

ISSN 1806-9193

Dezembro, 2010

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

Documentos 306

Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos

Ruben Cassel Rodrigues

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior

Secretária- Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia

Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Suplentes: Beatriz Marti Emygdio e Isabel Helena Verneti Azambuja

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê

Revisão de texto: Marco de Oliveira Treptow

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica e Arte da capa: Sérgio Ilmar Vergara dos Santos

Foto da capa: Raquel Louzada

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 exemplares

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 Clima Temperado

Rodrigues, Ruben Cassel.

Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos / Ruben Cassel Rodrigues. – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

177 p. — (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 306).

ISSN 1516-8840

Química analítica – Análise química – Manual de laboratório. I. Título.
II. Série

CDD 543

© Embrapa 2010

Autor

Ruben Cassel Rodrigues

Zootecnista, Mestre, Pesquisador
da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
cassel.rodrigues@cpact.embrapa.br

Agradecimentos

Agradecemos especialmente aos laboratoristas Gilmar Barros dos Santos e Mauro Antonio Paz Pinto pela colaboração na consulta de literatura, digitação e comprovação laboratorial da eficiência dos métodos contidos neste trabalho.

Apresentação

Esta publicação tem como propósito apresentar procedimentos e metodologias de determinações químico-bromatológicas de alimentos destinados à alimentação animal. As informações são oriundas de consultas de literaturas nacionais e internacionais, disponíveis em livros e artigos científicos. As metodologias relatadas neste trabalho estão disponíveis em publicações em bibliotecas de instituições que realizam trabalhos no ramo de alimentação, bromatologia e nutrição animal. Em função da experiência dos autores desta publicação, as metodologias usuais do Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal da Embrapa Clima Temperado sofreram, ao longo dos anos, pequenas modificações nas análises bem como no manuseio de equipamentos. Observamos que as pequenas modificações nos métodos convencionais, indicados nas metodologias descritas, facilitaram as análises laboratoriais. Esta obra se destina a agrônomos, zootecnistas, veterinários, bem como a alunos de curso superior, técnicos e iniciantes em laboratório de bromatologia e nutrição animal.

Waldyr Stumpf Junior
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

MÉTODOS DE ANÁLISES BROMATOLÓGICAS DE ALIMENTOS.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL.....	19
1.2. IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO ANIMAL.....	19
1.3. ALIMENTO, NUTRIENTE E NUTRIENTE DIGESTÍVEL.....	20
2. MÉTODO DE WEENDE.....	21
2.1. PRINCÍPIO.....	21
2.2. COLETA DE AMOSTRAS QUE SE DESTINAM AO LABORATÓRIO.....	23
2.2.1. Preparo da amostra a ser analisada.....	24
2.3. DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA.....	25
2.3.1. Princípio.....	25
2.3.2. Pré-Secagem (Matéria Seca a 65°C).....	26
2.3.3. Matéria Seca Definitiva (Matéria Seca 105°C).....	29
2.3.4. Teor de umidade.....	32
TABELA 1. DETERMINAÇÃO DA % DE PRÉ-SECAGEM.....	35
TABELA 2. DETERMINAÇÃO DA % DE MATÉRIA SECAL.....	36
2.4. CINZAS OU MATÉRIA MINERAL.....	37

2.4.1. Princípio.....	37
2.4.2. Material necessário.....	38
2.4.3. Reagentes.....	38
2.4.4. Procedimento.....	38
2.4.5. Cálculo Final.....	39
2.4.6. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	39
TABELA 3. DETERMINAÇÃO DA CINZA E MATÉRIA ORGÂNICA....	40
2.5. EXTRATIVOS NÃO NITROGENADOS (ENN).....	40
2.5.1. Princípio.....	40
2.5.2. Fórmula.....	41
2.6. EXTRATO ETÉREO OU GORDURA.....	42
2.6.1. Princípio.....	42
2.6.2. Considerações gerais.....	42
TABELA 4. PORCENTAGEM DE CARBONO, HIDROGÊNIO E	
OXIGÊNIO NAS GORDURAS E NOS CARBOIDRATOS (AMIDO).....	42
2.6.3. Materiais/Equipamentos.....	43
2.6.4. Reagentes.....	43
2.6.5. Método a quente.....	43
2.6.6. Método a frio.....	43
2.6.7. Cuidados com os solventes.....	44
2.6.8. Procedimento.....	44
2.6.9. Fórmula.....	46
2.6.10. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	46
TABELA 5. DETERMINAÇÃO DA % DE EXTRATO ETÉREO.....	47
2.7. FIBRA BRUTA.....	48
2.7.1. Princípio.....	48
2.7.2. Materiais/equipamentos.....	48

2.7.3. Reagentes e soluções.....	49
2.7.4. Procedimento.....	50
2.7.5. Recomendações.....	50
2.7.6. Fórmula.....	51
2.7.7. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	51
TABELA 6. DETERMINAÇÃO DA % DE FIBRA BRUTA.....	52
2.8. CELULOSE.....	52
2.8.1. Princípio.....	52
2.8.2. Considerações gerais.....	52
2.8.3. Material necessário.....	53
2.8.4. Reagentes e Soluções.....	54
2.8.5. Procedimento.....	54
TABELA 7. DETERMINAÇÃO DA % DE CELULOSE.....	56
2.9. DETERMINAÇÃO DA ENERGIA BRUTA.....	56
2.9.1. Princípio.....	56
2.9.2. Considerações gerais.....	56
2.9.3. Material necessário.....	57
2.9.4. Reagentes e soluções.....	58
2.9.5. Procedimentos.....	58
2.9.6. Equivalente hidrotérmico da bomba calorimétrica.....	60
2.9.7. Determinação da Energia Bruta da Urina (amostra líquida).....	62
TABELA 8. DETERMINAÇÃO DA % DA ENERGIA BRUTA.....	64
2.10. DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL.....	65
2.10.1. Princípio.....	65
2.10.2. Material necessário.....	65
2.10.3. Reagentes e soluções.....	66

2.10.4. Digestão.....	74
2.10.5. Destilação.....	75
2.10.6. Titulação.....	76
2.10.7. Procedimento (Processo semimicro) A.O.A.C (1975).. <td>76</td>	76
2.10.8. Fórmula para cálculo da proteína.....	77
2.10.9. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	78
TABELA 9. DETERMINAÇÃO DA % DE NITROGÊNIO TOTAL.....	79
3. DETERMINAÇÃO DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO DA MATÉRIA SECA OU ORGÂNICA.....	79
3.1. PRINCÍPIO.....	79
3.2. MATERIAIS/EQUIPAMENTOS.....	80
3.3. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	81
3.3.1. Solução de ácido clorídrico 6 N.....	81
3.3.2. Solução de carbonato de sódio.....	81
3.3.3. Solução de pepsina 1:10.000 20% p/v.....	81
3.3.4. Solução de saliva artificial (volume da solução 500 ml).	82
3.3.5. Solução de Uréia 8% p/v.....	83
3.4. PROCEDIMENTO.....	83
3.5. DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA ORGÂNICA.....	84
3.5.1. Cálculo para DIVMO.....	84
3.6. RESULTADOS.....	85
3.6.1. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	85
TABELA 10. DETERMINAÇÃO DA % DE DIGESTIBILIDADE “IN VITRO” DA MATÉRIA SECA.....	86
4. DETERMINAÇÃO DE PH E ÁCIDO LÁTICO EM SILAGEM.....	86
4.1. PRINCÍPIO.....	86
4.2. DETERMINAÇÃO DE PH.....	87

4.2.1. Materiais/Equipamentos.....	87
4.2.2. Reagentes e soluções.....	87
4.2.3. Procedimento.....	88
4.3. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	88
4.3.1. Materiais/Equipamentos.....	88
4.3.2. Reagentes e soluções.....	88
4.3.3. Procedimento.....	91
TABELA 11. PADRÕES DE LEITURA.....	91
4.3.4. Resultados.....	93
5. O MÉTODO VAN SOEST NA DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE DE FORRAGEIRAS.....	94
TABELA 12. COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE VAN SOEST E WEENDE NA DIVISÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DE FORRAGEIRAS.....	96
5.1. DETERMINAÇÃO DA FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN).....	96
5.1.1. Princípio.....	96
5.1.2. Material e métodos.....	97
5.1.3. Reagentes e soluções.....	98
5.1.4. Procedimento.....	99
5.1.5. Fórmula Final para FDN.....	101
5.1.6. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	101
TABELA 13. DETERMINAÇÃO DA % DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO.....	102
5.2. DETERMINAÇÃO DE FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (FDA).....	102
5.2.1. Princípio.....	102
5.2.2. Material e métodos.....	103
5.2.3. Reagentes e soluções.....	103
5.2.4. Procedimento.....	104

5.2.5. Fórmula Final para FDA.....	105
5.2.6. Ajuste à base de 100 % da matéria seca.....	105
TABELA 14. DETERMINAÇÃO DA % DE FIBRA EM DETERGENTE	
ÁCIDO.....	106
5.3. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA EM DETERGENTE ACIDO (LDA).....	106
5.3.1. Princípio.....	106
5.3.2. Material necessário.....	107
5.3.3. Reagentes e soluções.....	107
5.3.4. Procedimento.....	108
5.3.5. Fórmula.....	109
5.3.6. Correção à base de 100 % da matéria seca.....	110
5.4. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA – MÉTODO DO PERMANGANATO.....	110
5.4.1. Material necessário.....	110
5.4.2. Reagentes e soluções.....	110
5.4.3. Procedimento.....	112
5.4.4. Resultados.....	113
5.4.5. Correção à base de 100 % da matéria seca.....	113
TABELA 15. DETERMINAÇÃO DA % DE LIGNINA ÁCIDA.....	114
6. VALOR RELATIVO NUTRICIONAL (V.R.N.).....	114
6.1. PRINCÍPIO.....	114
6.2. FÓRMULA.....	115
6.3. COMENTÁRIO.....	115
7. AVALIAÇÃO ENERGÉTICA DOS ALIMENTOS.....	115
7.1. INTRODUÇÃO.....	115
7.2. FÓRMULAS DE CÁLCULOS DAS ENERGIAS PARA SILAGENS.....	117
7.2.1. Nutrientes digestíveis totais (NDT).....	117
7.2.2. Digestibilidade da matéria seca (DMS).....	117

7.2.3. Energia digestível (ED).....	117
7.2.4. Energia metabolizável (EM).....	118
7.2.5. Fibra bruta (FB).....	118
7.2.6. Energia líquida (EL).....	119
7.3. FÓRMULAS DE CÁLCULOS DAS ENERGIAS PARA RAÇÃO ANIMAL..	120
7.3.1. Nutrientes digestíveis totais % (NDT).....	120
7.3.2. Energia líquida lactação (Mcal/kg).....	120
7.4. ENERGIA LÍQUIDA DE MANTENÇA (ELM) (Mcal/kg).....	120
7.5. ENERGIA LÍQUIDA DE GANHO (ELG) (Mcal/kg).....	121
8. MACRONUTRIENTES (N, P, K, Ca e Mg) EM PLANTAS E RESÍDUOS	
ORGÂNICOS.....	121
8.1. PRINCÍPIO.....	121
8.2. METODOLOGIA ADOTADA.....	121
8.2.1. Nitrogênio.....	122
8.2.2. Fósforo.....	122
8.2.3. Potássio.....	123
8.2.4. Cálcio e Magnésio.....	123
8.3. MATERIAL NECESSÁRIO.....	123
8.4. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	123
8.4.1. Solução de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 30%.....	124
8.4.2. Mistura de digestão.....	124
8.4.3. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 mol.....	124
8.4.4. Solução de indicador de ácido bórico.....	124
8.4.5. Solução de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 0,025 mol.....	125
8.4.6. Solução de molibdato de amônio.....	125
8.4.7. Solução de estrôncio a 0,3% em HCl 0,2 M.....	126
8.4.8. Solução de magnésio (1.200 mg L ⁻¹ de Mg ²⁺).....	127

8.4.9. Solução de padrão misto de P, K, Ca e Mg.....	127
8.5. PROCEDIMENTO.....	127
8.5.1. Digestão das amostras.....	127
TABELA 16. DILUIÇÕES PARA 50 ML DA DIGESTÃO DA AMOSTRA.....	128
TABELA 17. CONCENTRAÇÕES FINAIS.....	129
8.5.2. Determinação de nitrogênio (N).....	129
8.5.3. Determinação de fósforo (P).....	130
8.5.4. Determinação de potássio (K).....	132
8.5.5. Determinação de cálcio e magnésio (símbolo químico – Ca e Mg).....	134
9. MICRONUTRIENTES (Zn, Cu, Mn e Fe), ENXOFRE E SÓDIO EM PLANTAS E RESÍDUOS ORGÂNICOS.....	137
9.1. PRINCÍPIO.....	137
9.2. METODOLOGIA ADOTADA.....	137
9.3. MATERIAIS/EQUIPAMENTOS.....	139
9.4. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	140
9.4.1. Padrão de Cu de 1.000 mg L ⁻¹	140
9.4.2. Padrão de Zn de 1.000 mg L ⁻¹	140
9.4.3. Padrão de Fe, Mn e Na.....	140
9.4.4. Padrão diluído.....	141
9.4.5. BaCL ₂ -gelatina.....	141
9.5. PROCEDIMENTO.....	142
9.5.1. Digestão das amostras.....	142
TABELA 18. DILUIÇÕES PARA 20 ML DA DIGESTÃO DA AMOSTRA TABELA 19. CONCENTRAÇÕES FINAIS.....	143
9.5.2. Determinação de enxofre.....	144
9.5.3. Determinação do cobre, zinco, ferro, manganês e sódio	146

10. MÉTODOS TITULOMÉTRICOS.....	152
10.1. CONCENTRAÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES.....	152
10.1.1. Definições.....	152
10.1.2. Normalidade.....	157
10.1.3. Molaridade.....	157
10.1.4. Concentração.....	157
11. SEGURANÇA EM LABORATÓRIO QUÍMICO.....	159
11.1. PRINCÍPIO.....	159
11.2. RISCOS QUÍMICOS.....	159
11.2.1. Formas de agressão por produtos químicos.....	159
11.2.2. Limites de tolerância.....	160
11.2.3. Medidas básicas de segurança.....	160
12. SOLUÇÕES DE LIMPEZA.....	166
12.1. SOLUÇÃO SULFOCRÔNICA – PARA VIDRARIA.....	166
12.1.1. Reagentes.....	166
12.1.2. Procedimento.....	166
12.2. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 1% - PARA VIDRARIA.....	166
12.2.1. Reagentes.....	166
12.2.2. Procedimento.....	166
12.3. SOLUÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H₃PO₄) 10% V/V. – PARA DESTILADOR.....	167
12.3.1. Reagentes.....	167
12.3.2. Procedimento.....	167
13. ANÁLISES REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL.....	167
13.1. CÁLCULO DAS ENERGIAS ATRAVÉS DE EQUAÇÕES.....	168

14. REAGENTES USADOS NO LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E UTRICÃO ANIMAL.....	169
TABELA 20. TABELA DE ELEMENTOS QUÍMICOS IMPORTANTES....	172
TABELA 21. CONCENTRAÇÕES USUAIS DE DIVERSOS ÁCIDOS COMERCIAIS.....	173
TABELA 22. INDICADORES DE ÁCIDOS E BASES.....	174
15. REFERÊNCIAS.....	175

Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos

Ruben Cassel Rodrigues

1. Introdução

1.1. BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

Bromatologia ou química bromatológica é a ciência que estuda os alimentos. Sendo que a nutrição animal e alimentação animal são duas expressões corretamente usadas para significar o mesmo, mas em verdade, não se superpõem exatamente.

Segundo alguns autores, “nutrição é o processo de fornecer às células do organismo animal aquela porção do meio químico externo necessária para o funcionamento das muitas reações químicas metabólicas envolvidas no crescimento, manutenção, trabalho, produção e reprodução”. Então, nutrição envolveria a procura, ingestão e absorção dos alimentos químicos que servem como alimento, e o transporte desses alimentos até o interior das células, das formas física e química mais adequadas para assimilação e uso por aquelas células Phillipson, (1970).

1.2. IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

O desempenho de um animal é fruto da interação genótipo x meio ambiente. Ambos componentes são importantes. A produção de leite de vaca, por exemplo, depende em cerca de 25 a 40% do patrimônio genético do animal. O restante é devido aos fatores do meio ambiente,

dentre os quais a alimentação ocupa um lugar de destaque. É por este motivo que a alimentação é um fator capital na produtividade zootécnica. Ela se expressa de quatro maneiras:

a) Como fator de exaltação de capacidade produtiva dos animais;

A potencialidade genética só aparece na sua plenitude se for dada ao animal toda a condição favorável, especialmente alimentação.

b) Como fator indireto de melhoramento animal;

Evidentemente ao se dar oportunidade ao animal, através da alimentação, de mostrar o que ele pode produzir, automaticamente está sendo dada a oportunidade de ser escolhido para participar do processo de reprodução e de participar na formação e melhoramento da descendência.

c) Como fator sanitário e de prevenção de enfermidades;

É bastante claro que um animal bem nutrido oferecerá maior resistência à incidência de doenças, o que vem a se refletir na produtividade.

d) Como fator econômico da produção zootécnica;

O aspecto econômico em zootecnia não pode ser descurado. Há necessidade de se estabelecer um equilíbrio econômico desejável entre alimentação e custo. A alimentação, como componente de custo, é de vital importância pela sua participação. Na exploração avícola, por exemplo, pode ser responsável por 70 a 80% do custo.

1.3. ALIMENTO, NUTRIENTE E NUTRIENTE DIGESTÍVEL

Alimento é todo o material que, após ingestão pelos animais, é capaz de ser digerido, absorvido e utilizado, ou seja, possui valor nutricional para o animal.

Alimentos podem ser de origem vegetal ou animal, podendo seus principais grandes componentes ser assim distribuídos:

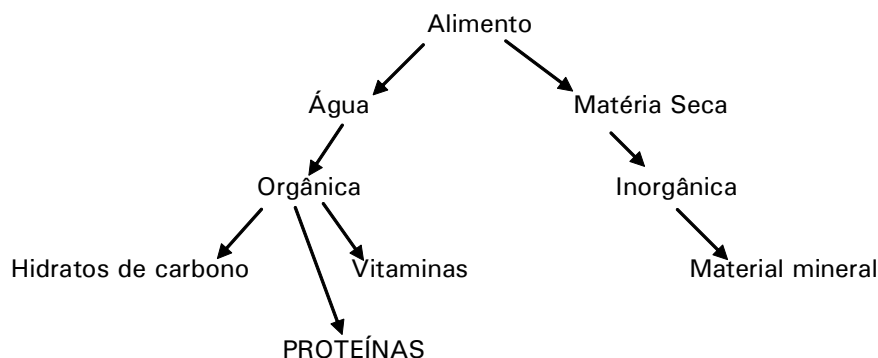


FIGURA 1- Componentes dos alimentos.

