

***Gilberto Batista de Souza
Ana Rita de Araujo Nogueira
Lourdes Mitsuko Sumi
Luiz Alberto Rocha Batista***

Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido

**Método alternativo para a determinação
de fibra em detergente neutro e detergente
ácido**

*Gilberto Batista de Souza
Ana Rita de Araujo Nogueira
Lourdes Mitsuko Sumi
Luiz Alberto Rocha Batista*



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura e do Abastecimento***

Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa, N° 04

Exemplares desta publicação podem ser solicitados a:

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

Telefone (0xx16) 261-5611 Fax (0xx16) 261-5754

13560-970 São Carlos, SP

E-mail: sac@cnpse.embrapa.br

Tiragem desta edição: 250 exemplares

Comitê de Publicações:

Presidente: Edison Beno Pott

Membros: Armando de Andrade Rodrigues

Carlos Roberto de Souza Paino

Rui Machado

Sônia Borges de Alencar

Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido / Gilberto Batista de Souza ... [et al.].

São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999.

21p.; 21 cm. -- (Embrapa Pecuária Sudeste Boletim de Pesquisa, 4).

1. Fibra - Detergente neutro - Detergente ácido - Método - Determinação. I. Souza, Gilberto Batista de. II. Título. III. Série.

636.0824

Sumário

RESUMO	04
ABSTRACT	05
INTRODUÇÃO	06
MATERIAL E MÉTODOS	08
RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

RESUMO

Com o objetivo de aumentar a eficiência laboratorial e reduzir os custos, mantendo porém a qualidade analítica, foi desenvolvida esta simplificação do método para a determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), empregando menores quantidades de amostras e reagentes e produzindo menores quantidades de resíduos. O procedimento proposto, que emprega apenas 0,35 g de amostra e 35 mL de reagentes e permite a análise de 40 amostras por vez, foi utilizado na determinação de FDN e FDA em amostras de grãos e forragem e comparado com o procedimento original, que utiliza 0,5 g de amostra, 100 mL de reagentes e permite a realização de seis amostras por vez. Os resultados obtidos pelos dois procedimentos apresentaram-se altamente correlacionados ($r = 0,998$). Considerando-se o método original como variável independente, as equações de regressão foram: $y = 0,939 + 0,989x$ para FDN e $y = 0,280 + 1,028x$ para FDA. Amostras provenientes do programa colaborativo de controle de qualidade da Embrapa, que conta com a participação de 22 laboratórios, também foram analisadas pelo método proposto e submetidas ao programa, sendo que os resultados indicaram a boa correlação entre os dois procedimentos, viabilizando a recomendação do emprego do método.

ABSTRACT

A simplification of the method for determination of neutral and acid detergent fiber (NDF and ADF) was developed in order to increase laboratory efficiency and to reduce costs, maintaining analytical quality. The proposed approach employs smaller amounts of samples and reagents and produces smaller amounts of residues. This procedure uses only 0.35 g of sample and 35 mL of reagents, and allows the determination of 40 samples per batch. It was applied to samples such as grain and forage and compared to the original procedure, which uses 0.5 g of sample and 100 mL of reagents and allows the accomplishment of only six samples per batch. Results obtained by these two procedures presented high correlation coefficients ($r = 0.998$). Considering the original method as the independent variable, the regression equation for NDF was: $y = 0.939 + 0.989x$ and for ADF, $y = 0.280 + 1.028x$. Samples provided by an Embrapa collaborative quality control program, which is composed of 22 laboratories, were analyzed with the proposed method and submitted back to the program. The results indicated a good correlation between the two procedures; therefore its employment is recommended.

INTRODUÇÃO

O conteúdo celular, parte solúvel, é composto basicamente de proteínas solúveis, açúcares, lipídeos, nitrogênio não protéico, pectina, amido e outros constituintes solúveis em água (Goering & Van Soest, 1970).

