 600°C) para eliminar a matéria orgânica e substâncias voláteis. Por diferença de pesagem, entre o peso do cadinho vazio e o peso do cadinho com o resíduo, encontra-se o teor das cinzas.

6.7. Determinação do extrato e tereó (Silva, 2002):

A determinação do extrato e tereó consiste na solubilização pelo éter das gorduras ou lipídeos. Esta solubilização é feita em extrator do tipo Soxhlet, utilizando-se o éter etílico com o solvente, em que a amostra é submetida ao refluxo contínuo, por um período de tempo capaz de extrair toda fração a solúvel no éter.

6.8. Determinação da digestibilidade "in vitro" da matéria seca (Tilley & Terry, 1963):

O alimento é incubado por 48 h, em que ocorrerá fermentação pelos microrganismos do líquido de rúmen, sob condições anaeróbicas, temperatura de 39 °C, poder tampão a pH de 6,9; após será submetido por mais 48 h a digestão enzimática da pepsina em meio ácido.

6.9. Determinação dos macros e micronutrientes:

Macros nutrientes: cálcio, magnésio, fósforo, potássio e enxofre

Micronutrientes: cobre, zinco, manganês e ferro

Utiliza-se o método de decomposição por via úmida que é mais utilizado para solubilização de material vegetal. As amostras são solubilizadas com ácidos oxidantes em mistura $HNO_3 + HClO_4$. A maioria das amostras é totalmente oxidada, deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise. As determinações analíticas do Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe são realizadas por espectrometria de absorção atômica por chama, o fósforo é determinado por espectrofotometria de absorção molecular em sistema de análise por injeção em fluxo contínuo, medindo-se a intensidade da cor produzida pelo complexo vanadomolibdofosfórico; o potássio é determinado por fotometria de chama; e o enxofre por turbidimetria do sulfato de bário (Malavolta, 1989).

7. Referências Bibliográficas

ANDRIGUETO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, A.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A.; BONA, A. **Nutrição Animal**. 2 ed. São Paulo, 1999, v1, 395p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC 15. ed. Virginia: Official Methods of Analysis. 1990. 2v. 1298p.

BALDWIN, R. L.; ALLINSON, M. J. Ruminal metabolism. **Journal Animal Science**, v.57, (Suppl.2), p.461-477, 1983.

BUTLER, G. W.; BAILEY, R. W. Chemistry and Biochemistry of Herbage. London: Academic Press, 1973. v.1. 416p.

BUXTON, D. R.; RUSSEL, J. R. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. **Crop Science**, v.28, p.553-558, 1988.

BRUNO, O. A.; CASTRO, H.; COMERÓN, E. A.; DIAZ, M. C.; GUAITA, S.; GAGGIOTTI, M. C.; ROMERO, L. A. **Técnicas de muestreo y parámetros de calidad de los recursos forrajeros**. Argentina: Publi, 1995. 14p. (INTA – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación, 56).

CHESON, A.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by ruminal microorganisms. In: Hobson, P. N. (Ed). **The ruminal microbial system**. New York: 1988. p.251-284.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). **Metodologias de análises**. Juiz de Fora, 1996.

FERREIRA, J. R.; GOMES, J. C. **Gerenciamento de Laboratórios de Análises Químicas**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1995. 385p.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin and its utilization as a standard to determine lignin concentration through a spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.7, p.3133-3139, 2001.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analysis** (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington: Agric. Handb. Forest Serv. U. S., 1970. v.379, p.1-20.

HATFIELD, R. D. Structural polysaccharides in forage and their degradability. **Agronomy Journal**, v.81, p. 39-46, 1989.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrate and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal Dairy Science**, v.74, p.3630-3644, 1991.

JONES JR., J. B.; STEYN, W. J. A. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In: WALSH, L. M.; BEATON, J. D. **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1973. p.249-270.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1703-1712, 1986.

KERLEY, M. S.; FAHEY, J.; GIUD, J. M.; IANNOITI, E. L. Effects of lignification, cellulose crystallinity and enzyme accessible space on the digestibility of plant cell wall carbohydrate by the ruminants. **Food Microstructure**, v.7, p.59-65, 1988.

KRISHNAMOORTHY, U.; MUSCATO, T. V.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Nitrogen Fractions in Selected Feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.2, p.217-225, 1982.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, v.57, p.347-358, 1995.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989. 201p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1996.

MOORE, K. J.; HATFIELD, R. D. Carbohydrate and Forage Quality. In: FAHEY, G. C. **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Fahey, 1994. p.229-280.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. **Journal Dairy Science**, v.74, p.3598-3629, 1991.

NOGUEIRA, A. R. de A.; MACHADO, P. L. O. de A.; SANTANA do CARMO, C. A. F. de; FERREIRA, J. R. **Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. 1. Coleta, acondicionamento e Preparo de Amostras. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, 1998. 72p. il.

PERSTORP ANALYTICAL – TECATOR. **Fiber determination, using the Fibertec. I & M Systems**. 1995. 8p (Application Note NA 304)

RUSSEL, J. B.; HESPELL, R. B. Microbial rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1153-1169, 1981.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). Viçosa: UFV, 2002. 235p

SGARBIERÍ, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: II. Carbohydrate and Protein Availability. **Journal Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.

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-CPPSE, 1999. 21p. (EMBRAPA-CPPSE. Boletim de Pesquisa, 4).

TIEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal Animal Science**, v.63, p.1649-1662, 1986.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. **J. Brit. Grassl. Soc.**, v.18, n.2, p.104-111, 1963.

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

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

VAN SOEST, P. J. Symposium on nutrition and forage and pastures. New chemical procedures for evaluating forages. **J. Anim. Sci.**, v.23, p.3, p.838-45, 1964.

VAN SOEST, P. J. Symposium on Factors Influencing the Voluntary Intake of Herbage by Ruminants: Voluntary Intake in Relation to Chemical Composition and Digestibility. **J. Anim. Sci.** v.24, p.3, p.834-43, 1965.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: Carbohydrate metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonsugar polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3583-97. 1991.

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

VOGEL, A.; JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel: análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 712p.