Nutriente, de acordo com a literatura, é todo constituinte do alimento, ou grupo de constituintes do alimento, com uma mesma composição química geral que participa na manutenção da vida. Assim hidratos de carbono, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais compreendem os grupos geralmente reconhecidos como nutrientes, embora ar e água possam da mesma forma, ser considerados também como nutrientes. Há certa tendência em esquecer estes dois, talvez pela sua universalidade e obviedade da sua necessidade, ou talvez porque se pense, sobre os mesmos, mais em termos do papel físico que químico. Mais modernamente este conceito de nutriente pode ser ampliado, a fim de incorporar substâncias que não são originárias diretamente do alimento, tais como vitaminas sintéticas, aminoácidos ou sais minerais preparados quimicamente.

Nutriente digestível diz respeito à porção do nutriente que é digerido e absorvido pelo organismo animal. Na prática este termo é aplicado somente às proteínas, hidratos de carbono e gorduras.

2. MÉTODO DE WEENDE

2.1. PRINCÍPIO

O esquema de Weende consiste num conjunto de determinações que caracterizam os grandes grupos de nutrientes, sem levar em conta os

nutrientes de “per se”. Em que pese as restrições ou imperfeições antes apontadas, esse esquema tem se mantido até hoje, e a ciência da nutrição nele tem se apoiado e desenvolvido suas pesquisas na área de nutrição animal. Estas determinações tornaram-se uma linguagem comum para químicos, nutricionistas, zootecnistas, fisiologistas e fabricantes de rações.

Em realidade, o esquema de Weende foi fundamental para o desenvolvimento do cálculo de rações, possivelmente por sua simplicidade e baixo custo, bem como pela concepção de criá-lo em função da nutrição dos animais, isto é, das suas macro-características. Embora, ao longo dos anos, cientistas venham tentando substituir o esquema de Weende por outras técnicas mais eficientes, sua aceitação é universal. Na década de 60, Van Soest, pesquisador norte-americano, propôs uma alternativa ao esquema de Weende, a qual obteve grande aceitação nos meios científicos.

Pode-se ter uma idéia de conjunto do Esquema de Weende no fluxograma em anexo.

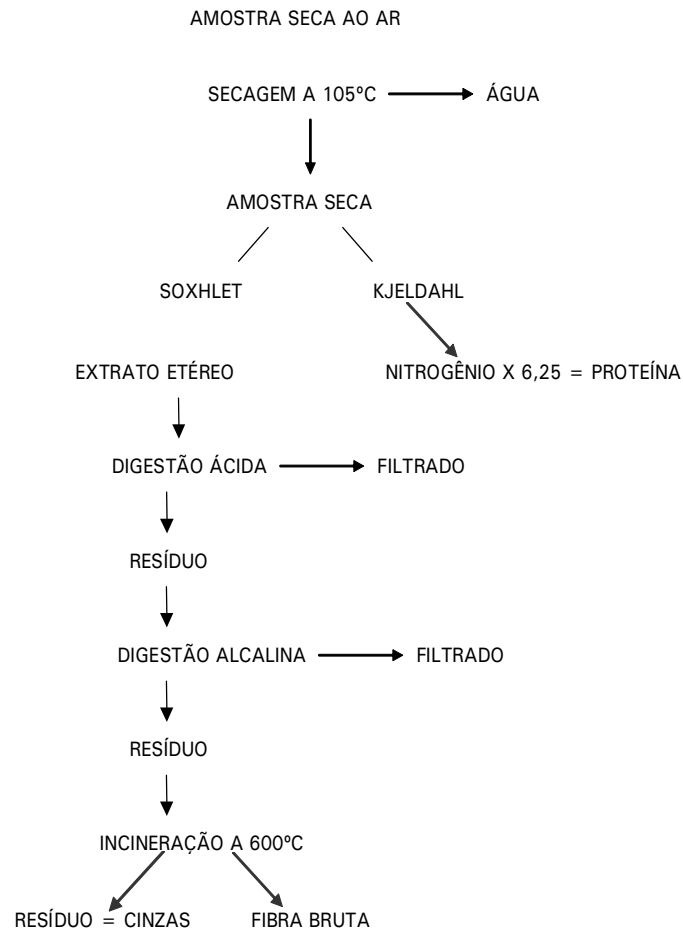


Figura 2- Esquema de Weende

2.2. COLETA DE AMOSTRAS QUE SE DESTINAM AO LABORATÓRIO

A técnica da coleta de amostras de alimentos concentrados e das forragens, visando a análise química, tem por finalidade obter amostra representativa da média do material a ser analisado. Torna-se essencial,

por tanto, todo o cuidado na coleta de tais amostras, sem o que se obtêm resultados viciados. Os erros cometidos durante a amostragem não poderão ser retificados ou compensados por mais cuidadosa que venham a ser as futuras análises.

Do material para estudo, devem-se retirar várias amostras parciais, colhidas em diversos pontos do local de interesse. Da amostra média de concentrado ou volumoso, depois de homogeneizada, podem ser tiradas amostras parciais antes que sejam enviadas ao laboratório. Após a coleta das amostras, elas devem ser colocadas em sacos plásticos ou de papel e transportadas imediatamente ao laboratório, a fim de não alterar a umidade do material, durante o transporte, principalmente de forragem fresca, e evitar ocorrência de fermentação. A perda de alguma umidade, durante o transporte, não terá grande importância desde que os resultados sejam dados apenas na matéria seca total.

A manipulação da amostra até o momento de sua análise deverá ser tão cuidadosa quanto possível, para evitar a ocorrência de alterações nos princípios nutritivos existentes. Tratando-se de forragens verdes, fezes, urina, etc., e quando as análises não forem processadas imediatamente, é necessário que as amostras sejam conservadas em congelador, entre -5°C e -10°C.

2.2.1. Preparo da amostra a ser analisada

a) Trituração prévia;

Na maioria dos casos, as amostras exigem uma trituração grosseira, antes de se proceder a qualquer análise. As forragens verdes, com raízes, tubérculos etc., deverão ser cortados inicialmente, com faca de metal inoxidável. Os grãos serão triturados grosseiramente, em moinhos adequados, enquanto as forragens ensiladas e as rações fareladas raramente necessitam de moagem ou trituração prévia.

b) Moagem final

É feita após a moagem ou trituração prévia. Amostras que na origem já apresentam com elevado teor de matéria seca, acima de 80%, quase

sempre podem sofrer a moagem final diretamente. A moagem final consiste em se triturar as amostras, de modo que se obtenha um pó bastante fino, usando-se moinhos dotados de peneiras de 20/30 “Mesh” (número de perfurações por polegada linear). Costuma-se aquecer a amostra na mesma temperatura de trabalho, antes da moagem, a fim de facilitar este processo.

Certas determinações químicas, tais como a do nitrogênio amínico, vitamina C, caroteno etc., devem ser feitas na amostra fresca, porque tais compostos apresentam perdas ou alterações durante o processo de secagem.

Após a moagem de cada amostra, a “câmara de moagem” do moinho deve ser cuidadosamente limpa com pincel e jatos de ar comprimido, bem como as demais partes do moinho, tendo-se que retirar a peneira e seu suporte. Isto se aplica, rigorosamente, quando o alvo das análises é macro e ou micro nutrientes, sendo, todavia, permitido um intervalo de cinco amostras nas demais situações. O mesmo se aplica com o redutor de Jones.

2.3. Determinação da matéria seca

2.3.1. Princípio

A determinação da matéria seca é o ponto de partida da análise de alimentos. É de grande importância, uma vez que a preservação do alimento pode depender do teor de umidade presente no material e, além disso, quando se compara o valor nutritivo de dois ou mais alimentos, temos que levar em consideração os respectivos teores de matéria seca. É o peso do material analisado livre de água. O conhecimento do percentual da matéria seca contido na amostra é importante, pois é com base nele que se estabelece o cálculo da dieta, já que o consumo do alimento pelos animais é expresso em kg de matéria seca/animal/dia.

Assim, quanto menor o percentual de matéria seca maior o consumo. No entanto, existe uma faixa de percentagem de matéria seca que é ideal tanto para o consumo, como para a produção e conservação dos alimentos que, no exemplo do milho, fica em torno de 28% a 35% de matéria seca.

Por outro lado, se desejamos comparar o resultado de análises em diferentes épocas, locais ou regiões, sempre faremos essa comparação em base de matéria seca, isto é, como se o alimento contivesse 100% da mesma. Convém ressaltar o fato de que somente os princípios nutritivos que integram a matéria seca são aproveitados pelo organismo animal com fins nutricionais.

A água contida nos alimentos encontra-se sob as seguintes formas: livre, de estrutura e de constituição.

Caso seja necessário conhecer a matéria seca com maior brevidade, deve-se pesar em torno de 10 g de amostra verde, submetendo-a à secagem a 105°C por 48 horas. Concluído o processo, deve-se deixar a amostra seca esfriar por no mínimo uma hora em dessecador, para, então, pesá-la.

No Laboratório de Nutrição Animal/Embrapa Clima Temperado, faz-se essa determinação pelo processo indireto bifásico, que consiste em duas fases: secagem prévia ou pré-secagem e a secagem definitiva.

2.3.2. Pré-Secagem (Matéria Seca a 65°C)

2.3.2.1. Princípio

Em geral, a pré-secagem é necessária quando a amostra possui alto teor de umidade ou baixa matéria seca; como as gramíneas, as silagens etc. Normalmente é feita em temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$ para evitar perda por volatilização ou alteração de outros nutrientes, principalmente compostos nitrogenados.

A operação de pré-secagem deve ser feita de preferência em estufas de ar forçado. O tempo de pré-secagem é variável, em média 72 horas, dependendo da umidade e da carga que se coloca na estufa, ou seja, o tempo necessário para que o material apresente peso constante, permitindo moagem perfeita. A perda de água que se verifica na pré-secagem tem de ser computada no cálculo da umidade total, portanto, o material antes de ser colocado na estufa deve ser pesado em balança adequada, com precisão de 0,1 g e, para isso, coloca-se o material em um

recipiente próprio, de peso previamente conhecido, denominado “tara”. É recomendável o uso de bandejas (22 x 16 x 6 cm), de tela bem fina ou sacos de papel perfurados, a fim de facilitar a entrada do ar quente e apressar a secagem. Para cada amostra deve-se fazer pelo menos duas determinações, paralelamente, para a comparação entre os pesos das amostras.

Ao término de dois a três dias, retira-se o material da estufa, deixando-o esfriar sobre balcões ou mesa do laboratório durante uma hora, ou seja, até que a umidade da amostra entre em equilíbrio com a umidade do ar, fazendo-se, a seguir, a pesagem. Chamamos esse procedimento de amostra seca ao ar (ASA). A seguir, faz-se a moagem final guardando a amostra em vidros fechados com tampas de polietileno, para a determinação das análises subsequentes.

Para análises mais aprimoradas como a de aminoácidos e de ácidos graxos, por exemplo, são necessários processos especiais de secagem para preservar a verdadeira forma química dos componentes. Dentre esses processos destacam-se a secagem a vácuo com ou sem elevação de temperatura e a secagem pelo frio (liofilização). A ocorrência de compostos voláteis, como a amônia, encontrada em silagens e cama de galinheiro, exige cuidados especiais durante a secagem da amostra; a pré-secagem não deve ser superior a 55°C, e, em muitos casos, as determinações devem ser feitas no material natural.

2.3.2.2. Material necessário

- a) Saco de papel perfurado (5 kg) ou bandejas metálicas;
- b) Estufa de secagem de ar forçado (Temperatura = 65°C);
- c) Estufa de esterilização (Temperatura = 105°C);
- d) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1 mg;
- e) Moinho Wiley (peneira de 1 mm) de facas;
- f) Redutor de Jones.

2.3.2.3. Procedimento

- a) Talar o saco de papel;

b) Pesar a amostra, cerca de 250 g por repetição (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);

Observação: Separar uma parte para determinação de pH, aproximadamente 9 g de amostra, caso seja necessário;

c) Colocar em estufa de ar forçado a 60°C + 5°C por 48 a 72 horas, a depender de estágio de secagem da mesma;

d) Retirar da estufa e deixar por 1 hora em contato com a temperatura ambiente;

e) Pesar e fazer as devidas anotações das amostras, anotando-se o peso em ficha adequada;

f) Submeter à moagem em moinho de facas. A amostra é recolhida em sacos plásticos ou vidro com tampa, previamente identificado com a especificação da mesma. Armazenar cerca de 50 g de amostra;

g) Reduzir a amostra para 50 – 100 g em redutor de Jones, caso seja necessário;

h) Limpar cuidadosamente o moinho e o redutor.

2.3.2.4. Utiliza-se a Fórmula

$$PS = \frac{PMPS}{PMV} \times 100$$

Onde:

PS = Pré-Secagem

PMPS = Peso do material pré-seco

PMV = Peso do material verde

2.3.3. Matéria Seca Definitiva (Matéria Seca 105°C)

2.3.3.1. Princípio

A matéria seca definitiva é usada para amostras que foram submetidas à pré-secagem ou para amostras que contêm mais de 80% de matéria seca, rações fareladas, grãos de cereais etc. Para tal processo, pesa-se de 2,000 a 3,000g de amostra seca ao ar e triturada, em cápsula de porcelana previamente secas e pesada na “tara”. Na prática, quando se trabalha com grandes quantidades de amostras, deixamos os cadinhos de porcelana, durante toda a noite na estufa, dispensando, desse modo, a verificação de constância de peso e após procede-se à secagem em estufa a 105°C, durante quatro horas Lenkeit; Becker, (1956). A seguir, retira-se os cadinhos da estufa e coloca-os em um dessecador por uma hora aproximadamente, até que a temperatura deles se iguale com a temperatura ambiente; e pesa-se novamente. É necessária uma balança analítica de aproximadamente 0,1 mg. A perda de peso representa a umidade bruta, ou seja, todos componentes voláteis à temperatura de 105°C. Os resultados são apresentados em porcentagem.

Rações ricas em gordura podem aumentar de peso durante uma secagem demorada, uma vez que poderá haver fixação de oxigênio, durante o processo. Em tais casos, torna-se necessário usar processos especiais de secagem. As silagens e outras forragens submetidas à fermentação podem sofrer perdas de determinadas substâncias durante a secagem como ácidos orgânicos, amoníacos, etc. Com estes materiais, o teor exato de matéria seca pode ser obtido pela determinação desses componentes voláteis ou, o que é mais prático, por secagem a vácuo.

2.3.3.2 Verificação da constância de peso

Esse método é adotado quando os materiais a serem utilizados (cadinhos de porcelana, cápsulas metálicas etc.) não estão devidamente secos. Procede-se da seguinte maneira: repete-se a secagem, voltando com o cadinho de porcelana ou cápsula metálica à estufa a 105°C por mais uma ou duas horas, deixando-se esfriar em dessecador, realizando novas pesagens, até permanecer com peso constante. A diferença de peso entre

as pesagens não deve ser maior que 1 %. Se ocorrer uma variação maior de peso, significa que o material não está devidamente seco. Chama-se a esta operação de verificação da constância de peso.

2.3.3.3. Material necessário

- a) Cápsula metálica ou porcelana (cadinho);
- b) Estufa de secagem e esterilização (Temperatura = 105°C);
- c) Dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica gel azul;
- d) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1 mg;
- e) Sacos plásticos ou vidros com tampa;
- f) Bandeja de alumínio.

2.3.3.4. Procedimento

- a) Colocam-se as cápsulas metálicas ou cadinhos de porcelana em estufa para secar durante 12 horas, a uma temperatura de 105°C;
- b) Retiram-se as cápsulas metálicas ou cadinhos de porcelana da estufa e coloca-se em dessecador, para esfriar por 1 hora. Quando se trabalha com uma quantidade superior a 20 cadinhos, deve-se deixar esfriar por mais alguns minutos, para que haja uma maior estabilização do peso;
- c) Retiram-se as cápsulas metálicas ou cadinhos de porcelanas do dessecador (uma a uma), tara-se e anota-se o peso em ficha adequada;
- d) Pesa-se de 2,500 g a 2,510 g da amostra (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);

e) Coloca-se em estufa para secar a 105°C por 4 horas (podendo se deixar de um dia para o outro);

f) Retira-se da estufa a cápsula metálica ou porcelana (cadinho), e coloca-se em dessecador para esfriar durante 1 hora;

g) Pesam-se as amostras, anotando-se o peso em ficha adequada.

2.3.3.5. Cálculo final

2.3.3.5.1 Utiliza-se a Fórmula

$$MS\% = \frac{PAS \ (ASE)}{PAN \ (ASA)} \times 100$$

Onde:

PAS = Peso da amostra seca (ASE)

PAN = Peso da amostra natural ou úmida (ASA)

2.3.3.6. Matéria Seca Total (105°C)

$$\%MS_{total} = \frac{\%MS(60 + 5^{\circ}C) \times \%MS(105^{\circ}C)}{100}$$

2.3.3.7. Ajuste à base de 100 % da matéria seca a 105°C

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de resultado da análise a ser corrigida

%MS (105°C) = % de matéria seca na amostra

2.3.4. Teor de umidade

2.3.4.1. Determinação da umidade de plantas e resíduos orgânicos

2.3.4.1.1 Princípio

O teor de umidade em plantas, adubos orgânicos, compostos e resíduos de origem orgânica é geralmente determinado em relação à temperatura de secagem de 65-75°C, até atingir peso constante.

A esta temperatura as reações de natureza biológica cessam e o material pode ser mantido seco por período indeterminado, quando protegido da umidade.

2.3.4.1.2 Material necessário

- a) Estufa com circulação de ar forçado, com temperatura regulável;
- b) Cápsula de porcelana ou aço inox;
- c) Balança com sensibilidade de 0,01 g.