O método de determinação da qualidade de forrageiras, proposto por Van Soest (1963) e descrito por Silva (1981), está baseado na obtenção dos componentes solúveis em reagentes específicos, conhecidos como detergente neutro e detergente ácido. Denomina-se como fibra em detergente neutro (FDN) a parede celular, a porção da forragem insolúvel em detergente neutro, que é basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina, proteína lignificada e sílica.

Por meio da fibra em detergente ácido (FDA) (Van Soest, 1967), é possível conhecer os constituintes menos solúveis da parede celular, sendo que posteriormente poderão ser determinados celulose, lignina, nitrogênio insolúvel em detergente ácido (que representa o nitrogênio lignificado), cinzas insolúveis em ácido e sílica. Basicamente, por meio de reagentes específicos, a amostra é tratada com uma solução denominada detergente ácido, a qual solubiliza o conteúdo celular, a hemicelulose e a maior parte da proteína insolúvel em solução detergente neutra. 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). O fracionamento dos constituintes da parede celular será finalizado a partir da solubilização da lignina, pelo método do KMnO_4 , e da celulose, com H_2SO_4 a 72% (Van Soest & Wine, 1968; Pereira & Rossi, 1995).

A proposta de Van Soest & Moore (1966) veio ao encontro de uma necessidade existente na análise de alimentos voltados à nutrição animal, em que até então era usada somente a determinação de fibra bruta, extrato etéreo, proteína bruta e extrato não nitrogenado, por meio do método de Weende (Silva, 1981). A fibra bruta é composta de celulose e parte da lignina insolúvel. O extrato não nitrogenado (ENN), calculado por diferença, não representa muito bem a fração de carboidratos solúveis ou digestíveis, por estar sujeito a erros derivados das outras análises.

Na Tabela 1, está representada uma comparação entre os métodos de Van Soest e de Weende, para análise da matéria orgânica de forragens.

Tabela 1. Comparação entre os métodos por Van Soest e por Weende na divisão da matéria orgânica de forrageiras.

Van Soest	Componentes da Forragem		Weende
	Nitrogenados	Não nitrogenados	
↑ Conteúdo celular (solúvel em detergente neutro) ↓	Proteína solúvel	Gorduras	Extrato etéreo
	N não proteico	Solúveis em água	↑
		Amido	
↑ Parede celular (fibra em detergente neutro) ↓		Pectina	
	Solúvel em detergente ácido	Proteína insolúvel em FDN	Extrato não nitrogenado
	Ligninocelulose (fibra em detergente ácido)	Hemicelulose	↓
		Lignina (solúvel em álcali)	
		Lignina (insolúvel em álcali)	
		Celulose	Fibra Bruta

Fonte: Van Soest & Moore (1966). In: Silva (1981).

Neste trabalho foi proposta uma simplificação dos procedimentos analíticos originais, sem alteração dos princípios do método.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

Para o desenvolvimento do procedimento foi necessária a utilização dos seguintes materiais:

- a) estufa de secagem e esterilização ($T = 105^{\circ}\text{C}$);
- b) cadinho filtrante de vidro borossilicato com placa porosa de vidro sinterizado, porosidade média grossa (100 a 160 μm);
- c) balança analítica com precisão de $\pm 0,1$ mg;
- d) dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica-gel azul;
- e) forno de mufla com controlador de temperatura;
- f) bloco digestor para 40 provas;
- g) tubos de digestão de 25×250 mm;
- h) sistema de vácuo.

2. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes químicos de grau analítico e água destilada e desionizada.