2.3.4.1.3 Procedimento

- a) Pesar de 40 a 50 g de material úmido e homogeneizado e colocar em recipiente de secagem (tarar o recipiente de secagem, limpo e seco) (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- b) Manter a 65-75°C com circulação de ar forçado por 24 a 48 horas (ou até não se observar mudança de peso com aumento do tempo de secagem);
- c) Pesar o material seco;
- d) Após a pesagem, o material pode ser moído para as análises químicas.

2.3.4.1.4 Cálculos

- a) Teor de umidade em base úmida

$$\%Teor(umidade) = \frac{peso(úmido) - peso(seco)}{peso(úmido)} \times 100$$

- b) Expressar o resultado com um dígito decimal (em % mm⁻¹).

2.3.4.2. Determinação da umidade do solo

2.3.4.2.1. Princípio

A umidade do solo é determinada secando-se o mesmo em estufa a 105°C, por duas horas, sendo expressa em base de peso. Esta determinação é utilizada para calcular o fator de correção nas análises para levantamento e classificação de solos.

A diferença no teor de umidade de solos minerais secos a baixa temperatura e a 105°C é de aproximadamente 1 a 2%.

2.3.4.2.2 Material necessário

- a) Cápsulas metálicas com capacidade de 100-200g;
b) Balança com sensibilidade de 0,01 g.

2.3.4.2.3 Procedimento

- a) Pesar 100 a 150 g de solo úmido em cápsula metálica; tarar e identificar as cápsulas secas (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal - LBNA/Embrapa Clima Temperado);
b) Secar a 105°C por 2 horas (de preferência em estufa com circulação de ar);
c) Retirar da estufa as cápsulas metálicas e colocar em dessecador para esfriar durante 1 hora;

d) Pesar as amostras, anotando-se o peso em ficha adequada.

2.3.4.2.4 Cálculos

a) Teor de umidade em base úmida;

$$Umidade(\%) = \frac{PSU - PSS \times 100}{PSS}$$

Onde:

Umidade (%) = Teor de umidade

PSU = Peso do solo úmido

PSS = Peso do solo seco

b) Expressar o resultado com um dígito decimal (em % mm^{-1});

c) *ASA = Amostra seca ao ar (65°C) – Pré-secagem.

A Tabela 1 apresenta modelo de ficha para apresentação de resultados de pré-secagem.

A Tabela 2 apresenta modelo de ficha para apresentação de resultados de matéria seca definitiva.

TABELA 1. Determinação da % de Pré-Secagem

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE PRÉ-SECAGEM A 65°C

Nº do Projeto:

Responsável:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Tara (g)	Tara + Amostra verde (g)	Tara + ASA (g)	Amostra Verde (g)	ASA* (g)	ASA (%)	ASA 0

*ASA = Amostra seca ao ar (65°C) – Pré-secagem

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO
LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL
DETERMINAÇÃO DA % DE MATÉRIA SECA A 105°C

Responsável:

Nº do Lote:

[illegible]

2.4. CINZAS OU MATÉRIA MINERAL

2.4.1. Princípio

Cinza ou matéria mineral é o produto que se obtém após o aquecimento de uma amostra, a temperatura de 500 à 600°C, ou seja, até o aquecimento ao rubro, porém não superior a 600°C, durante 4 horas ou até a combustão total da matéria orgânica.

A determinação da cinza fornece apenas uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais. Fick (1976).

A cinza, nos alimentos, tem o significado nutricional quase nulo; contém, principalmente, os seguintes cátions: cálcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cobre, cobalto e alumínio; e ânions: sulfato, cloreto, silicato, fosfato, etc. Na verdade só foi incluída no Esquema de Weende para poder-se calcular os extrativos não nitrogenados (ENN).

Realiza-se a determinação da cinza pelo método de incineração simples.

Pode-se fazer a calcinação do cadinho em bico de bunsen, cobrindo-se, antes, a amostra com glicerina líquida. Esse procedimento objetiva evitar a produção de muita fumaça no início da calcinação. Entretanto, todo o processo pode ser feito no próprio forno mufla, desde que se tenha o cuidado de colocar o cadinho com a amostra no forno mufla frio, aumentando o aquecimento lentamente, até 500-600°C.

Se a temperatura do forno mufla for além de 600°C, alguns cátions e ânions serão parcialmente ou totalmente perdidos por volatilização.

Outro aspecto importante a ser salientado é que o peso da amostra a ser calcinada está correlacionado com a quantidade de elemento mineral a ser pesquisado.

Quando mede-se quantitativamente um elemento mineral que está presente na amostra em pequenas quantidades, torna-se necessário que se faça a calcinação de amostra mais representativa ou a de maior peso.

2.4.2. Material necessário

- a) Cápsula de porcelana;
- b) Forno de mufla com controlador de temperatura;
- c) Dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica gel azul;
- d) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1 mg;
- e) Bandeja de alumínio;
- f) Pinças.

2.4.3. Reagentes

- a) Ácido nítrico concentrado (HNO_3);
- b) Nitrato de amônio (NH_4NO_3).

2.4.4. Procedimento

- a) Colocar os cadinhos de porcelana em forno mufla para queimar por quinze minutos. Para secagem dos cadinhos a temperatura de 550°C , retira-se do forno mufla e coloca-se no dessecador para resfriar, durante 1 hora;
- b) Retirar os cadinhos do dessecador (um a um) e tarar, anotando o peso em ficha adequada;
- c) Pesar, a seguir, de 1 a 3 g da amostra (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- d) Proceder à incineração durante 4 horas, a 550°C , até obter a cor cinza clara. Após esse tempo, caso persista a cor escura das cinzas, colocar de 3-5 gotas de HCO_3 ou alguns cristais de nitrato de amônio dentro do cadinho e levá-lo novamente ao forno mufla, por mais 1 hora. Ao incinerar as amostras, colocar à temperatura inicial em 200°C ; após 1 hora

aumentar a temperatura para 550°C. Observa-se que a temperatura inicial de 200°C é adotada para evitar a queima brusca do material e, consequentemente, as perdas (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);

Observação:

Os cadinhos de vidro devem ser aquecidos gradativamente (subir à temperatura de 100 em 100°C) para evitar que se danifiquem, até atingirem 550°C;

e) Retirar as amostras do forno mufla e colocá-las em dessecador para resfriar por 1 hora;

f) Pesar as amostras, anotando-se o peso em ficha adequada.

2.4.5. Cálculo Final

2.4.5.1. Utiliza-se a Fórmula

$$\%C / N = \frac{\text{Peso}(\text{cinza})}{\text{Peso}(\text{amostra})} \times 100$$

Para se determinar a matéria orgânica utiliza-se a fórmula:

$$MO = 100 - \%cinza$$

2.4.6. Ajuste à base de 100 % da matéria seca

$$\text{Base seca} = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de matéria orgânica na amostra

%MS (105°C) = % de matéria seca na amostra

Ver a seguir, na Tabela 3, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 3. Determinação da Cinza e Matéria Orgânica

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE MATÉRIA MINERAL (Cinza) e M. ORGÂNICA

Nº do Projeto:

Responsável:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Identificação	Nº Cápsula	Peso Cápsula	Peso Amostra	Cápsula Cinza	% Cinza	MO Cinza	MO MO

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca 105°C

2.5. EXTRATIVOS NÃO NITROGENADOS (ENN)

2.5.1. Princípio

Para obter-se a percentagem de ENN, somam-se as cinco determinações laboratoriais do Esquema de Weende: matéria seca a 65°C (MS), extrato etéreo (EE), proteína bruta N x 6,25 (PB), fibra bruta (FB) e matéria mineral (MM). Este total é subtraído de 100.

Estão contidos nos ENN, os açúcares, amido, dextrinas, glicogênio, hemiceluloses e, variavelmente, a lignina. Essa fração do esquema de Weende corresponde predominantemente aos hidratos de carbono mais digestíveis ou, como se diz comumente, “hidratos de carbono solúveis”.

Como se pode perceber, os ENN compreendem várias substâncias, variáveis em suas quantidades, mas que estão unidas entre si por serem fontes não específicas de energia e de alta digestibilidade.

Além dessa variação entre seus componentes, a determinação dos ENN, por exemplo, pode ser feita por cálculo, situação em que evitam-se todas as imprecisões pessoais e imperfeições relacionadas às outras determinações laboratoriais, as quais acumulam todos os erros por ventura cometidos durante a execução das análises.

Consideram-se, portanto, os ENN como uma medida útil, tendo-se em vista que sua imprecisão é considerada pequena e sua determinação muito mais rápida e simples que a determinação dos vários açúcares e polissacarídeos solúveis.

2.5.2. Fórmula

$$\%ENN = MS + EE + PB + FB + MM - 100$$

Onde:

%ENN = Percentagem de extrativo não nitrogenado

MS = Matéria seca a 65°C

EE = Extrato etéreo

PB = Proteína bruta

FB = Fibra bruta

MM = Matéria mineral (cinza)

2.6. EXTRATO ETÉREO OU GORDURA

2.6.1. Princípio

A determinação do extrato etéreo (EE) consiste em submeter a amostra seca do material à extração com éter sulfúrico ou éter de petróleo, partindo do princípio da solubilidade dos lipídios. Esse trabalho é desenvolvido num aparelho para extração de gordura e acessórios, tipo “Goldfisch”. O éter usado no processo é aquecido até tornar-se volátil e, ao condensar-se, circula sobre a amostra em análise, arrastando toda a fração gordurosa e demais substâncias solúveis em éter. O éter é recuperado em outro recipiente, enquanto a gordura extraída é calculada por diferença de peso.

2.6.2. Considerações gerais

As gorduras ou lipídeos são produtos naturais de origem animal ou vegetal nos quais predominam ésteres de ácidos graxos superiores. São substâncias insolúveis em água, mas solúveis no éter, clorofórmio, benzeno e outros solventes orgânicos chamados de extratores.

O grupo de substâncias que compõem o extrato etéreo é formado pelos lipídios e outros compostos intimamente ligados ou associados, tais como: fosfatídeos, esteróis (colesterol), clorofila, óleos voláteis, resina, etc.

A gordura constitui a fração mais energética dos alimentos e, como os carboidratos, é composta de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O). Entretanto a proporção dos dois primeiros (C e H) é bem maior nas gorduras que nos carboidratos, como indica a tabela abaixo, em índices percentuais.

TABELA 4. Porcentagem de carbono, hidrogênio e oxigênio nas gorduras e nos carboidratos (amido).

	Carbono	Hidrogênio	Oxigênio
Gordura	77	12	11
Amido	44	06	50

Fonte: Maynard; Loosli (1974).

Como foi visto antes, as gorduras são bem mais energéticas que os hidratos de carbono e as proteínas, de modo que é fácil de entender que sua presença no alimento influencia seu valor energético de maneira marcante.

O valor alimentar do extrato etéreo não é constante: considera-se que um grama de gordura produz 9,35 Kcal de energia bruta, quando medido na bomba calorimétrica, o que corresponde, aproximadamente, a 9 Kcal de energia metabolizável. Os alimentos com maior teor de gordura têm valores mais altos de NDT, pelo fato de a gordura fornecer 2,25 vezes mais energia que os carboidratos.

2.6.3. Materiais/Equipamentos

- a) Extrator e acessórios, tipo “Goldfisch”;
- b) Papel de filtro tipo 10 ou equivalente, com diâmetro de 12,5 cm;
- c) Dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica gel azul;
- d) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1 mg (com 4 dígitos após a vírgula).

2.6.4. Reagentes

- a) Éter de petróleo p.a. (faixa de destilação de 30-60°C).

2.6.5. Método a quente

A extração é feita com a temperatura mais elevada, usando, neste caso, éter de petróleo cujo ponto de ebulição esteja entre 40-65°C. A extração é feita entre 4 a 6 horas em extrator tipo “Goldfisch”. No laboratório da Embrapa Clima Temperado, utiliza-se o método a quente com extrator tipo “Goldfisch”.

2.6.6. Método a frio

É realizado no extrator “Soxhlet” e utiliza-se o éter sulfúrico como solvente, cujo ponto de ebulição é de 35°C, aproximadamente. A extração

é feita em vinte e quatro horas, aproximadamente.

2.6.7. Cuidados com os solventes

Em qualquer metodologia usada, deve-se ter o máximo de cuidado com os reagentes. Frequentemente, certas impurezas ocorrem nos solventes como: água, álcool e oxidantes (peróxidos) que acarretam erros nas análises. Assim, deve-se fazer uso de reagentes p.a., apenas.

2.6.8. Procedimento

- a) Pesar de 2 a 3 gramas de amostra em um cadinho de porcelana ou pesa-filtro e colocar em estufa a 105 °C, durante 3 horas (secagem definitiva). Em certos casos, torna-se recomendável um processo especial de secagem, em estufa a vácuo (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal - LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- b) Após esfriar a amostra, colocar em dessecador por trinta minutos; faz-se um embrulho com papel de filtro em forma de cartucho, e pesa-se a amostra contida no cadinho de porcelana ou no pesa-filtro;
- c) Tarar os béquers, tendo cuidado para não tocar neles com as mãos, pois absorvem gordura, alterando o resultado final da amostra;
- d) Numerar o papel de filtro à lápis (papel de filtro em formato de cartucho, fechado em uma das extremidades)(modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- e) Anotar o número do béquer onde foi colocado cada papel de filtro (cartucho de papel)(modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- f) Proceder conforme exemplos a seguir;

Papel	Béquer
01	01
02	02
03	16
04	12

- g) Tarar o balão (recipiente apropriado do aparelho) com o cartucho de papel de filtro e o béquer (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- h) Pesar 1 grama da amostra em papel de filtro e colocar no suporte de vidro (balão), fixando-o na presilha da entrada do condensador do aparelho de extração(modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- i) Adicionar de trinta a quarenta mililitro de éter de petróleo no béquer previamente tarado, encaixando-o com o anel de rosca sob o condensador (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);

Observação:

Caso seja necessário repor o éter de petróleo, em caso de evaporação, deve-se no máximo, adicionar 2 vezes o éter de petróleo; se isto ocorrer mais de 2 vezes, deve-se repetir a amostra novamente para fazer lavagem do material utilizado segue-se o mesmo processo inicial. Toda vez que o béquer for retirado do aparelho, deve-se colocar a tampa protetora em cima da chapa aquecedora, para evitar explosão e acidentes com queimadura. Não devem ser deixados frascos com éter próximos ao aparelho quando estiver sendo feita a extração de extrato etéreo.

- j) Destravar o disco aquecedor, fazendo-o tocar na base do béquer. Ligar a água de circulação dos condensadores;
- k) Ligar a resistência do disco, na posição HI, e aguardar até que a destilação/condensação do éter inicie; neste ponto posicionar o controle na graduação 6. O processo estará concluído após 4 a 6 horas. Devem-se fazer verificações ocasionais no decorrer deste período. Verificar se não há evaporação de éter de petróleo durante a fervura e condensação. Após começar a ferver, deixar por mais 2 horas no aparelho (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- l) Desligar o aquecimento, baixar o disco (posição inicial) e remover o béquer e o suporte com a amostra. Colocar o tubo coletor de éter na presilha da entrada do condensador;

- m) Reconectar o béquer e suspender o disco até o contato. Religar o aquecimento na posição 6. Antes que o éter do béquer evapore, retirá-lo e verter o solvente, recuperando-o em recipiente próprio;
- n) Adaptar o suporte para o béquer, dispondo-o em posição inclinada sobre o disco aquecedor desligado, a fim de evaporar o éter remanescente;
- o) Completar a secagem do béquer contendo a gordura extraída, submetendo a secagem em estufa a 105°C durante trinta minutos (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- p) Resfriar em dessecador por trinta minutos e pesar. A diferença entre este último peso e o béquer vazio (tara) corresponde ao peso da gordura extraída.

2.6.9. Fórmula

$$\%Gordura = \frac{PC + GE - PCV}{PA} \times 100$$

Onde:

PC = Peso do cadinho

GE = Gordura extraída

PCV = Peso do cadinho vazio

PA = Peso da Amostra

Observação: Após, é necessário corrigir pela Matéria Seca a 105°C

Cuidar para não secar o éter no béquer, enquanto está fervendo no aparelho.

2.6.10. Ajuste à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde;

%resultado = % de gordura na amostra

%MS(105°C) = % de matéria seca na amostra a 105°C

Ver a seguir, na Tabela 5, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 5. Determinação da % de Extrato Etéreo

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE EXTRATO ETÉREO OU GORDURA

Nº DO PROJETO:

RESPONSÁVEL:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Identificação	Nº Papel	Peso Amostra	Nº Cadinho	Tara Cadinho	Tara Cad. + Gord	% Gord	0 Gord

Análises corrigidas a 100% da matéria seca a 105°C

2.7. FIBRA BRUTA

2.7.1. Princípio

O termo fibra bruta engloba as frações de celulose e lignina insolúvel. Do ponto de vista químico, fibra bruta é a parte dos carboidratos resistente ao tratamento sucessivo com ácido e base diluídos.

A maior fração da fibra bruta, a celulose, é bem aproveitada pelos ruminantes, uma vez que os microorganismos do rúmen são capazes de desdobrá-la formando ácidos graxos voláteis, que são fontes de energia absorvida pelo organismo destes animais. A fibra é necessária para o funcionamento do rúmen. Quando em níveis elevados, baixa o consumo de matéria seca por animal e a concentração de energia por kg de matéria seca.

A fibra é inversamente relacionada com o teor de energia. Quanto maior a fibra, menor será o valor da energia. É o conteúdo de fibra que determina o consumo voluntário do animal.

Os volumosos através da sua quantidade de fibra tem como papel dar consistência ao bolo alimentar, regulando a velocidade de passagem pelo trato digestivo.

Quando a silagem possui muita fibra, a passagem pelo trato digestivo é lenta, ocasionando baixa digestão e absorção dos nutrientes. Já, quando a silagem possui pouca fibra, a passagem pelo trato digestivo é rápida, provocando fermentações indesejáveis, alterando o metabolismo do animal.

2.7.2. Materiais/equipamentos

- a) Aparelho digestor de fibra bruta;
- b) Gooch de placa porosa, em vidro sinterizado, porosidade 2 (média), capacidade 50 ml;
- c) Funil analítico 60°C, raiado, haste curta, com diâmetro de 100 mm.

2.7.3. Reagentes e soluções

- a) Ácido sulfúrico p.a. (H_2SO_4 95-97%, $d = 1,84$);
- b) Álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 95%;
- c) Hidróxido de sódio (NaOH).