2.1. Fibra em Detergente Neutro

- 2.1.1 Etilenodiaminotetraacetato dissódico ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8$ $2\text{H}_2\text{O}$, EDTA sal dissódico).
- 2.1.2. Borato de sódio decaidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).
- 2.1.3. Lauril sulfato de sódio
- 2.1.4. Fosfato ácido de sódio (Na_2HPO_4)
- 2.1.5. Metoxietanol ou éter monometílico do etilenoglicol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$) ponto de ebulição de 124°C
- 2.1.6. Acetona, p.a
- 2.1.7. Sulfito de sódio anidro p.a. (Na_2SO_3).
- 2.1.8. Deca-hidronaftaleno, p.a. (decalina).
- 2.1.9. Solução $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ de uréia ($(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$): dissolver 480 g de uréia em 1 L de água destilada e desionizada.
- 2.1.10. Enzima alfa-amilase termoestável (Termamyl 120 L)

Solução Detergente Neutra. Inicialmente é necessário o preparo das seguintes soluções:

- a) pesar 18,61g de EDTA (item 2.1.1) e 6,81g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (item 2.1.2), transferir para bquer de 600 mL e dissolver em aproximadamente 400 mL de água desionizada sob leve aquecimento.
- b) pesar 30 g de lauril sulfato de sódio (item 2.1.3), transferir para bquer de 1000 mL e dissolver em aproximadamente 400 mL de água desionizada sob leve aquecimento.
- c) pesar 4,56 g de Na_2HPO_4 (item 2.1.4) e dissolver em aproximadamente 100 mL de de água desionizada sob leve aquecimento.

A seguir, transferir quantitativamente as soluções (a), (b) e (c) para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 10 mL de 2-metoxietanol (item 2.1.5) e completar o volume com água desionizada. O pH desta solução deverá estar entre 6,9 e 7,1. Caso a solução final esteja fora desta faixa, é necessária sua correção com solução de NaOH ou HCl 3,0 mol L⁻¹.

2.2. Fibra em Detergente Ácido

2.2.1. Brometo de cetil trimetilamônio (CTAB),
(C₁₆H₃₃N(CH₃)₃Br).

2.2.2. Acetona.

2.2.3. Deca-hidronaftaleno (decalina).

2.2.4. Ácido sulfúrico concentrado, 97-98% (H₂SO₄).

2.2.5. Solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹: pipetar 27,5 mL de H₂SO₄ concentrado, transferir para balão volumétrico de 1000 mL contendo aproximadamente 500 mL de água desionizada, homogeneizar, esperar resfriar e completar o volume. Antes de utilizar esta solução, recomenda-se proceder sua padronização com solução de Na₂CO₃ ou tris-hidroximetilaminometano, corrigindo sua concentração para 0,5 mol L⁻¹, se necessário.

Solução Detergente Ácida:

Em béquer de 500 mL, pesar 20,0 g de CTAB (item 2.2.1), dissolver em aproximadamente 400 mL de solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ (item 2.2.5), sob leve aquecimento. Transferir quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ (item 2.2.5).

3. Procedimento

3.1. Fibra em Detergente Neutro

Pesar em tubo de digestão 25 ´ 250 mm, 0,35 g de amostra seca a 65°C e triturada em moinho com peneira de malha 20 a 30 (peso A). Adicionar 35 mL de solução detergente neutra e 0,35 g de Na₂SO₃ (item 2.1.7), levar ao bloco digestor, colocar funis ou esferas de vidro (com diâmetro aproximado de 25 mm), para que os vapores se condensem, evitando a perda de solução, e deixar em ebulição (aproximadamente 125°C) por 60 minutos.

A seguir, transferir para cadinho filtrante, previamente mantido por uma hora a 105°C e pesado (peso B), e filtrar com auxílio de vácuo, lavando o resíduo aproximadamente três vezes com água fervente ou até não haver mais presença de espuma. Em seguida, lavar duas vezes com aproximadamente 40 mL de acetona (item 2.1.6). Levar os cadinhos contendo o resíduo para estufa de secagem calibrada a 105°C e, após aproximadamente oito horas ou até peso constante, retirá-los e transferi-los para dessecador contendo sílica-gel. Esperar atingir a temperatura ambiente e proceder a pesagem em balança analítica (peso C). A porcentagem dos constituintes da parede celular ou fibra em detergente neutro, com base na matéria seca a 65°C, é obtida por meio da diferença entre as pesagens, ou seja: $FDN (\%) = ((C - B) \cdot 100) / A$, sendo A o peso da amostra em gramas, B o peso do cadinho vazio e C o peso do cadinho mais o resíduo.