2.7.3.1. Solução de ácido sulfúrico 0,255N/1,25% p/v.

- a) Pesar 13,03 g de ácido sulfúrico p.a. (H_2SO_4 95-97%, $d = 1,84$) em um béquer e depois transferir para balão volumétrico de 1.000 ml, contendo aproximadamente 500 ml de água;
- b) Lavar o recipiente da pesagem com água e verter no meio de dissolução;
- c) Esperar esfriar antes de aferir o volume
- d) Completar e aferir o volume, homogeneizando em seguida;
- e) Executar a operação em capela;
- f) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.7.3.2. Solução de hidróxido de sódio 0,313N/1,25% p/v.

- a) Pesar 12,65 g de hidróxido de sódio p.a. (99% de pureza);
- b) Dissolver previamente em béquer (PVC, PTFE, Polietileno) com aproximadamente 300 ml de água destilada;
- c) Transferir para balão volumétrico de 1.000 ml;
- d) Submeter o béquer a sucessivas lavagens (tríplice lavagem);
- e) Deixar esfriar, aferir e homogeneizar;
- f) Executar a operação em capela;
- g) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.7.4. Procedimento

- a) Pesar 1 g de amostra e transferir para béquer de 600 ml (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal - LBNA/ Embrapa Clima Temperado);
- b) Adicionar 100 ml de Ácido Sulfúrico 0,255N e colocar imediatamente no aparelho digestor aquecido;
- c) Ligar a água de circulação dos condensadores. Após o início da ebulição marcar trinta minutos.
- d) Concluída a etapa, proceder à filtração em papel de filtro (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado), fazendo-se lavagens sucessivas com água quente sobre o resíduo;
- e) Transferir o material retido no papel de filtro para o béquer de digestão com 110 ml de hidróxido de sódio 0,313N quente;
- f) Colocar aproximadamente quinze pérolas de vidro (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado). Seguir os mesmos princípios da digestão ácida (trinta minutos);
- g) Filtrar a fração fibrosa em gooch de placa porosa (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado), lavando o béquer com água quente e, a seguir, lavando-o duas vezes com álcool etílico 95 %;
- h) Secar os gooch em estufa a 105°C durante 4 horas, esfriar em dessecador e pesar;
- i) Calcinar em mufla a 550°C durante 1 hora, esfriar em dessecador e pesar.

2.7.5. Recomendações

- a) Usar as soluções de H_2SO_4 e NaOH com título exato (solução de ácido sulfúrico 0,255N/1,25% p/v. e solução de hidróxido de sódio 0,313N/1,25% p/v);

- b) Observar o tempo de digestão que deve ser de exatamente trinta minutos, iniciando a fervura um minuto após a amostra entrar em contato com o ácido e/ou com a base;
- c) As filtrações devem ser efetuadas o mais rápido possível, sem deixar o material esfriar e as lavagens devem ser feitas com água quente;
- d) Material rico em gordura deve ser previamente desengordurado, para evitar excesso de saponificação da gordura, durante a hidrólise básica e, conseqüentemente, prevenir a formação de espuma.

2.7.6. Fórmula

$$\%FB = \frac{(PC + \%FB) - (PC + \%C)}{PA \times \%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

FB = Fibra bruta

PC = Peso do cadinho

C = Cinza

PA = Peso da amostra

MS(105°C) = Matéria seca a 105°C

2.7.7. Ajuste à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de fibra bruta na amostra

%MS(105°C) = % de matéria seca na amostra

Ver a seguir, na Tabela 6, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 6. Determinação da % de Fibra Bruta

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE FIBRA BRUTA

Nº do Projeto:

Responsável:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Identificação	Nº Cápsula	Peso Cápsula	Peso Amostra	Cadinho + Fibra Bruta	Cápsula + Cinza	% FB	0 FB

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

2.8. CELULOSE**2.8.1. Princípio**

O método baseia-se na dissolução de todos os componentes da amostra, com exceção da celulose e dos minerais, por meio de um reagente ácido específico.

2.8.2. Considerações gerais

Na realidade, o termo fibra bruta é empírico e engloba a fração da celulose e da lignina. Sabe-se que parte da fração da lignina é dissolvida nas hidrólises ácida e básica, durante o processo de determinação da fibra bruta, indo essa fração fazer parte do Extrato Não Nitrogenado (ENN), que

se calcula por diferença. Sabe-se, também que aproximadamente 97% da fibra bruta é composta de celulose e lignina; sendo que a maior fração é a da celulose. Assim, uma informação mais exata sobre o teor de celulose e de lignina dos alimentos seria obtida pela determinação direta de cada uma dessas frações. Van Soest (1968).

Na determinação dos teores de celulose e de lignina das forrageiras, observa-se que sua soma é sempre maior que o teor de fibra, isso porque, como já foi dito, na determinação da fibra bruta, parte da celulose e da lignina é dissolvida durante as hidrólises: ácida e básica.

Sabe-se que os ruminantes desdobram a celulose, por meio de sua flora bacteriana, até Ácidos Graxos Voláteis (AGV) principalmente, ácido acético, ácido propiônico e ácido butílico. A fermentação da celulose se processa no rúmen-retículo, por intermédio de bactérias e protozoários ali existentes. Crampton (1959), Annison (1959).

Em termos de aproveitamento pelos ruminantes, a celulose é igual ao amido. Durante muito tempo, os AGV foram considerados como subprodutos, sem maior importância. Em 1952, descobriu-se que eles são a maior fonte de energia para os ruminantes, quando alimentados à base de forragem. Os três principais AGV estão assim constituídos, em termos do total de ácidos graxos produzidos no rúmen: ácido acético, de 54 a 74% ; ácido propiônico, de 16 a 27% e ácido butílico, de 6 a 15%.

2.8.3. Material necessário

- a) Aparelho banho-maria, com temperatura controlada;
- b) Forno mufla, com temperatura controlada a mais ou menos 600°C;
- c) Gooch ou cadinho filtrante de porcelana, com capacidade de 50-60 ml;
- d) Amianto branco, devidamente tratado;
- e) Tubos de ensaio com capacidade de 100 ml (usa-se de 2,8 a 3,0 cm e 16 cm de altura);

- f) Balança analítica com precisão de mais ou menos 0,1 mg;
- g) Dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica gel azul.

2.8.4. Reagentes e Soluções

- a) Ácido acético glacial (CH_3COOH);
- b) Ácido nítrico concentrado (HNO_3);
- c) Álcool etílico 96-98% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$);
- d) Benzeno (C_6H_6);
- e) Éter sulfúrico (etílico) $[(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}]$;
- f) Água destilada ou deionizada.

2.8.4.1. Solução reagente ácido

Constituído de (fazer uso de reagentes puros para análise – p.a.):

- a) 800 ml de ácido acético glacial;
- b) 200 ml de água destilada;
- c) 100 ml de ácido nítrico concentrado.

2.8.5. Procedimento

- a) Pesar aproximadamente 1 g da amostra pré-seca, em tubo de ensaio;
- b) Adicionar 16,5 ml do reagente ácido ao tubo de ensaio com a amostra. Tampar o tubo com bola de vidro e levar ao banho-maria, em ebulição, durante trinta minutos. Esta fase é chamada de digestão das proteínas e carboidratos (ácidos digestíveis);
- c) Após a digestão, retirar os tubos do banho-maria e adicionar 20 ml de etanol (álcool etílico) e deixar esfriar;

- d) Separar a parte líquida da sólida, por filtração em gooch, preparando-as para a análise de fibra, na bomba a vácuo;
- e) O material deve ser transferido, quantitativamente, para o gooch, com auxílio de uma peseta contendo álcool;
- f) Após a filtração, fazer a lavagem do material com 20 ml de etanol quente;
- g) A seguir, adicionar na filtração 20 ml de benzeno quente e, finalmente, adicionar 20 ml de éter sulfúrico;
- h) Secar os gooch, em estufa a 105°C, durante 4 horas;
- i) Resfriar em dessecador e fazer a pesagem (gooch + celulose + minerais);
- j) Incinerar em forno mufla a 550°C, obtendo-se o peso de celulose.

Ver a seguir, na Tabela 7, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 7. Determinação da % de Celulose

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE CELULOSE

Nº do Projeto:

Responsável:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Tubo				Gooch			Celulose (g)	Celulose ASA (%)	ASE (%)	Celulose MS (%)	Celulose M Natural* (%)
	Nº	Tara (g)	Tara + ASA	ASA (g)	Nº	Resíduo (g)	Cinza (g)					

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

2.9. DETERMINAÇÃO DA ENERGIA BRUTA

2.9.1. Princípio

A energia bruta refere-se à quantidade de calor liberado (Kcal/kg ou Kcal/g) de determinada amostra, quando esta é completamente oxidada em ambiente rico de oxigênio (vinte e cinco a trinta atmosferas de oxigênio).

2.9.2. Considerações gerais

O aparelho usado na determinação da energia bruta dos alimentos é a bomba calorimétrica (calorímetro adiabático de Parr). A bomba

calorimétrica consiste basicamente em um cilindro metálico e hermeticamente fechado, onde a amostra é colocada em recipiente próprio com vinte e cinco a trinta atmosferas de oxigênio. A combustão é feita através de um circuito elétrico que determina a queima de um fusível, que se encontra em contato com a amostra, liberando uma faísca elétrica para início da combustão.

Visto que a bomba calorimétrica é mergulhada num recipiente com 2.000 ml de água destilada, em condições adiabáticas, a combustão da amostra provoca a elevação da temperatura da água na qual a bomba se acha imersa. Medindo-se a elevação da temperatura da água, em condições adiabáticas e, conhecendo-se o equivalente hidrotérmico da bomba (fazendo-se as correções para a energia liberada pela oxigenação do fusível e produção de gases), calcula-se a energia bruta da amostra.

A energia bruta dos alimentos, por si, tem pouca aplicação, porém é o ponto de partida para se determinar outras medidas energéticas dos alimentos: energia digestível, metabolizável etc.

Os nutrientes apresentam diferentes valores de energia bruta. Os carboidratos fornecem, em média, 4,15 Kcal/g; as proteínas, 5,65 Kcal/g e as gorduras, 9,40 Kcal/g.

2.9.3. Material necessário

- a) Bomba calorimétrica tipo "Parr" e acessórios;
- b) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1g;
- c) Bureta automática;
- d) Erlenmeyer de 100 ml;
- e) Peseta;
- f) Pinça metálica;
- g) Cápsula metálica;
- h) Balão de oxigênio;

i) Erlenmeyer;

j) Béquer.

2.9.4. Reagentes e soluções

a) Carbonato de sódio (Na_2CO_3);

b) Alaranjado de metila ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$);

c) Tabletes de combustão de ácido benzóico, padronizados.

2.9.4.1. Solução padrão de carbonato de sódio

a) Pesar 3,658 gramas de Na_2CO_3 por litro de água destilada.

2.9.5. Procedimentos

a) Flambar, ao rubro, as cápsulas metálicas que servirão de recipiente das amostras e deixar esfriar, em dessecador.

b) Pesar, aproximadamente de 0,5 a 1,0 g da amostra, dependendo do tipo de material a ser analisado.

c) Colocar a cápsula com a amostra no eletrodo e instalar o fusível metálico de dez cm entre os eletrodos da bomba. O fusível deve ter contato com a amostra, mas não deve tocar na cápsula.

d) Colocar, aproximadamente, 1 ml de água nas paredes da bomba com a ajuda de uma peseta a fim de umedecê-las. Isso não será necessário se as paredes do cilindro ainda estiverem úmidas da determinação anterior.

e) Fechar bem a tampa da bomba e a válvula de liberação de gases. Adaptar a válvula de entrada de gases ao balão de oxigênio e adicionar, lentamente, o oxigênio até atingir de vinte e cinco a trinta atmosferas.

f) Colocar 2.000 ml de água destilada no recipiente oval do calorímetro fazendo em seguida a imersão na bomba (a água colocada é suficiente para a realização de várias determinações; depois de 4 a 5 determinações, aproximadamente, medir de novo a água contida no recipiente e completar

até os 2.000 ml; com isso, repõe-se a água que normalmente é perdida no manuseio da bomba entre as determinações). A temperatura da água deve estar entre os valores mensuráveis nos termômetros, preferencialmente próxima ao limite inferior de suas escalas. Ligar o eletrodo que se comunica à fonte de energia e fechar o circuito.

g) Fechar o calorímetro, observando se os termômetros estão corretamente posicionados. Abaixar os termômetros e ligar o motor que faz a água circular. Observar se o recipiente no qual o calorímetro está contido encontra-se cheio de água. Caso não esteja, encher com água até a saída pelo "ladrão" (esta operação é necessária somente na primeira determinação do dia).

h) Ajustar a temperatura da água da parte externa do calorímetro com a da interna pela adição de água quente ou fria. Esperar até que o equilíbrio térmico dos dois termômetros seja mantido por 3 a 5 minutos, aproximadamente, observando-se as temperaturas em intervalos de um minuto.

Observação

O ideal seria que as temperaturas da água do calorímetro e da água que o circunda fossem iguais, para realmente ter-se uma condição adiabática. Como na prática esta coincidência de temperatura é morosa, procura-se aproximar ao máximo as temperaturas, admitindo-se, todavia, uma amplitude térmica máxima de 0,1 graus entre as temperaturas da água.

Ler e registrar a temperatura do termômetro que está em contacto com a água do calorímetro (temperatura inicial da determinação) e acionar o interruptor que provocará o fechamento do circuito elétrico.

É necessária a entrada de água quente ou fria no recipiente externo, mantendo sua temperatura mais próxima possível à do calorímetro, à medida que a temperatura deste for aumentando.

Ler e registrar a temperatura final, após ter-se mantido estável durante 3 minutos, a intervalos de 1 minuto.

Desligar o motor que faz a água circular e levantar os termômetros. Abrir o calorímetro, desligar a bomba do circuito externo do calorímetro e retirá-la do recipiente com água, tendo-se o cuidado de não deixar que se perca muita água do recipiente.

Retirar o excesso de pressão da bomba, abrindo a válvula.

Remover os restos do fusível metálico que não tenham sido completamente oxidados e medi-los. As calorias do fusível são determinadas sabendo-se que 1 cm de fusível queimado produz 2,3 calorias.

Lavar as paredes internas da bomba, usando uma peseta com água destilada e colocar os lavados em um frasco de erlenmeyer.

Titular, usando solução de carbonato de sódio padronizado e metil orange como indicadores, para determinar a quantidade de ácido formado pela oxidação. Cada ml da solução de Na_2CO_3 gasto na titulação corresponde a uma caloria.

2.9.6. Equivalente hidrotérmico da bomba calorimétrica

Equivalente hidrotérmico é a quantidade de calorias necessárias para elevar em um grau a temperatura de 2.000 ml de água, na qual está imersa a bomba calorimétrica.

Quando não se conhece o equivalente hidrotérmico da bomba, torna-se necessária sua determinação, usando-se, para isso, substâncias cujos valores calóricos são previamente conhecidos.

É comum o uso do ácido benzóico padronizado, em tabletes, cujo calor de combustão é conhecido (6.318 cal/g). Os tabletes são secos em estufa a 105°C, por uma noite, e deixados no dessecador para futuras pesagens nas cápsulas metálicas. Deve-se fazer de seis a oito determinações, a fim de se obter um valor médio confiável.

Uma vez que se conheça o aumento da temperatura da bomba calorimétrica, provocado pela combustão das amostras do ácido benzóico,

pode-se determinar o equivalente hidrotérmico, usando-se a fórmula seguinte.

2.9.6.1. Fórmula do equivalente hidrotérmico

$$Eq.Hid. = \frac{CCAB \times PAAcB + CF + C(ml / Na_2CO_3)}{TF - TI}$$

Onde:

Eq.Hid. = Equivalente hidrotérmico

CCAB = Calor combustão ácido benzóico

PAAcB = Peso da amostra ácido benzóico

CF = Calorias do fusível

C(ml/Na₂CO₃) = Calorias

TF = Temperatura final

TI = Temperatura inicial

Exemplo:

Peso do ácido benzóico seco = 0,7701g

Fusível queimado = 4,5 cm X 2,3 = 10,3 calorias

Gasto Na₂CO₃ na titulação = 8,0 ml X 1,0 = 8,0 calorias

Diferença de temperatura = 3,60°F

$$Eq.Hid. = \frac{6,318 \times 0,7701 + 10,3 + 8,0}{3,60} = 1,356(cal / ^\circ F)$$

O equivalente hidrotérmico da bomba, uma vez determinado, será sempre usado, a menos que alguma parte da bomba seja substituída.

Conhecendo o equivalente hidrotérmico, pode-se conhecer o calor de

combustão (Kcal/kg ou Kcal/g) de determinada amostra, no laboratório, usando-se a seguinte fórmula.

2.9.6.2. Fórmula do calor de combustão

$$CC = \frac{EHB \times DT + CF + C(ml / Na_2CO_3)}{PA}$$

Onde:

CC = Calor de combustão

EHB = Equilíbrio hidrotérmico da bomba

DT = Diferença de temperatura (final-inicial)

CF = Calorias do fusível

C(ml/Na₂CO₃) = Calorias

PA = Peso da amostra

2.9.7. Determinação da Energia Bruta da Urina (amostra líquida)

2.9.7.1. Princípio

Na determinação da energia bruta (EB) da urina, devem-se preparar convenientemente as amostras, a fim de que se obtenham melhores resultados na determinação, por meio de bomba calorimétrica. A urina deve ser previamente acidificada na coleta, durante a realização experimento.

É comum o uso de cápsula de polietileno, com capacidade de 5 ml. A energia bruta das cápsulas de polietileno, previamente determinadas (Kcal/g), é obtida tomando-se a média da determinação de quatro cápsulas.

2.9.7.2. Preparo da amostra

Para melhor eficiência do trabalho no laboratório, recomenda-se pipetar

inicialmente 5 ml de urina, por cápsula, previamente pesada em balança analítica. As amostras de urina precisam ser descongeladas até a temperatura ambiente e não devem ser agitadas.

As cápsulas contendo urina (5 ml) são levadas à estufa de ventilação forçada a 55°C, até quase completa secagem das amostras (dezoito a vinte e quatro horas). Em seguida, adicionam-se mais 5 ml de urina às cápsulas, a fim de se ter um total de 10 ml por amostra. Retorna-se à estufa nas mesmas condições (dezoito a vinte e quatro horas), tendo-se o cuidado de não deixar a amostra secar completamente.

2.9.7.3. Queima das amostras

Na combustão da cápsula e da urina, usa-se bomba calorimétrica tipo "Parr".

Na determinação da energia bruta total (cápsula + urina), a fórmula usada para determinação é a seguinte:

$$EBT(Kcal / g) = TF - TI \times EHB$$

Onde:

EBT(kcal/g) = Energia bruta total

TF = Temperatura final

TI = Temperatura inicial

EHB = Equivalente hidrotérmico da bomba

A determinação da energia bruta dos 10 ml de urina é obtida calculando-se:

$$EBT(Kcal) - EBC(Kcal) = EBU(10ml)$$

Onde:

EBT(kcal) = Energia bruta total

EBC(Kcal) = Energia bruta da cápsula

EBU = Energia bruta da urina

Exemplo:

Média da energia bruta das cápsulas = 10,500 Kcal/g

Energia bruta da casula (0,2530g) = 2,656 Kcal

Energia bruta total (cápsula + 10 ml de urina) = 3,064 Kcal

Energia bruta de 10 ml urina = 0,408 Kcal

O cálculo da quantidade de energia bruta excretada pelo animal pela via urinária, baseia-se na estimativa da energia bruta da urina.

Ver a seguir, na Tabela 8, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 8. Determinação da % da Energia Bruta

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DA ENERGIA BRUTA

Nº do Projeto:

Responsável:

DATA:

Amostra	Tara (g)	Tara + ASA (g)	ASA (g)	Temperatura em °F		Diferença de Temperatura Final-Inicial	ASE (%)	Kcal/kg*	
				Inicial	Final			MS	M. Natural

* O equivalente hidrotérmico da Bomba Calorimétrica é de 1,356 cal/°F (PARR. MOD. 1200).

2.10. DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL

2.10.1. Princípio

O termo proteína bruta envolve um grande grupo de substância com estruturas semelhantes, porém com funções fisiológicas diferentes. Com base no fato de que as proteínas têm percentagem de nitrogênio quase constante, em torno de 16%, o que se faz é determinar o nitrogênio. A fração de componentes orgânicos, alvos de dosagens na forma mencionada, incluem o nitrogênio protéico, propriamente dito, e outros compostos nitrogenados não protéicos, tais como: aminas, amidas, lecitinas, nitrilas e aminoácidos.

Considerando que o concentrado tem o papel de suplementar o déficit protéico oriundo do volumoso, é importante conhecer o nível protéico das silagens, volumosos e rações concentradas e ração total, que normalmente varia de acordo com o material a ser analisado.

Durante a digestão da matéria orgânica, o sulfato de amônio (NH_4) resultante, na presença da solução concentrada de hidróxido de sódio, que libera amônia (NH_3), é recebido na solução de ácido bórico.

A amônia, na solução de ácido bórico, é titulada com ácido sulfúrico ou clorídrico de título conhecido e, assim, determina-se o teor de nitrogênio da amostra.

Para o cálculo da proteína bruta, basta multiplicar o resultado pelo fator 6,25. Processa-se em três fases: digestão, destilação e titulação.

2.10.2. Material necessário

- a) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1 mg;
- b) Dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica gel azul;
- c) Tubos de digestão de 25 ´ 250 mm;
- d) Aparelho de destilação de nitrogênio;

- e) Bureta automática com capacidade de 50 ml;
- f) Bloco digestor para 40 provas;
- g) Frasco lavador;
- h) Pipetador;
- i) Pipeta de 5 ml;
- j) Dosador com capacidade 10 ml (bico de papagaio);
- k) Erlenmeyer de 125 ml.

2.10.3. Reagentes e soluções

- a) Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 96-98%, $p = 1,84$);
- b) Hidróxido de sódio (NaOH);
- c) Ácido bórico (H_3BO_3);
- d) Sulfato de potássio (K_2SO_4) ou sulfato de sódio (NaSO_4) anidro;
- e) Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- f) Selênio metálico em pó ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- g) Vermelho de metila ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_3$);
- h) Álcool etílico 95% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$);
- i) Verde de bromocressol ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{B}_{14}\text{O}_5\text{S}$).

2.10.3.1. Solução de ácido sulfúrico 0,05 N para titulação de proteínas

- a) Adicionar água destilada no garrafão graduado com capacidade de 5 litros até a metade;
- b) Adicionar 7,5 ml de ácido sulfúrico p.a. Quando se dispõe de ácidos de marcas diferentes, deve-se preparar a solução considerando informações

do rotulo tais como, pureza e título (massa utilizada considerando o grau de pureza dos reagentes);

- c) Completar o volume do recipiente com água destilada;
- d) Separar três erlenmeyer e adicionar, em cada um, 10 ml de hidróxido de sódio 0,1N (padrão primário);
- e) Adicionar 0,5 ml vermelho de metila em cada erlenmeyer;
- f) Encher a bureta com a solução preparada;
- g) Titular os erlenmeyer até ficarem com a cor rosada. Anotar os volumes e fazer a média;
- h) Executar a operação em capela;
- i) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.10.3.2. Titulação para determinar o fator conhecido do H_2SO_4 0,05 N

- a) Descartar qualquer resíduo de ácido que permaneça no depósito de vidro da bureta.
- b) Lavar o depósito de vidro da bureta com água destilada e fazer a tríplice lavagem; logo após, secar em estufa de ar forçado.
- c) Esvaziar a bureta e lavar com água destilada várias vezes, até que não restem resíduos do ácido anterior.
- d) Pegar o depósito de vidro devidamente seco e enchê-lo com a nova solução, para a padronização do novo ácido; após montar a bureta.
- e) Encher a bureta com o novo ácido, descartando-o para eliminar qualquer resíduo de água destilada oriunda da lavagem anterior; fazer esse processo por três vezes, no mínimo.
- f) Pegar três erlenmeyer de 125 ml.
- g) Pipetar 10 ml de hidróxido de sódio 0,1 N, em cada erlenmeyer.

h) Adicionar 0,5 ml de vermelho de metila a 0,2%, em cada erlenmeyer.

i) Anotar a quantidade de solução gasta para o ponto de viragem da titulação.

j) Aplicar na fórmula a seguir.

$$N1.V1 = N2.V2$$

Onde:

$N1.V1$ = Hidróxido de sódio 0,1N

$N1$ = Normalidade de hidróxido de sódio 0,1N

$V1$ = Volume gasto de hidróxido de sódio 0,1N

$N2$ = Normalidade desconhecida

$V2$ = Volume gasto da solução desconhecida para o ponto de viragem na titulação

Exemplo:

Titulação 1 = 17,8 ml

Titulação 2 = 17,9 ml

Titulação 3 = 17,8 ml

$$Média = \frac{17,8 + 17,9 + 17,8}{3} = 17,83 \text{ ml}$$

$$V1.N1 = V2.N2$$

$V1$ = 10 ml

$N1$ = 0,1 N

$V2$ = 17,83 ml

$$10 \times 0,1 = 17,83 \times N2$$

$$N2 = \frac{1}{17,83}$$

$$N2 = 0,0561 \text{ N}$$

2.10.3.3. Padronização do ácido com TRIS

O TRIS ou THAM (Tris-(hidroximetil) amino metano) é um padrão primário para a estandarização de soluções diluídas de ácidos. Possui alto peso molecular, é incolor, não é higroscópico e pode ser obtido com alta pureza. Não absorve CO_2 quer na forma sólida quer em solução. Seu pH no ponto de equivalência é de 4,7. As soluções revelam-se estáveis à temperatura ambiente por, no mínimo, três meses.

2.10.3.3.1. Procedimento

- a) Pesar 0,7 g de TRIS (reagente Merck nº 8382) e secar por uma hora a 102°C (não deixar nesta temperatura por mais de duas horas).
- b) Dissolver 0,6057 g do reagente seco em balão volumétrico de 100 ml com água destilada livre de CO_2 .
- c) Ajustar o volume e homogeneizar. A solução assim preparada é 0,050 molc L-1.
- d) Pipetar 10,00 ml da solução 0,050 molc L-1 de TRIS para um frasco de erlenmeyer de 125 ml (em duplicata).
- e) Adicionar 10 ml de água destilada (livre de CO_2).
- f) Adicionar 5 ml do indicador ácido bórico e titular com o ácido. No ponto de viragem o indicador passa da cor verde-clara à rosa-claro permanente.

$$H = \frac{10 \times 0,05}{H}$$

Onde:

H = mol por litro

Observação: Para a titulação do ácido 0,0025 M utilizarmos somente 2,00

ml da solução de TRIS 0,050 mol_c L⁻¹.

2.10.3.4. Solução indicadora de ácido bórico

a) Pesar 40 g de ácido bórico (massa utilizada considerando grau de pureza dos reagentes) em um béquer de 1000 ml e dissolver em 400 ml o ácido com água destilada quente.

b) Deixar esfriar e transferir para o balão volumétrico de 2000 ml.

c) Medir 40 ml de solução obtida pela dissolução de 0,66 g de verde de bromocressol e 0,33 g de vermelho de metila em balão de 100 ml com etanol 95%, em proveta de 50 ml e 400 ml de álcool etílico, ou com etanol comum em proveta de 500 ml.

d) Misturar as soluções no balão volumétrico de 2000 ml e adicionar cuidadosamente o NaOH 0,1 N (de 1 em 1 ml, no máximo até 9 ml), até que se observe uma mínima mudança da cor roxa para a verde clara.

e) Para saber se a solução está pronta, no ponto certo, pegar um béquer de 50 ml e colocar 1 ml de água destilada e 1 ml do indicador de ácido bórico que está sendo feito; o ponto de virada é da cor verde clara.

f) Completar o volume com água destilada e homogeneizar.

g) Guardar em frasco escuro.

2.10.3.5. Mistura digestora

2.10.3.5.1. Princípio

A mistura digestora tem como finalidade assemelhar a digestibilidade dos alimentos que ocorre no rúmen do animal.

A mistura digestora torna a digestão das amostras mais rápida, elevando o ponto de ebulição do ácido sulfúrico de 180°C para, aproximadamente, 400°C.

2.10.3.5.2. Reagentes

- a) Sulfato de potássio (K_2SO_4) ou sulfato de sódio ($NaSO_4$);
- b) Sulfato de cobre ($CuSO_4$);
- c) Selênio metálico (Se).

2.10.3.5.3. Procedimento

- a) Pesar nove partes do sulfato de potássio – (K_2SO_4) ou sulfato de sódio – ($NaSO_4$), considerando-se a massa atômica utilizada. Deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes;
- b) Pesar uma parte do sulfato de cobre – ($CuSO_4$), considerando-se a massa atômica utilizada. Deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes;
- c) Triturar até a completa homogeneização. A mistura deve ficar com uma coloração uniforme;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

Observação:

A mistura digestora pode variar, conforme o método a ser utilizado; já para os micros e macronutrientes deve-se acrescentar selênio metálico na proporção de 0,8 partes.

2.10.3.5.4. Cálculo

Para obter-se em torno de 500 gramas da mistura digestora, faz-se o cálculo através de regra de três simples.

$$\begin{array}{l} 500g \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 9 \text{ partes} \\ X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ parte} \\ X = \frac{500 \times 1}{9} \\ X = 55,55 \end{array}$$

Equivalente:

500 g de sulfato de potássio = 9 partes

55,55 g de sulfato de cobre = 1 parte

2.10.3.6. Verde de bromocressol + vermelho de metila

A combinação de verde de bromocressol mais vermelho de metila é utilizada para a determinação de Nitrogênio.

2.10.3.6.1. Método para Volume de 100 ml

- a) Pesar 0,33 g de verde de bromocressol;
- b) Pesar 0,165 g de vermelho de metila;
- c) Transferir para balão volumétrico de 100 ml;
- d) Completar o volume do balão, com etanol 95%;
- e) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.10.3.7. Fenolftaleína 1% p/v

- a) Pesar 1 g de fenolftaleína p.a.;
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 ml;
- c) Colocar 60 ml de álcool etílico p.a. 95%;
- d) Agitar até dissolver, acrescentar água destilada e deixar esfriar;
- e) Aferir e homogeneizar;
- f) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.10.3.8. Verde de bromocressol 0,1% p/v

- a) Pesar 0,1 g de verde de bromocressol p.a.;
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 ml;

- c) Colocar 20 ml de álcool etílico p.a. 95%;
- d) Agitar até dissolver, acrescentar água destilada e deixar esfriar;
- e) Aferir e homogeneizar;
- f) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.10.3.9. Vermelho de metila 0,2% p/v

- a) Pesar 0,2 g de vermelho de metila p.a.;
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 ml;
- c) Colocar 60 ml de álcool etílico p.a. 95%;
- d) Agitar até dissolver, acrescentar água destilada e deixar esfriar;
- e) Aferir e homogeneizar;
- f) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

2.10.3.10. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10N

2.10.3.10.1. Material necessário

- a) Béquer de PVC (policloreto de vinila) 1000 ml;
- b) Balão volumétrico 1000 ml
- c) Bastão de vidro;
- d) NaOH (400 g).

2.10.3.10.2. Procedimento

- a) Pesar 400 g de NaOH (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes) em béquer de PVC (policloreto de vinila) 1000 ml;
- b) Colocar 500 ml de água destilada (colocar aos poucos e mexer para não agregar no fundo do béquer de PVC (policloreto de vinila); se isso ocorrer,

aquecer para dissolver em banho maria). Preparar um banho com gelo para o preparo da solução de hidróxido de sódio. Nessa solução ocorre uma reação exotérmica;

c) Deixar esfriar e passar a solução para a balão volumétrico de 1000 ml, lavando bem o béquer de PVC (policloreto de vinila), e completando o volume de 1000 ml;

d) Executar a operação em capela;

e) Transferir para recipiente apropriado de PVC (policloreto de vinila) e etiquetado.

2.10.3.11. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N

a) Medir 10 ml de NaOH 10N (que é o NaOH 40%, que se usa na proteína), em balão volumétrico de 100 ml;

b) Completar o volume do balão volumétrico com água destilada;

c) Transferir para recipiente apropriado de PVC (policloreto de vinila) e etiquetado.

2.10.3.12. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N

a) Medir 10 ml de NaOH 1N (que é o NaOH 40%, que se usa na proteína), em balão volumétrico de 100 ml;

b) Completar o volume do balão volumétrico com água destilada;

c) Transferir para recipiente apropriado de PVC (policloreto de vinila) e etiquetado.

2.10.4. Digestão

O nitrogênio orgânico é transformado em amônia e os compostos orgânicos são convertidos em CO₂, H₂O etc.

2.10.4.1. Procedimento

a) Selecionar os tubos de ensaio de 50 ml de borda grossa, devidamente identificados;

- b) Pesar 0,200 g da amostra (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- c) Adicionar a mistura catalítica ou mistura digestora de sulfato de potássio (K_2SO_4) ou sulfato de sódio ($NaSO_4$) com o sulfato de cobre ($CuSO_4$) na proporção de 9/1, coloca-se 0,7 g da mistura em cada tubo de ensaio (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- d) Colocar 2 ml de H_2SO_4 p.a. (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- e) Colocar em bloco digestor a 400°C de temperatura, até ficar verde cristalino, o que leva em torno de 2 a 3 horas dependendo do tipo de amostra a ser analisada (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado).

2.10.5. Destilação

Fase em que a amônia é separada e recolhida em uma solução receptora.

2.10.5.1. Procedimento

- a) Verificar o nível da água da caldeira; após, completar o nível, a cada três amostras realizadas; conferir novamente o nível, para não danificar o aparelho (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- b) Colocar a amostra no destilador;
- c) Colocar 10 ml de NaOH 10 N com a torneira aberta (dá-se uma lavada após colocar NaOH)(modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- d) Colocar o erlenmeyer contendo o indicador de ácido bórico na quantidade de 5 ml; ligar o destilador antes de colocar o erlenmeyer com o indicador. A destilação estarão completa quando se obtiver 40 ml de amônia, que assume a coloração verde cristalino. Caso a amostra tenha se solidificado, adiciona-se um pouco de água destilada nos tubos e homogeneiza-se antes de colocar no destilador para dissolver a amostra. O NaOH destina-se a neutralizar o ácido sulfúrico da amostra e liberar a

amônia (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);

e) Retirar o erlenmeyer do aparelho, desligando-o (aquecimento);

f) Deixar diminuir a ebulição, abrir a torneira e retirar a amostra.

2.10.6. Titulação

Fase em que é feita a determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora.

2.10.6.1. Procedimento

a) A leitura é feita pela quantidade de ácido gasto na titulação, até trocar a cor de verde cristalino para vermelho. Fazer a leitura pelo ml gasto de H_2SO_4 0,05 N padronizado na titulação da amostra;

Observação: Sempre se faz prova em branco, ou seja, a mistura catalítica mais 2 ml de H_2SO_4 .

b) Zerar a bureta;

c) Anotar o volume gasto;

d) Diminuir a prova em branco de volume gasto e anotar o resultado na ficha.

2.10.7. Procedimento (Processo semimicro) A.O.A.C (1975)

a) Pesar 0,200 g da amostra, embrulhar em papel impermeável e colocar no tubo de digestão. Caso não se disponha de quantidade de amostra suficiente, ou o teor de nitrogênio se situe em torno de 7%, pesar 0,100 g de amostra e fazer os cálculos com a seguinte Fórmula: $\%N = 0,28 \times f \times V_m$ (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);

b) Adicionar mais ou menos 0,7 g de mistura catalítica ou mistura digestora [sulfato de sódio (NaSO_4) na proporção de 9 partes e 1 parte de sulfato de cobre (CuSO_4)] e, em seguida, 2 ml de ácido sulfúrico concentrado (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima

Temperado);

c) Colocar a galeria com os tubos no bloco digestor, ligar o termostato e posicionar a temperatura em 400°C. O aquecimento se prolongará por duas a três horas, sendo o processo alvo de verificações ocasionais;

d) No início da digestão o material apresentará coloração escura, devido a forte ação oxidante do ácido sulfúrico sobre a matéria orgânica, contudo, próximo ao término do processo, o extrato terá, geralmente, cor verde clara. No tocante à verificação, deve-se tomar muito cuidado, visto que o processo deve ser realizado em capela. No resfriamento da amostra poderá haver choque térmico e, conseqüentemente, quebra do tubo e projeção de vapores ácidos na mão do operador;

e) Desligar o bloco e retirar a galeria, deixar esfriar por mais ou menos 5 minutos e adicionar água destilada para evitar cristalização do sulfato de amônio. O extrato deverá ficar com aproximadamente o dobro do seu volume inicial (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);

f) Transferir a amostra para o destilador, adicionar 10 ml de hidróxido de sódio 10 N (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);

g) Em erlenmeyer de 125 ml colocar 5 ml de ácido bórico e adaptar à extremidade do condensador. Abrir a torneira da água de circulação do condensador. Ligar a fonte de aquecimento. A solução de ácido bórico deve passar para cor verde devido à presença de amônia (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);

h) Desligar o destilador de nitrogênio quando se obtiver aproximadamente 40 ml do extrato;

i) Titular a solução com ácido sulfúrico 0,05 N padronizado. O ponto de viragem é do verde para o vermelho.