3.1.1. Observações

- i. A secagem da amostra a temperaturas superiores a 65°C pode produzir resultados incorretos devido à reação de

caramelização não enzimática (reação de Maillard), que pode resultar em aumentos significativos nos teores de lignina e fibra (Goering & Van Soest, 1970).

- ii. Utilizar a matéria seca a 105°C para corrigir os resultados com base em 100% da matéria seca.
- iii. Se houver formação de espuma durante a digestão, adicionar 1,0 mL de decalina como anti-espumante (item 2.1.8).
- iv. Para amostras com alto teor de amido, deverá ser feito tratamento preliminar, adicionando-se 10 mL de solução de uréia 8,0 mol L⁻¹ (item 2.1.9) e 0,2 mL de amilase termoestável (item 2.1.10) e incubar durante 5 min a 80-90°C ou 4 h a temperatura ambiente. A seguir, adicionar 35 mL da solução detergente neutra, levar à ebulição e, após 40 min, adicionar mais 0,2 mL de enzima, completar a digestão em até 60 min e seguir os procedimentos já descritos.
- v. Durante a filtragem, recomenda-se utilizar bastão de vidro para auxiliar na lavagem do resíduo.
- vi. Para limpeza dos cadinhos, estes poderão ser calcinados em forno de mufla por uma hora a 500°C, após o término das análises.

3.2. Fibras em Detergente Ácido

Pesar em tubo de digestão 25×250 mm, 0,35 g de amostra seca a 65°C e tritura em moinho com peneira de malha 20 a 30 (peso A). Adicionar 35 mL de solução detergente ácida, levar ao bloco digestor, colocar funis ou esferas de vidro (com diâmetro aproximado de 25 mm), para que os vapores se condensem, evitando a perda de solução e deixar em ebulição (aproximadamente 125°C) por 60 minutos.

Transferir para cadinho filtrante, previamente mantido por uma hora a 105°C e pesado (peso B), e filtrar com auxílio de vácuo, lavando o resíduo aproximadamente três vezes com água fervente, ou até não haver mais a presença de espuma. Em seguida, lavar duas vezes com acetona (item 2.2.2) (aproximadamente 40 mL).

Levar os cadinhos contendo o resíduo para estufa de secagem calibrada a 105°C e, após aproximadamente oito horas ou até peso constante, retirá-los e transferi-los para dessecador contendo sílica-gel. Esperar atingir a temperatura ambiente e proceder a pesagem em balança analítica (peso C).

A porcentagem da fibra em detergente ácido com base na matéria seca a 65°C é obtida por meio da diferença entre as pesagens, ou seja: $FDA (\%) = ((C-B) \times 100) / A$, sendo A o peso da amostra em gramas, B o peso do cadinho vazio e C o peso do cadinho mais o resíduo.

3.2.1. Observações

- i. Ver item 3.1.1. (i, ii, iii, v e vi).
- ii. O teor de nitrogênio na FDA é sugerido como método para correção da caramelização não-enzimática, devida ao superaquecimento. Os valores de FDA e lignina nas forragens secas podem ser corrigidos com base nos teores de nitrogênio contido na FDA (Van Soest, 1965; Goering & Van Soest, 1967).

3.3. Amostras

Inicialmente, amostras de farelo de trigo, silagem de milho, cana-de-açúcar (planta inteira), feno (capim-coastcross) e aveia (folhas), provenientes de estudos de nutrição animal em desenvolvimento na Embrapa Pecuária Sudeste, foram analisadas