2.10.8. Fórmula para cálculo da proteína

Para peso de amostras em gramas.

$$\%Nitrogênio = \frac{V \times N \times FA \times 0,014 \times 100}{PA}$$

Onde:

V = Volume gasto na titulação

N = Normalidade de ácido

FA = Fator do ácido

PA = Peso da amostra

% Proteína = % de N (nitrogênio) x 6,25

2.10.9. Ajuste à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de proteína bruta na análise

%MS(105 °C) = % de matéria seca na amostra

Ver a seguir, na Tabela 9, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 9. Determinação da % de Nitrogênio Total

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE NITROGÊNIO TOTAL E PROTEÍNA BRUTA

Nº DO PROJETO:

RESPONSÁVEL:

Nº do Lote:

FATOR DE NORMALIDADE DO ÁCIDO:

DATA:

Amostra Nº	Identificação	Nº Tubo	Peso Amostra 1	Peso Amostra 2	ml gasto Amostra 1	ml gasto Amostra 2	% N	0 PB

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

3. Determinação de digestibilidade in vitro da Matéria Seca ou Orgânica**3.1. PRINCÍPIO**

A técnica, desenvolvida por Tilley e Terry (1963) e modificada por Van Soest e Moore (1966), consiste em se deixar amostras de alimentos (geralmente trabalha-se com forrageiras), num primeiro estágio (fermentação pré-gástrica), em contato com o conteúdo líquido do rúmen (inóculo), no interior de um tubo de ensaio, no qual busca-se reproduzir as condições predominantes no rúmen-retículo (presença de microorganismos, anaerobiose, temperatura média de 39°C, poder tampão com pH de 6,9);

já, num segundo estágio, processa-se a digestão pela adição de pepsina e ácido clorídrico concentrado. A quantia de matéria seca ou orgânica que desaparece após os dois estágios é considerada como tendo sido digerida.

3.2. MATERIAIS/EQUIPAMENTOS

a Banho Maria com termostato eletrônico (ajuste finíssimo), temperatura controlada de 0 a 120°C, precisão de mais ou menos 0,5°C, circulação interna de água;

- b) Galeria de alumínio;
- c) Gás carbônico (CO₂);
- d) Garrafa térmica grande;
- e) pH-metro, faixa de 0 a 14;
- f) Papel de filtro TIPO 389, com diâmetro de 12,5 mm;
- g) Rolhas de borracha com válvulas de bunsen;
- h) Tubos de ensaios de 25x150 mm, com parede reforçada de 1,5 mm;
- i) Suporte de madeira para tubos de ensaio;
- j) Forno de mufla;
- k) Bomba a vácuo ou elétrica;
- l) Termômetro de máxima e mínima;
- m) Potenciômetro;
- n) Provetas de 500 e 1000 ml;
- o) Kitazato de 2000 ml;
- p) Cadinhos de porcelana.

3.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Ácido clorídrico (HCl);
- b) Carbonato de sódio (Na_2CO_3);
- c) Pepsina;
- d) Saliva artificial;
- e) Uréia (NH_4).

3.3.1. Solução de ácido clorídrico 6 N

- a) Adicionar aproximadamente 100 ml de água destilada em balão volumétrico de 500 ml;
- b) Adicionar 240 ml de ácido clorídrico concentrado p.a. ($d = 1,19$; 38,32% v/v);
- c) Deixar esfriar, aferir e homogeneizar;
- d) Executar a operação em capela.

3.3.2. Solução de carbonato de sódio

- a) Pesar 15,8964 g de carbonato de sódio (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes);
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 ml;
- c) Adicionar 50 ml de água destilada, agitar até dissolver completamente;
- d) Deixar esfriar, aferir e homogeneizar.

3.3.3. Solução de pepsina 1:10.000 20% p/v

- a) Pesar na proporção de 1g/5 ml de solução a preparar;
- b) Submeter o meio à dissolução em agitador magnético 30 a 40 minutos antes do início do 2º estágio do ensaio de digestibilidade.

3.3.4. Solução de saliva artificial (volume da solução 500 ml)

a) Pesar e dissolver em aproximadamente 250 ml de água as seguintes substâncias: (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes);

- 2,0445 g de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4);
- 5,4674 g de fosfato de dissódico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- 0,7503 g de sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- 0,2501 g de cloreto de potássio (KCl);

b) Conservar em geladeira até o dia do início do ensaio de digestibilidade (1ª parte da saliva);

c) Adicionar, em seguida, 10 ml de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 5 ml de uréia;

d) Pesar 0,0825 g de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,0125 g de sulfato de sódio pentaidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e dissolver na 1ª parte da saliva [a dissolução do cloreto de cálcio e do sulfato de sódio somente completa-se com a adição de gás carbônico (CO_2)];

e) Completar o volume e saturar o meio com (CO_2) por 3,5 minutos, a uma pressão de vazão de mais ou menos 0,2 Kgf/cm²;

Observação: A operação de uso do CO_2 deve obedecer rigorosamente os seguintes passos:

Após certificar-se de que o regulador da pressão de trabalho (4), a válvula de bloqueio da linha (3) e o fluxômetro da linha (2) estão devidamente fechados, abrir lentamente e por completo a válvula do cilindro de gás (1);

- Regular a vazão de forma que o indicador do fluxômetro situe-se no nível 30;
- Abrir a válvula de bloqueio e estabelecer a pressão de trabalho no

regulador, ambos no laboratório;

· Concluída a operação com o CO_2 , fechar o regulador "4" e a válvula "3". Logo após, fechar a válvula "1". Tornar a abrir a válvula "3" e o regulador "4", purgando o gás remanescente da linha para um recipiente com mais ou menos 1 litro de água. Fechar o regulador "4", a válvula "3" e o fluxômetro "2";

f) Ler o pH (deve-se ligar o pH-metro 30 minutos antes do preparo da 2ª parte da saliva artificial, com a solução tampão $\text{pH} = 7,0$, na temperatura de trabalho do aparelho (mais ou menos 22°C), visando à estabilização do equipamento). Se este estiver situado na faixa de 6,8 a 6,9, conduzir o ensaio; se não, tornar a saturar com gás carbônico até fixar o pH na referida faixa.

3.3.5. Solução de Uréia 8% p/v

- a) Pesar 4 g de uréia;
- b) Transferir para balão volumétrico de 50 ml, adicionar água, agitar até dissolver completamente;
- c) Deixar alcançar a temperatura ambiente, aferir e homogeneizar.

3.4. PROCEDIMENTO

- a) Pesar 0,500 g de amostra (em cada corrida/bateria introduzir 03 provas em branco e 03 controles) e transferir para os tubos de ensaio;
- b) Adicionar 10 ml de saliva artificial, injetar gás carbônico e arrolhar. Em seguida, acondicionar em banho-maria a uma temperatura de 39°C ;
- c) Coletar o líquido ruminal em kitazato ambientado com o gás carbônico e em banho de água a mais ou menos 42°C . Filtrar diretamente na garrafa térmica com temperatura interna de mais ou menos 40°C ;
- d) Injetar gás carbônico no líquido da garrafa;
- e) Adaptar pipeta automática de 12 ml à garrafa térmica e tornar a injetar gás carbônico através da mesma. Agitar os tubos e adicionar o líquido

ruminal, arrolhado a seguir;

f) Inocular gás carbônico em todos os tubos durante 20 segundos, a uma pressão de mais ou menos 0,2 Kgf/cm². Deixar no banho-maria por 48 horas, agitando 3 vezes ao dia;

g) Após 48 horas, acrescentar a cada tubo 0,9 ml (1,0 ml nos tubos contendo o branco) de ácido clorídrico 6 N e 0,5 ml de solução 20% de pepsina 1:10.000. Segue-se outro estágio de 48 horas, também agitando os tubos 3 vezes ao dia;

h) Ao termino da 2ª etapa, filtrar o resíduo indigestível em papel filtro previamente tarado;

i) Submeter o resíduo à secagem por uma noite a 105°C. Esfriar em dessecador por 1 hora e pesar anotando o peso em ficha adequada.

3.5. DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA ORGÂNICA

Para determinação de digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO), acrescentam-se os seguintes passos:

a) Colocar os papéis de filtro com resíduos secos e pesados em cadinhos de porcelana previamente tarados;

b) Incinerar por 4 horas a 550°C;

c) Esfriar em dessecador por 1 hora e pesar.

3.5.1. Cálculo para DIVMO

$$\%DIVMO = \frac{MO_I - MO_{IND}}{MO_I} \times 100$$

Onde:

MO_I = Matéria orgânica inicial

MO_{IND} = Matéria orgânica indigestível

$$M.O_i = M.S_i - (M.S_i \times \% \text{ Cinza}/100)$$

$$M.O_{ind} = M.O_r - M.O_{br}; \text{ onde:}$$

$$M.O_r = M.S_r - \text{cinza}_r$$

$$M.O_{br} = M.S_{br} - \text{cinza}_{br}$$

3.6. RESULTADOS

$$\%DIVMS = \frac{M.S_i - M.S_{ind} \times 100}{M.S_i}$$

Onde:

$$M.S_{ind} = M.S_r - M.S_{br}$$

$M.S_i$ = Matéria seca inicial

$M.S_{ind}$ = Matéria seca indigestível

$M.S_r$ = Matéria seca residual

$M.S_{br}$ = Matéria seca do branco

Ver a seguir, na Tabela 10, modelo de ficha para apresentação de resultados.

3.6.1. Ajuste à base de 100 % da matéria seca:

$$Base \text{ sec } a = \frac{\% \text{ resultado}}{\% MS(105^\circ C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de digestibilidade na análise

%MS(105 °C) = % de matéria seca na amostra

TABELA 10. Determinação da % de Digestibilidade “in vitro” da Matéria Seca

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE Digestibilidade “in vitro” da Matéria seca

Nº do Projeto:

Responsável:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra	Tubo			Amostra			Resíduo				Digestibilidade (%)	
	Nº	Tara (g)	Tara + ASA	ASA (g)	ASE (%)	MS (g)	Tubo + Resíduo (g)	Resíduo (g)	Resíduo (-) Branco (g)	Mat. Seca Digerida (g)	Mat. Seca	0 Mat. seca

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

4. Determinação de pH e Ácido Lático em Silagem

4.1. PRINCÍPIO

A silagem é o produto do armazenamento da forragem verde depois de fermentada, na ausência de oxigênio. O armazenamento é processado em silos, depois da forragem ter sido convenientemente picada e compactada.

A fermentação é consequência da atividade bacteriana, a qual produz entre outros os ácidos lático e acético durante a fermentação do material ensilado. A forragem ensilada continua ainda em fermentação durante algum tempo, dependendo da maior ou menor quantidade de oxigênio presente no silo após a compactação.

As bactérias produtoras do ácido láctico são sacarolíticas; daí a importância de um teor elevado de carboidratos solúveis em água na forragem, a fim de obter maior produção deste ácido.

O teor de matéria seca é de grande importância, a fim de se obter silagem de boa qualidade e rendimento. Silagem de boa qualidade é caracterizada por apresentar de 30 a 40% de matéria seca, pH entre 3,8 a 4,5, ácido láctico superior a 3,0% e ácido butílico inferior a 0,2%, na matéria seca.

4.2. DETERMINAÇÃO DE PH

4.2.1. Materiais/Equipamentos

- a) pH-metro com escala de 0 a 14;
- b) Eletrodo combinado para análises de pH;
- c) Béquer de 250 ml;
- d) Frasco lavador;
- e) Bastonete de vidro;
- f) Balança analítica com precisão mais ou menos 0,1 mg.

4.2.2. Reagentes e soluções

- a) Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$);
- b) Fosfato dissódico heptaidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$).

4.2.2.1. Solução tampão, pH 4,0 e 7,0

A – 9,605 g ácido cítrico _____ 500 ml água destilada

ou 1,921 g ácido cítrico _____ 100 ml água destilada

B – 26,825 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ _____ 500 ml água destilada

ou 10,73 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ _____ 200 ml água destilada

pH 4,0 = 30,7 ml A + 19,3 ml B 'l elevar a 100 ml com H_2O

pH 7,0 = 6,5 ml A + 43,6 ml B '! elevar a 100 ml com H₂O

4.2.3. Procedimento

- a) Pesar 9,0 g de silagem fresca em béquer de 250 ml e adicionar 60 ml de água destilada;
- b) Fazer a leitura após um repouso de 30 minutos; usando pH-metro aferido com soluções tampão pH 4,0 e 7,0;
- c) Agitar o meio durante as leituras;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

4.3.1. Materiais/Equipamentos

- a) Conjuntos de cilindros extratores;
- b) Prensa hidráulica, capacidade 15 toneladas;
- c) Liquidificador;
- d) Espectrofotômetro, escala de leitura de 400-700 mm;
- e) Papel de filtro, tipo 3892 ou equivalente, com diâmetro de 18,5 cm.

4.3.2. Reagentes e soluções

- a) Ácido clorídrico concentrado (HCl);
- b) Cloreto de bário (BaCl₂.2H₂O);
- c) Cloreto férrico (FeCl₃.6H₂O);
- d) Hidróxido de sódio (NaOH);
- e) Lactato de lítio (solução padrão estoque);
- f) Sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O).

4.3.2.1. Solução de ácido clorídrico 1 N

- a) Em balão volumétrico de 500 ml, adicionar cerca de 250 ml de água destilada;
- b) Acrescentar 40 ml de ácido clorídrico p.a. concentrado ($d = 1,19; 38,32\%$);
- c) Aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3.2.2. Solução de cloreto de bário 9,88% p/v

- a) Pesar 98,91g de cloreto de bário (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes), dissolver em mais ou menos 300 ml de água destilada;
- b) Transferir para balão volumétrico de 1.000 ml, lavando o béquer com água destilada;
- c) Aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3.2.3. Solução de cloreto férrico 5% p/v

- a) Pesar 5,0075 g de cloreto férrico (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes), e dissolver em 12,5 ml de HCl 1 N;
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 ml, lavando o béquer com água destilada;
- c) Aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3.2.4. Solução de hidróxido de sódio 0,66 N

- a) Pesar 26,67 g de hidróxido de sódio (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes), e dissolver em mais ou menos 250 ml de água destilada;
- b) Transferir para balão volumétrico de 1.000 ml, lavando o béquer com água destilada;
- c) Deixar esfriar, aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3.2.5. Solução de lactato de lítio 1% p/v (solução padrão estoque)

- a) Pesar 1,0101 g de lactato de lítio p.a. (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes);
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 ml, adicionar aproximadamente 50 ml de água destilada, agitando até completar a dissolução;
- c) Aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3.2.6. Solução de sulfato de zinco 22,5% p/v:

- a) Pesar 225,49 g de sulfato de zinco (considerando-se a massa atômica utilizada, deve-se respeitar o grau de pureza dos reagentes), e dissolver em mais ou menos 300 ml de água destilada;
- b) Transferir para balão volumétrico de 1.000 ml, lavando o béquer com água destilada;
- c) Aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

4.3.3. Procedimento

4.3.3.1. Curva de calibração

4.3.3.1.1. Preparo dos padrões de leitura

Colocar em liquidificador:

- a) 4,0 ml de solução de lactato de lítio 1 %;
- b) 71 ml de água deionizada;
- c) 30 ml de cloreto de bário 9,88 %;
- d) 30 ml de hidróxido de sódio 0,66 N;
- e) 15 ml de sulfato de zinco 22,5 %.

Processar por 2 minutos. Filtrar em papel de filtro (o filtrado deve ser límpido). Quando se obtiver 100 ml de filtrado cessar a filtração. Veja a seguir, na Tabela 11, os padrões de leitura.

TABELA 11. Padrões de leitura.

Concentração no filtrado %	Volume A tomar do filtrado (ml)	Volume Final (ml)	Concentração Final (%)
1,0	5	25	0,2
↓	10		0,4
	15		0,6
	20		0,8
1,0	25	25	1,0

4.3.3.1.2. Desenvolvimento da cor

- a) Pipetar 10 ml de cada solução padrão e transferir para tubo de ensaio;
- b) Adicionar 1,0 ml de solução de cloreto férrico 1:4 e agitar. Repetir este procedimento com o branco;

Observação: O “branco” deve ser preparado antes dos padrões ou mesmo das amostras, da seguinte forma:

- Medir e misturar: 50 ml de água destilada com 20 ml de cloreto de bário 9,88%, com 20 ml de hidróxido de sódio 0,66 N e com 10 ml de sulfato de zinco 22,5%;
- Processar em liquidificador por 2 minutos. Filtrar em papel de filtro. Coletar duas alíquotas de 10 ml do filtrado obtido e adicionar 1 ml de solução de cloreto férrico 1:4 a cada uma destas. Incluir um branco a cada bateria de amostras.

4.3.3.1.3. Leitura no Espectrofotômetro

- a) Ligar o aparelho 1 hora antes da leitura, fixando o comprimento de onda em 425 nm;
- b) Fazer ajuste de 0% de absorbância e 100% de transmitância com o branco;
- c) A seguir, ler os padrões em ordem crescente de concentração;
- d) Verificar o ajuste com o branco a cada leitura do padrão.

4.3.3.2. Preparo da amostra

4.3.3.2.1. Extração do suco de silagem

- a) Pesar 100 g de silagem (em duplicata);
- b) Submeter a prensagem até uma pressão máxima de 10 toneladas;
- c) O suco de silagem é recebido em proveta graduada;
- d) Os cilindros extratores deverão ser lavados com água destilada (sem tratamento) a cada amostra prensada, isto é, entre duplicatas e amostras distintas.

4.3.3.2.2 Processamento do suco

Colocar em liquidificador:

- a) 4,0 ml de suco da silagem;
- b) 71 ml de água destilada;
- c) 30 ml de cloreto de bário 9,88%;
- d) 30 ml de hidróxido de sódio 0,66 N e 15 ml de sulfato de zinco 22,5%.

Processar por 2 minutos. Filtrar em papel de filtro até que o filtrado alcance mais ou menos 50 ml.

4.3.3.2.3. Desenvolvimento da cor e leitura

- a) Pipetar 10 ml do filtrado de cada amostra e transferir para tubo de ensaio;
- b) Adicionar 1 ml de solução de cloreto férrico 1:4 e agitar;
- c) Proceder à leitura em espectrofotômetro, ajustando para comprimento de onda 425 nm, observando os mesmos procedimentos de uso quando do preparo da curva de calibração.

4.3.4. Resultados:

$$\% \text{Ácido lático} = \frac{V_{\text{suco}} \times C_{\text{curva}}}{PS}$$

Onde:

V_{suco} = Volume de suco extraído por prensagem

C_{curva} = Concentração de ácido lático obtido com equação de regressão linear

PS = Peso seco da amostra.

5. O MÉTODO VAN SOEST NA DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE DE FORRAGEIRAS

A tradicional análise de alimentos, que vem sendo aplicada nos laboratórios de nutrição animal, também denominada análise aproximativa de Weende, parece não satisfazer mais os pesquisadores que, diariamente, procuram conhecer mais e melhor cada um dos nutrientes contidos nos alimentos.

O esquema de análise proposto por Weende, apesar de fornecer uma idéia de valor nutritivo do alimento, é falho em vários aspectos bem conhecidos pelos que estão familiarizados com este esquema: a análise da fibra bruta, além do empirismo de sua técnica, é composta de celulose e parte da lignina insolúvel. O extrativo não nitrogenado (ENN), calculado por diferença, fica, sujeito a erros que, normalmente, são cometidos nas demais análises, e, conseqüentemente, não representa muito bem a fração de carboidratos solúveis ou digestíveis.

Um novo método de análise, para avaliar a qualidade de forrageiras, foi proposto por Van Soest (1965), o qual permite melhor fracionamento dos diversos componentes da fração fibrosa.

Neste capítulo, objetivou-se proporcionar maiores conhecimentos, a respeito deste novo método, aos que trabalham em laboratórios de nutrição animal, além de acrescentar um pouco da experiência que se tem dele.

Na Tabela 12 faz-se uma comparação entre o método clássico de Weende e o sistema proposto por Van Soest, numa análise da matéria orgânica de forrageiras.

O novo método de determinação da qualidade das forrageiras proporcionado por Van Soest (1965) é baseado na separação das diversas frações constituídas nas forrageiras, por meio de reagentes específicos, denominados detergentes.

Assim, por meio do detergente neutro, é possível separar o conteúdo celular (parte da forragem solúvel no detergente neutro) constituído,

principalmente, de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água, da parede celular (parte da forragem insolúvel em detergente neutro), também chamada Fibra em Detergente Neutro (FDN) que é constituída, basicamente, de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada.

Continuando em seu fracionamento, Van Soest (1967) propõe um detergente ácido específico, a fim de solubilizar o conteúdo celular e a hemicelulose, além de maior parte da proteína insolúvel, obtendo-se um resíduo insolúvel no detergente ácido, denominado Fibra em Detergente Ácido (FDA), constituída, em sua quase totalidade, de lignina e celulose (lignocelulose). Finalmente, por intermédio de reagentes: ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% ou pelo método do permanganato de potássio ($KMnO_4$), a lignina é solubilizada, completando-se, deste modo, o fracionamento dos constituintes da parede celular. A celulose será conhecida, por diferença de pesagens, antes e depois de se conduzir os cadinhos para o forno de mufla.

O método de Van Soest, para determinação da qualidade de forrageiras, apresenta vantagens em relação a outros, em virtude de sua maior precisão, além de fornecer informações sobre importantes componentes: fibra em detergente ácido, celulose, lignina, cinza, sílica etc.

No Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado foram feitas adaptações do método de Van Soest para melhorar o rendimento das análises realizadas (quantidade de amostras).

TABELA 12. Comparação entre o método de Van Soest e 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
	Nitrogênio não protéico	Solúveis em água Amido Pectina	↑ Extrato não nitrogenado
↑ PAREDE CELULAR (Fibra em detergente neutro) ↓	Solúvel em detergente ácido	Proteína insolúvel	↓ Fibra Bruta ↓
	LIGNOCELULOSE (Fibra em detergente ácido)	Nitrogênio lignificado HEMICELULOSE LIGNINA (solução em álcali)	
		LIGNINA (insolúvel) CELULOSE	

(Van Soest; Moore, 1966).

5.1. DETERMINAÇÃO DA FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN)

5.1.1. Princípio

A FDN indica a quantidade total de fibra dentro do volumoso, que o relaciona com o consumo. Assim, quanto menor o nível de FDN, maior o consumo de matéria seca. Os níveis de FDN variam conforme a espécie vegetal e o seu estágio vegetativo. Normalmente os níveis de FDN nas leguminosas são mais baixos do que nas gramíneas. Dentro da mesma espécie vegetal, as plantas mais novas apresentam níveis de FDN mais

baixos, o que é facilmente detectado, com o maior consumo pelos animais. Van Soest, (1963).

Os níveis de FDN em silagem de milho variam bastante, porém é considerado um bom nível ao redor de 50%. Atualmente, com base em pesquisas, estabeleceu-se, por exemplo, que o consumo total de FDN nas vacas em lactação deve ficar em 1,2% do seu peso vivo, em que 75% devem ser oriundos dos volumosos (silagem, pastagem, feno) e 30% nas rações.

A fibra em detergente neutro (FDN) mede toda a fibra ou o componente de volume (volumoso) do feno – hemicelulose, celulose e lignina, sendo útil para estimar o consumo voluntário. Quanto mais alto o valor de FDN, mais baixo será o consumo esperado.

Para amostras com alto teor de amido, deverá ser feito tratamento preliminar, com solução de uréia $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ e de amilase termoestável. Deve-se ter cuidado, pois as atividades das enzimas são variáveis em função da sua concentração, meio (pH e temperatura) e substrato. Qualquer enzima pode perder ou diminuir a sua atividade em função de vários fatores (tempo, condição de armazenamento, etc.). As enzimas devem ser armazenadas em geladeira.

5.1.2. Material e métodos

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

- a) Estufa de secagem e esterilização (temperatura = 105°C);
- b) Cadinho filtrante de vidro borossilicato com placa porosa de vidro sinterizado, porosidade média a grossa (100 a 160 mm);
- c) Balança analítica com precisão mais ou menos 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.

5.1.3. Reagentes e soluções

As soluções são preparadas com reagentes químicos de grau analítico, água destilada e ou deionizada.

- a) 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);
- b) Borato de sódio decaidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 10\text{H}_2\text{O}$);
- c) Lauril sulfato de sódio [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$] – detergente;
- d) Fosfato ácido de sódio (Na_2HPO_4);
- e) 2 metoxietanol ou éter monometílico do etilenoglicol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$) ponto de ebulição de 124°C;
- f) Acetona, p.a. [$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$];
- g) Sulfito de sódio anidro p.a. (Na_2SO_3);
- h) Deca-hidronaftaleno, p.a. ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$) (decalina - antiespumante);
- i) Solução de uréia ($\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$) 8,0 mol L⁻¹: dissolver 480 g de uréia em 1 L de água destilada e ou deionizada;
- j) Uréia p.a. [$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$];
- k) Enzima alfa-amilase termoestável (Termamyl 120 L).

5.1.3.1. Solução de fibra em detergente neutro (FDN)

Inicialmente é necessário o preparo das seguintes soluções:

- a) Pesar 93,05 g de EDTA e 34,05 g de borato de sódio, transferir para béquer de 1000 ml com 400 ml aproximadamente de água destilada e aquecer até que se dissolvam;
- b) Pesar 150 g de lauril sulfato de sódio e juntar à solução (d). Dissolver com água quente;
- c) Pesar 22,80 g de fosfato ácido de sódio anidro que será também dissolvido, por aquecimento, e misturado aos demais reagentes;
- d) Transferir quantitativamente as soluções (a), (b) e (c) para garrafão de vidro devidamente calibrado e etiquetado; adicionar 50 ml de etileno glicol e completar o volume com água destilada ou deionizada. Evitar a formação de espuma;
- e) Volume final da solução será de 5000 ml.

5.1.4. Procedimento

- a) Organizar as amostras;
- b) Pesar 0,300 g da amostra em tubos de ensaio graduado de 50 ml (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- c) Colocar 35 ml da solução de fibra em detergente neutro (FDN). Levar os tubos ao bloco digestor a uma temperatura entre 120°C à 125°C. Colocar metade dos tubos no bloco digestor dando um intervalo de 5 a 10 minutos para colocar o restante dos tubos no bloco digestor. Cuidar para não ferver acima da temperatura indicada (controla-la a mesma), para não derramar no bloco digestor. Quando começar a ferver deixar por mais 1 hora no bloco, mexendo os tubos quando a amostra se depositar acima da solução de FDN (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- d) Colocar os gooch para secar em estufa a 105°C por 1 hora;
- e) Retirar os gooch da estufa e colocar em dessecador para esfriar por 1 hora. Após, deve-se tara-los;

- f) Filtrar em cadinho (gooch), usando pequena sucção (em bomba de vácuo). Durante a filtração, recomenda-se utilizar bastão de vidro para auxiliar na lavagem do resíduo, lavar duas vezes no mínimo, com água quente (90 à 100°C), tendo o cuidado de lavar as paredes do tubo. Fazer duas lavagens com acetona (30-40 ml) até que ela se torne incolor, em toda a amostra, a fim de que o solvente entre em contato com as partículas de fibra;
- g) Secar em estufa a 105°C, durante 4 horas, ou deixar durante a noite (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- h) Colocar em dessecador por 1 hora para esfriar e pesar;
- i) Se houver formação de espuma durante a digestão, adicionar 1,0 ml de decalina como antiespumante;
- j) 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 e 0,2 ml de amilase termoestável e incubar durante 5 minutos entre 80-90°C ou 4 horas a temperatura ambiente. A seguir, adicionar 35 ml da solução em detergente neutro, levar à ebulição com temperatura a 125°C; após 40 minutos, adicionar mais 0,2 ml de amilase termoestável, completar a digestão em até 60 minutos e seguir os procedimentos já descritos;
- k) Como a saliva é muito rica em amilase, deve-se evitar que a mesma contamine o material e os reagentes utilizados, assim não deve-se soprar a pipeta usada para medir a água, amostras e reagentes. Uma diminuição maior que 10% na absorbância do controle indica contaminação do substrato com saliva;
- l) Para limpeza dos cadinhos, estes deverão ser calcinados em forno de mufla por 1 hora a 500°C, após o término das análises (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- m) Utilizar a matéria seca a 105°C para corrigir os resultados com base em 100% da matéria seca.

5.1.5. Fórmula Final para FDN

$$\%FDN = \frac{(Gooch + Amostra) - Peso(gooch)}{Peso(Amostra)} \times 100$$

5.1.5.1. Resultado final

Considerar como fibra em detergente neutro a porcentagem dos constituintes da parede celular, calculada pela diferença entre as pesagens.

5.1.6. Ajuste à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de Fibra em Detergente Neutro na amostra

%MS(105 °C) = % de matéria seca na amostra

Ver a seguir, na Tabela 13, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 13. Determinação da % de Fibra em Detergente Neutro

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO

Nº DO PROJETO:

RESPONSÁVEL:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Identificação	Nº Cápsula	Peso Cápsula	Peso Amostra	Peso Gooch	Gooch + Amostra	% FDN	0 FDN

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

5.2. DETERMINAÇÃO DE FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (FDA)

5.2.1. Princípio

A FDA indica a digestibilidade, ou seja, a quantidade de fibra que não é digestível já que contém a maior proporção de lignina, fração de fibra indigestível. O nível máximo permitido de FDA é de 21% da matéria seca da dieta.

A FDA é um indicador do valor energético da silagem: quanto menor a FDA, maior o valor energético. Negativamente correlacionados com a digestibilidade, os valores mais altos indicam menor digestibilidade.

A fibra em detergente ácido (FDA) mede os componentes mais indigestíveis do feno, celulose e lignina. A FDA é usada para se estimar o valor de energia do alimento, expressado como energias líquidas (Eli) ou nutrientes digestíveis totais (NDT). Van Soest, (1963).

5.2.2. Material e métodos

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

- a) Estufa de secagem e esterilização (temperatura = 105°C);
- b) Cadinho filtrante de vidro borossilicato com placa porosa de vidro sinterizado, porosidade média a grossa (100 a 160 mm);
- c) Balança analítica com precisão mais ou menos 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.

5.2.3. Reagentes e soluções

A solução é preparada com reagentes químicos de grau analítico e água destilada ou deionizada.

- a) Brometo de cetil trimetilamônio - CTAB, $[C_{16}H_{33}N(CH_3)_3Br]$;
- b) Ácido sulfúrico concentrado, 97-98% (H_2SO_4);
- c) Acetona, p.a. $[(CH_3)_2CO]$;
- d) Deca-hidronaftaleno, p.a. ($C_{10}H_{18}$) (decalina - antiespumante);
- e) Solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹.

5.2.3.1. Solução de fibra detergente ácido (FDA)

- a) Colocar a metade de água destilada em um garrafão de 5000 ml;
- b) Pesar 255,4 g de ácidos sulfúricos e adicionar ao garrafão, completando a seguir o volume de 5000 ml com água destilada;
- c) Pesar 102,0 g de CTAB em um béquer de 1000 ml e diluir o CTAB com a solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) já preparada anteriormente;
- d) Colocar no agitador magnético para dissolver a solução, observando para que fique bem homogeneizada;
- e) Colocar com cuidado no garrafão devidamente calibrado e etiquetado para que não ocorra espuma.

5.2.4. Procedimento

- a) Organizar as amostras;
- b) Pesar 0,300 g da amostra em tubos de ensaio graduado de 50 ml (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- c) Colocar 35 ml da solução de fibra em detergente ácido (FDA) (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- d) Levar os tubos ao bloco digestor a uma temperatura entre 120°C a 125°C. Colocar metade dos tubos no bloco dando um intervalo de 5 a 10 minutos para colocar o restante. Cuidar para não ferver acima da temperatura indicada (controlar a mesma), para não derramar no bloco digestor. Quando começar a ferver deixar por mais 1 hora no bloco, mexendo os tubos para a amostra não subir acima da solução de FDA (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- e) Colocar os cadinhos de vidro (gooch) para secar em estufa a 105°C por 1 hora;
- f) Retirar os cadinho de vidro (gooch) da estufa e colocar em dessecador para esfriar. Após, tará-los;

- g) Filtrar em cadinho de vidro (gooch), usando pequena sucção (em bomba de vácuo). Dispersar o resíduo com bastão de vidro e lavar duas vezes, no mínimo, com água quente (90 a 100°C), tendo o cuidado de lavar as paredes do tubo até sair todo o resíduo da amostra (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- h) Fazer duas lavagens com acetona (30-40 ml) até que a amostra se torne incolor, em toda a amostra, afim de que o solvente entre em contato com as partículas da fibra;
- i) Secar em estufa a 105°C, durante 4 horas, ou deixar durante a noite (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado);
- j) Colocar em dessecador por 1 hora para esfriar e pesar.

Ver a seguir, na Tabela 14, modelo de ficha para apresentação de resultados.

5.2.5. Fórmula Final para FDA

$$\%FDA = \frac{(Gooch + Amostra) - Peso(gooch)}{Peso(Amostra)} \times 100$$

5.2.6. Ajuste à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de Fibra em Detergente Ácido na amostra

%MS(105 °C) = % de matéria seca na amostra

TABELA 14. Determinação da % de Fibra em Detergente Ácido.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO

Nº DO PROJETO:

RESPONSÁVEL:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Identificação	Nº Cápsula	Peso Cápsula	Peso Amostra	Peso Gooch	Gooch + Amostra	%FDA	0FDA

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

5.3. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA EM DETERGENTE ÁCIDO (LDA)**5.3.1. Princípio**

O termo lignina é usado para designar um grupo de substâncias com unidades básicas químicas semelhantes. A determinação da lignina é feita a partir da fibra em detergente ácido (celulose, lignina, cutina, minerais e sílica). Existem dois métodos de determinação: o método do ácido sulfúrico a 72% e do permanganato de potássio. A escolha de um ou outro método vai depender do tipo de material a ser analisado e do objetivo dos dados que se quer obter.

O detergente remove a proteína e outros materiais solúveis em ácido, os quais interferem com a determinação da lignina. O princípio do processo é o de que o resíduo da fibra em detergente ácido é primeiramente lignocelulose no qual a celulose é dissolvida pela solução de H_2SO_4 a 72%. O resíduo remanescente consiste de lignina e cinzas insolúveis em ácido: entretanto, em amostra contendo altas quantidades de cutina, ela será medida como parte da lignina. Quicke, (1959).

A maioria dos vegetais superiores contém, pelo menos, alguma fração de lignina. O conteúdo de lignina varia de 4 a 12%, podendo chegar, nas forrageiras mais fibrosas, a 20 % da matéria seca. É a fração menos digestível do alimento. Van Soest, (1968).

5.3.2. Material necessário

- a) Estufa de secagem e esterilização (temperatura = 105°C);
- b) Cadinho filtrante de vidro borossilicato com placa porosa de vidro sinterizado, porosidade média grossa (100 a 160 mm);
- c) Balança analítica com precisão mais ou menos 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 x 250 mm;
- h) Sistema de vácuo;
- i) Bandeja de vidro ou plástica apropriada;
- j) Bastão de vidro (bastonetes).

5.3.3. Reagentes e soluções

Está solução deve ser preparada com reagentes químicos de grau analítico

e água destilada e deionizada.

a) Ácido sulfúrico concentrado, 97-98% (H_2SO_4);

b) Solução de ácido sulfúrico a 72%;

c) Solução de fibra em detergente ácida;

d) Acetona p.a.;

e) Água destilada ou deionizada quente.