pelo método descrito acima e também pelo método original proposto por Van Soest (1963), o qual utiliza 0,5 g de amostra, 100 mL de solução detergente neutra ou ácida e sistema digestor para seis provas (tipo Sebelin, equipado com controladores de temperatura e condensadores). Os resultados obtidos para os dois conjuntos de dados foram correlacionados (Tabela 1 e Figuras 1 e 2). O método aqui proposto foi então empregado em amostras de alfafa, aveia (grão), capim (mombaça, tifton, elefante e centenário), alfafa, palma (forrageira) e milho (grão), provenientes do Programa Colaborativo Interlaboratorial da Embrapa, que conta com a participação de 22 laboratórios. Os resultados foram submetidos à comparação com os obtidos pelos outros laboratórios participantes, que se utilizam do método originalmente proposto por Van Soest (1963).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método proposto vem sendo aplicado desde 1995 no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Os resultados obtidos em amostras de concentrado e de forrageiras, mostrados na Tabela 2, apresentam boa correlação com os resultados obtidos pelo método original, com pequena variabilidade entre as repetições. Nas Figuras 1 e 2 está representada a correlação linear entre os dois métodos para FDN, $y = 0,939 + 0,989x$, e para FDA, $y = 0,280 + 1,028x$, respectivamente. As amostras fornecidas pelo Programa Colaborativo Interlaboratorial (PCI) foram analisadas pelo método proposto e submetidas à avaliação junto ao programa. Os resultados, juntamente com as médias dos valores obtidos pelo programa, são apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 3 e 4.

Pode-se observar a concordância entre os resultados, exceto a grande variação apresentada nos valores obtidos para percentagem de FDN nas amostras de palma forrageira e milho em grão (respectivamente 7,96% e 5,56%), que provavelmente deve ter ocorrido devido à alta concentração de amido destas amostras e a não utilização, por alguns dos laboratórios participantes do programa, da enzima amilase, conforme é recomendado (Van Soest et al., 1991). Em trabalho anterior (Souza et al., 1995), estudos comparativos entre o método simplificado e a proposta original em amostras contendo altas concentrações de amido confirmaram a necessidade, na FDN, de incubação da amostra com uréia e utilização da enzima amilase para hidrólise do amido.

De maneira geral, os resultados sugerem a viabilidade da utilização do procedimento aqui proposto, que aumenta o rendimento, diminui custos com energia, reagentes e mão-de-obra especializada (homem/hora) e diminui a geração de resíduos laboratoriais, sem afetar a qualidade dos resultados.

Tabela 2. Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento original.

AMOSTRA	FDN (%)		FDA (%)	
	Proposto	Original	Proposto	Original
Silagem de milho	63,2±0,4*	62,6±0,3	37,4±0,6	36,7±1,0
Cana-de-açúcar (planta inteira)	49,8±0,4	50,2±0,7	30,8±0,6	29,6±1,4
Feno (capim-oastcross)	78,1±0,1	78,0±2,2	45,5±1,1	43,4±2,7
Farelo de trigo	40,5±0,5	40,2±0,6	13,0±1,5	12,2±2,6
Aveia (folhas)	42,2±0,3	41,2±1,4	26,4±0,6	25,7±0,2
<i>r**</i>	0,9982		0,9984	

*Desvio padrão relativo, em percentagem, referente a três determinações.

**Coeficiente de correlação entre os dois conjuntos de dados.

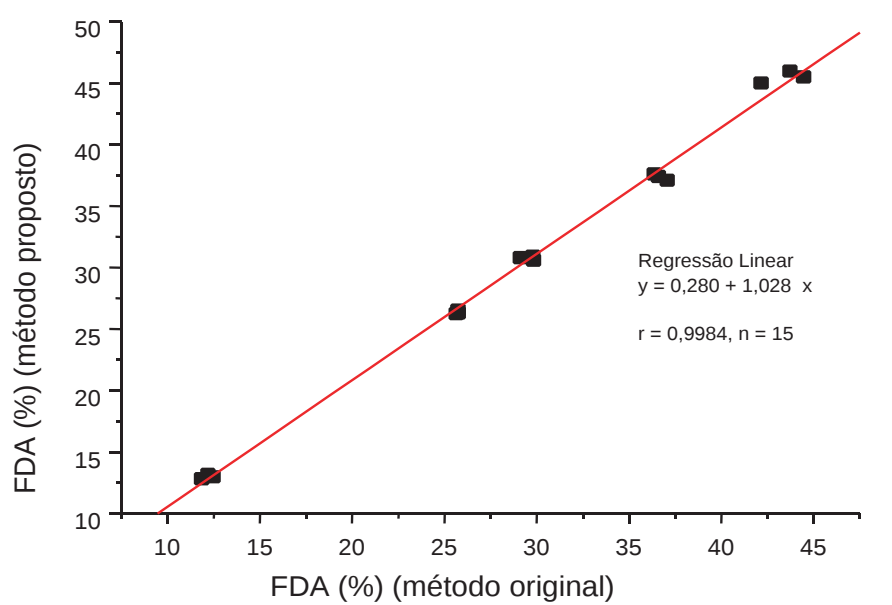


Figura 1. Comparação entre os métodos para a determinação da fibra em detergente neutro.

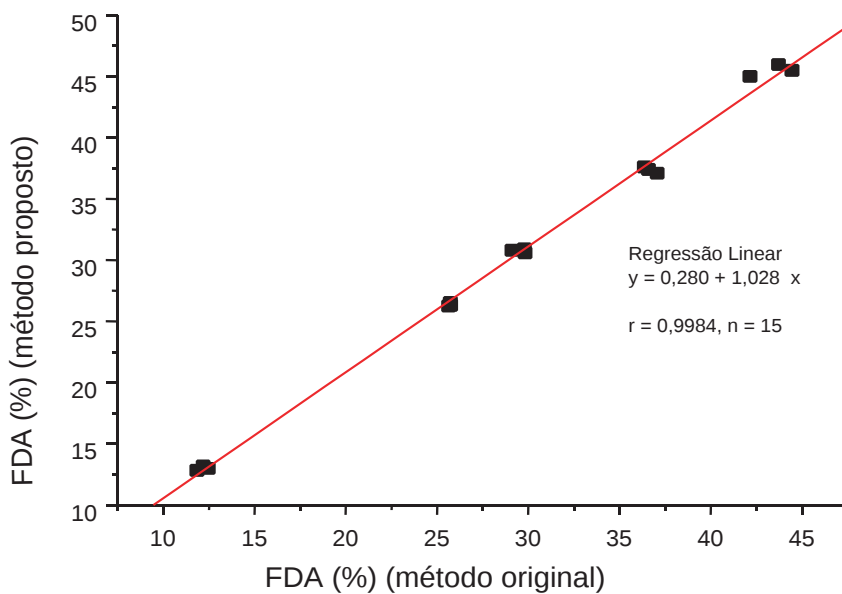


Figura 2. Comparação entre os métodos para a determinação da fibra em detergente ácido.

Tabela 3. Resultados obtidos com o procedimento proposto e pelo Programa Colaborativo Interlaboratorial da Embrapa (PCI).

Amostra	n ^o	FDN (%)		FDA (%)	
		Proposto	PCI	Proposto	PCI
Alfafa	1	34,2	36,8 ± 3,4*	25,9	26,7 ± 1,0
Aveia (grão)	2	31,8	33,9 ± 2,5	17,2	17,7 ± 1,3
Capim-mombaça	3	75,3	75,5 ± 3,1	44,0	43,0 ± 2,6
Alfafa	4	39,0	40,5 ± 2,2	30,8	30,3 ± 1,6
Palma forrageira	5	16,8	23,8 ± 8,0	13,4	13,0 ± 1,2
Capim-mombaça	6	75,9	75,9 ± 2,5	43,5	43,2 ± 0,8
Milho (grão)	7	11,9	16,1 ± 6,0	4,3	4,5 ± 0,8
Capim-tifton	8	80,3	80,5 ± 1,4	42,0	42,2 ± 0,6
Capim-elefante	9	72,3	71,4 ± 0,7	46,1	45,5 ± 1,1
Capim-centenário	10	73,2	72,5 ± 1,2	40,8	40,1 ± 0,9

* Desvio padrão relativo, em percentagem, referente aos resultados fornecidos pelos laboratórios participantes do PCI.

Fibra em Detergente Neutro

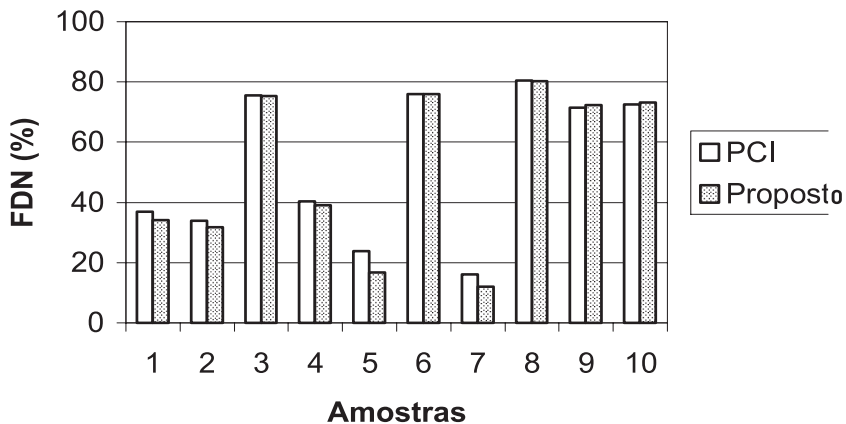


Figura 3. Comparação entre o método proposto e os resultados do programa colaborativo interlaboratorial da Embrapa (PCI).

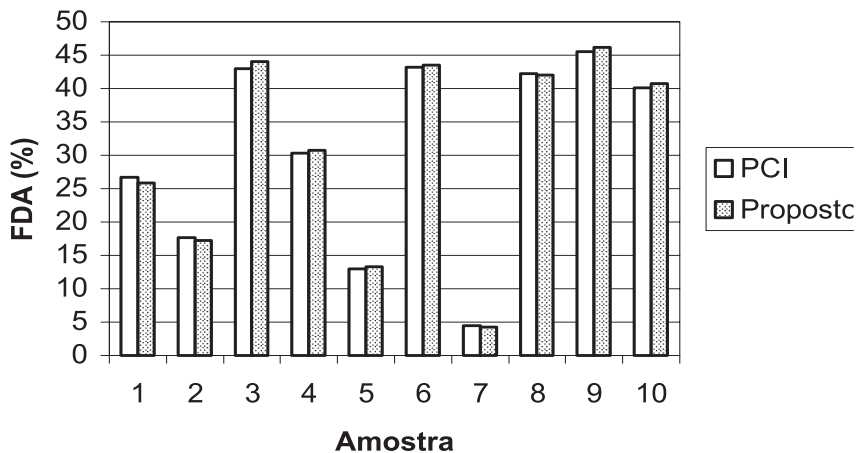


Figura 4. Comparação entre o método proposto e os resultados do programa colaborativo interlaboratorial da Embrapa (PCI).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

PEREIRA, J.R.A.; ROSSI Jr, P. **Manual Prático de Avaliação Nutricional de Alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 1995. 34p.

SOUZA, G.B.; SILVA, A.G.; NOGUEIRA, A.R.A.; BATISTA, L.A.R., Estudo comparativo de metodologias para determinação de fibra em detergente neutro em alimentos. ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 8, **Resumos....**Belo Horizonte: SBQ, 1995. p. 225., MG., 1995, p.275.

SILVA, D. J. **Análise de Alimentos. Métodos Químicos e Biológicos**. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1981. 166p.

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, p.829-835, 1963.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. *J. Anim. Sci.*, v. 26(1), p. 119-128. 1967.

VAN SOEST, P.J., MOORE, L.A. New chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 9., 1966, São Paulo, SP. **Proceedings...** São Paulo: , 1966. p. 783-789.

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

VAN SOEST, P.J., WINE, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **J. Assoc. Official Agr. Chem.** v.51, p.780-785.1968.