5.3.3.1. Solução de H_2SO_4 a 72%

a) Preparar dentro da capela devido à liberação de gases tóxicos;

b) Em uma proveta de 1000 ml, medir 280 ml de água destilado ou deionizada e adicionar 720 ml de H_2SO_4 concentrado;

c) Deixar esfriar e completar o volume, somente uma vez, com água destilada;

d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

5.3.4. Procedimento

a) Pesar 0,700 g de amostra em tubo de ensaio de 50 ml, (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/ Embrapa Clima Temperado);

b) Determinar a fibra em detergente ácido FDA (conforme item 5.2);

c) Cobrir o cadinho filtrante (porosidade N°1) com ácido sulfúrico a 72% (AS-72%) a 15°C. Mexer com bastão de vidro até formar uma pasta macia, com objetivo de desmanche de todos os grumos;

d) Encher o cadinho filtrante com ácido sulfúrico a 72% (AS-72% mais ou menos pela metade) e homogeneizar. Deixe o bastão de vidro dentro do cadinho;

e) À medida que o ácido vai sendo filtrado, colocar mais ácido sulfúrico a

72% (AS-72%); não é necessário encher o cadinho. Proceder assim a cada hora, três adições são suficientes;

f) Deixar o cadinho durante 3 horas em repouso à temperatura ambiente;

g) Filtrar o cadinho em sistema de vácuo para retirar o máximo de ácido sulfúrico 72% da amostra;

h) Lavar a amostra com água quente até que esteja livre de ácido sulfúrico 72%. Sempre mexendo com bastão de vidro; lavar o bastão durante a lavagem até que esteja livre de resíduo de amostra;

i) O cadinho com a amostra deve ser colocado em estufa a 105°C por 4 horas;

j) Pesar o cadinho com a amostra e anotar o peso em ficha apropriada;

k) Incinerar a amostra em forno de mufla a 550°C por 4 horas, sendo que a temperatura deve ser aumentada de 100 em 100°C para evitar-se a quebra dos cadinhos filtrante (gooch), pois materiais de vidro sofrem danificações a temperaturas bruscas elevadas; após essa etapa colocar no dessecador e pesar novamente; anotar o peso em ficha apropriada (modificação implantada no LBNA/Embrapa Clima Temperado).

5.3.5. Fórmula

$$\%Lig = \frac{PAAc - PC}{PA} \times 100$$

Onde:

%Lig = Percentual de lignina ácido

PAAc = Peso da amostra ácida

PC = Peso do cadinho (gooch)

PA = Peso da amostra

5.3.6. Correção à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de Lignina ácido na amostra

%MS(105 °C) = % de matéria seca na amostra

5.4. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA – MÉTODO DO PERMANGANATO

5.4.1. Material necessário

- a) Bandeja plástica ou de vidro (profundidade mínima de 4 cm);
- b) Bomba a vácuo.

5.4.2. Reagentes e soluções

- a) Etanol p.a 95% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$);
- b) Ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- c) Ácido clorídrico (HCl);
- d) Permanganato de potássio p.a. (KMnO_4);
- e) Nitrato férrico p.a. [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$];
- f) Nitrato de prata p.a. (AgNO_3);
- g) Acetato de potássio p.a. ($\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$);
- h) Ácido acético glacial (CH_3COOH);
- i) Álcool butílico terciário p.a. [$(\text{CH}_3)_3\text{COH}$].

5.4.2.1. Solução de etanol 80% v/v

- a) Misturar 845 ml de etanol p.a. 95% com 155 ml de água destilada.

5.4.2.2. Solução desmineralizante

- a) Pesar 50 g de ácido oxálico e dissolver em 700 ml de etanol p.a. 95%;
- b) Transferir para balão volumétrico de 1.000 ml;
- c) Adicionar 50 ml de ácido clorídrico 12 N, deixar esfriar, aferir e homogeneizar;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

5.4.2.3. Solução de permanganato de potássio 5%

- a) Pesar 50 g de permanganato de potássio p.a. e dissolver gradativamente sob aquecimento em mais ou menos 400 ml de água destilada;
- b) Transferir para balão volumétrico de 1.000 ml, lavando o recipiente da dissolução com água destilada. Deixar esfriar, aferir e homogeneizar;
- c) Guardar esta solução em frasco âmbar livre da incidência direta da luz solar.

5.4.2.4. Solução tampão

- a) Pesar 6 g de nitrato férrico p.a. e 0,15 g de nitrato de prata p.a. e dissolver em 100 ml de água destilada;
- b) Dissolver 5,0 g de acetato de potássio p.a. em 500 ml de ácido acético glacial p.a.; adicionar, à primeira solução, com mais 400 ml de álcool butílico terciário p.a. e homogeneizar;
- c) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado

5.4.2.5. Solução combinada

- a) Misturar a solução de permanganato de potássio e a tampão na razão 2:1 v/v, respectivamente;
- b) Esta solução deve ser guardada por uma semana, no máximo, em refrigerador, e na ausência de luz, caso não venha a ser utilizada;
- c) A coloração normal desta solução é violeta;
- d) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

5.4.3. Procedimento

- a) Pesar 0,700 g de amostra em tubo de ensaio de 50 ml, (modificação implantada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal-LBNA/ Embrapa Clima Temperado);
- b) Colocar os cadinhos, contendo a fibra em detergente ácido (conforme item 5.2); em bandeja com uma camada de água de 2-3 cm de altura;
- c) Adicionar 30 ml da solução combinada (conforme item 5.4.2.5) em cada cadinho;
- d) Observar que o nível da solução e da água na bandeja seja o mesmo;
- e) Colocar um bastão de vidro em cada cadinho, a fim de agitar o conteúdo do mesmo, deixando-o por 90 minutos;
- f) Filtrar a solução combinada por sucção a vácuo, renovar a água da bandeja e colocar 20 ml da solução desmineralizante;
- g) Agitar o meio e deixar por mais ou menos 10 minutos, succionar e renovar a solução desmineralizante (20 ml). Deixar por 30 minutos, agitando duas vezes;
- h) Lavar com etanol 80% e acetona, respectivamente, por duas vezes com quantidade suficiente para cobrir a amostra;
- i) Secar os cadinhos por, no mínimo, 4 horas em estufa a 105°C. Esfriar em dessecador e pesar;

j) Incinerar em forno de mufla a 500°C por 2 horas. Esfriar em dessecador e pesar.

5.4.4. Resultados

$$\%Lig = \frac{A - B}{PA \times \%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

$$\%Cel = \frac{B - C}{PA \times \%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%Lig = Percentual de lignina

%Cel = Percentual de celulose

PA = Peso da amostra

MS(105°C) = Matéria seca a 105°C

A = Peso do cadinho + FDA

B = Peso do cadinho + Celulose + cinza residual

C = Peso do cadinho + cinza residual

5.4.5. Correção à base de 100 % da matéria seca

$$Base\ sec\ a = \frac{\%resultado}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100$$

Onde:

%resultado = % de Lignina ácida na amostra

%MS(105°C) = % de matéria seca na amostra

Ver a seguir, na Tabela 15, modelo de ficha para apresentação de resultados.

TABELA 15. Determinação da % de Lignina Ácida

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

DETERMINAÇÃO DA % DE LIGNINA ÁCIDA

Nº DO PROJETO:

RESPONSÁVEL:

DATA:

Nº do Lote:

Amostra Nº	Identificação	Nº Gooch	Peso Amostra	Peso Gooch	Gooch + Amostra Ac.	Gooch + Cinza	% Lig.	0 Lig.

Análises corrigidas a 100% da Matéria Seca a 105°C

6. VALOR RELATIVO NUTRICIONAL (V.R.N.)**6.1. PRINCÍPIO**

É um índice que mede a quantidade da silagem ou forragens em geral, combinando a Digestibilidade e o Potencial de Ingestão. Uma forrageira de ótima qualidade apresenta valor relativo nutricional (V.R.N.) de mais ou menos 150. Peixoto (1993).

A forragem de referência é a alfafa em floração plena (41% F.D.A. e 53% F.D.N.) para qual se fixou um V.R.N. igual a 100.

O cálculo do V.R.N. pode ser feito através da fórmula a seguir.

6.2. FÓRMULA

$$VRN = \frac{(DMS \times IMS)}{1,29}$$

$$DMS = 88,9 - (0,779 \times FDA)$$

$$IMS = \frac{120}{FDN}$$

Onde:

VRN = Valor relativo nutricional

D.M.S. = Digestibilidade da matéria seca

I.M.S. = Ingestão da matéria seca

6.3. COMENTÁRIO

Na prática, o conhecimento do V.R.N. faz com que haja um direcionamento em função do potencial do animal. Quanto maior o V.R.N. melhor o seu aproveitamento pelos animais de alto potencial produtivo.

7. AVALIAÇÃO ENERGÉTICA DOS ALIMENTOS

7.1. INTRODUÇÃO

Na Zootecnia, em nutrição animal, existe um tema dos mais importantes para o qual a informação, embora em abundância, não se encontra abordada de modo completo nas literaturas existentes. Trata-se do estudo do valor nutritivo dos alimentos, assim como a maneira de expressá-lo, de forma prática, de modo a permitir o cálculo de rações balanceadas. É muito difícil, se não impossível, estabelecer um denominador comum em relação ao valor nutritivo dos alimentos, já que uma forragem rica em proteína, por exemplo, pode ser pobre em vitaminas ou mineral. A farinha de osso, por exemplo, é excelente como fornecedora de minerais, mas,

praticamente a isso limita-se o seu valor. Não é compatível, por exemplo, com o farelo de soja, cuja função na ração é a de um suplemento protéico. Ambos, dentro das suas finalidades, são importantes e necessários, face às diferentes exigências nutritivas dos animais, a fim de tornar os alimentos compatíveis, no aspecto da nutrição animal, com o aspecto econômico. Peixoto (1993).

Por esse motivo, cientistas de vários países pesquisaram metodologias que permitissem o desenvolvimento de padrões em vários centros de pesquisa, destacando-se os europeus e os americanos. Todos foram unânimes em fixar que o principal valor de um alimento está no seu conteúdo energético. A condição principal para o organismo animal é o fornecimento de quantidades adequadas de energia, necessárias ao desenvolvimento e manutenção de suas funções vitais. (De nada adianta riqueza em nutrientes como o ligoelementos, vitaminas, aminoácidos etc.). A energia que o organismo animal requer provém da matéria orgânica que compõe o alimento, que pode provir, tanto dos hidratos de carbono, das gorduras, bem como das proteínas. Todos esses nutrientes são importantes para, uma vez assimilados pelo animal, cederem energia.

Deseja-se obter uma idéia de uma magnitude, fazendo-se a sua mensuração, ou seja, comparando-a com outra magnitude bem conhecida, considerada como unidade padrão. Então, a amostra padrão com valor conhecido, serve para fazer as comparações com os valores medidos nas amostras estudadas.

São características fundamentais das unidades de medida:

- Valores conhecidos universalmente;
- Rigorosamente constantes desde um ponto de vista quantitativo;
- Homogêneas com as magnitudes que se medem, desde um ponto de vista qualitativo;
- Proporcionais nas magnitudes que se medem.

A magnitude que se mede, neste caso, é o valor nutritivo das forragens,

ou mais precisamente, o valor energético. Veremos mais adiante, como os diversos métodos preconizados preenchem esses requisitos. Teixeira (1998).

7.2. FÓRMULAS DE CÁLCULOS DAS ENERGIAS PARA SILAGENS

7.2.1. Nutrientes digestíveis totais (NDT)

Nutrientes digestíveis totais (NDT) é uma medida do valor energético dos alimentos usada nos Estados Unidos, sendo muito conhecida no Brasil.

A sua determinação baseia-se na determinação química, dentro do esquema de Weende, dos componentes orgânicos do alimento, e do conhecimento dos correspondentes coeficientes de digestibilidade.

Determina-se a fibra em detergente ácido; após, aplica-se na Fórmula do NDT que se segue:

$$NDT = 87,84 - (0,7 \times \%FDA)$$

7.2.2. Digestibilidade da matéria seca (DMS)

A digestibilidade é a relação entre a quantidade de alimento que o animal ingere e a que digere, sendo esta última aquela parcela que é efetivamente assimilada, que entra no metabolismo propriamente dito do organismo animal.

Determina-se a fibra em detergente ácido; após, aplica-se na Fórmula da DMS que segue:

$$DMS = 88,9 - (0,779 \times \%FDA)$$

7.2.3. Energia digestível (ED)

Energia digestível de um alimento é a energia expressa em calorias provenientes da diferença da sua energia bruta e da energia bruta contida nas fezes ($ED = E.B.A. - E.B.F.$). É, no entanto, essencialmente, um

conceito que envolve a fase da digestibilidade do animal.

Pode-se, assim, obter o valor dos alimentos expressos em E.D. a partir de valores conhecidos de NDT, considerando que 1 kg de N.D.T., contém 4,4 quilocalorias, conforme foi estabelecido por Crampton e Harris (1969) e outros autores que tomaram como base trabalhos em que foram feitas determinações, simultaneamente, de N.D.T. e E.D. Enfim, para se obter a Energia Digestível, utiliza-se a fórmula abaixo:

$$ED = NDT \times 0,04409$$

7.2.4. Energia metabolizável (EM)

Como viu-se anteriormente, a E.D. leva em conta somente a perda que ocorre nas excreções sólidas, que embora seja a de maior magnitude, não é a única. Perdas ocorrem também na urina e nos chamados gases de combustão (metano) provenientes de fermentações, principalmente por parte dos ruminantes.

A medida energética que leva em consideração tais perdas é a chamada Energia Metabolizável, constituindo-se, pois, em um sistema perfeito.

Da fibra em detergente ácido, calcula-se o NDT, e do NDT calcula-se a energia metabolizável, conforme fórmula abaixo.

$$EM = ED \times 0,82$$

7.2.5. Fibra bruta (FB)

O termo fibra bruta engloba as frações de celulose e lignina insolúvel. Do ponto de vista químico, fibra bruta é a parte dos carboidrato resistente ao tratamento sucessivo com ácido e base diluídos.

Fibra bruta em si não é um nutriente. Integram-se nutrientes como a celulose e hemiceluloses, mas também a lignina, substância orgânica de composição variável e não bem definida, altamente indigestível.

A partir da fibra em detergente ácido aplica-se a equação abaixo:

$$FB = FDA \times 0,83$$

7.2.6. Energia líquida (EL)

É sabido que após uma refeição há, no organismo animal, uma elevação de temperatura, elevação essa que variará com a natureza dos alimentos digeridos. Tal elevação de temperatura é chamada de “incremento de calor” e considerada inútil já que, como se sabe, o animal é incapaz de transformar energia térmica em outra forma de energia.

Ao deduzir-se o incremento de calor da Energia Metabolizável, obtém-se o que chamamos de Energia Líquida, ou seja, aquela parte da energia bruta do alimento que é efetivamente útil ao metabolismo do animal.

Esta concepção do valor energético da forragem é considerada teoricamente a mais perfeita.

$$EL = \frac{EM - IC}{MSA} = KCal / KG(de \ MS)$$

Onde:

EL = Energia líquida

EM = Energia metabolizável

IC = Incremento de calor

MSA = Matéria seca do alimento

7.3. FÓRMULAS DE CÁLCULOS DAS ENERGIAS PARA RAÇÃO ANIMAL

7.3.1. Nutrientes digestíveis totais % (NDT)

7.3.1.1. Ração Total

$$NDT = 93,53 - (1,03 \times FDA)$$

7.3.1.2. Ração Concentrada

$$NDT = 81,41 - (0,60 \times FB)$$

7.3.1.3. Milho (grão)

$$NDT = 99,72 - (1,927 \times FDA)$$

7.3.1.4. Grãos Pequenos

$$NDT = 4,898 + (EL \times 40,767)$$

7.3.2. Energia líquida lactação (Mcal/kg)

7.3.2.1. Ração Total

$$EL = (NDT \times 0,0245) - 0,12$$

7.3.2.2. Ração Concentrada

$$EL = (NDT \times 0,0245) - 0,12$$

7.3.2.3. Milho (grão)

$$EL = \{1,036 - (0,0203 \times FDA)\} / 0,454$$

7.3.2.4. Grãos Pequenos

$$EL = \{0,9265 - (0,00793 \times FDA)\} / 0,454$$

7.4. ENERGIA LÍQUIDA DE MANTENÇA (ELM) (MCAL/KG)

$$ELm = \{(1,37 \times EM) - (1,12) - (0,137 \times EM^2) + (0,0105 \times EM^3)\} \times 0,454$$

7.5. ENERGIA LÍQUIDA DE GANHO (ELG) (MCAL/KG)

$$ELg = \left\{ (1,42 \times EM) - (1,65) - (0,174 \times EM^2) + (0,0122 \times EM^3) \right\} \times 0,454$$

8. MACRONUTRIENTES (N, P, K, CA E MG) EM PLANTAS E RESÍDUOS ORGÂNICOS

8.1. PRINCÍPIO

Esta metodologia possibilita determinar cinco macro elementos com uma única digestão por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) com mistura de digestão. A recuperação destes nutrientes é semelhante à obtida com os métodos de Kjeldahl Bremner (1965) para N e por digestão nitro-perclórica para os outros nutrientes. Johnson; Ulrich (1959).

Os métodos de determinação selecionados são isentos de interferências nas condições recomendadas.

8.2. METODOLOGIA ADOTADA

A mistura de H_2O_2 mais H_2SO_4 propicia uma pré-digestão da amostra atingindo uma temperatura de 180°-190°C. Esta oxidação parcial de compostos orgânicos evita a formação de espuma e a frequente perda de material após a adição de H_2SO_4 , no início do aquecimento Tedesco, (1982).

Deve-se elevar e manter a temperatura a 350°-375°C para obter a digestão completa do material no bloco digestor (verificar a temperatura com termômetro).

São utilizados para a digestão das amostras tubos de ensaio (também denominados de tubos de digestão) de 25x250 mm em vidro pyrex. Estes tubos devem ser adquiridos já marcados nas capacidades de 20 e 50 ml.

A diluição no próprio tubo de digestão facilita o procedimento. O erro visual é de aproximadamente 1 %. A homogeneização da mistura é feita com ar comprimido (utilizando bomba de laboratório, com filtro na linha do

ar para evitar contaminação das amostras com óleo). Pode-se, também, agitar no próprio tubo com agitador “vortex”.

Após a decantação (6 – 12 horas), são retiradas alíquotas do extrato para as várias determinações, não havendo necessidade de filtração.

8.2.1. Nitrogênio

O teor de N varia com a espécie, variedade botânica, cultivar, parte do desenvolvimento e estado nutricional da planta. Em geral situa-se entre 0,5 e 5%.

A recuperação quantitativa do N é dificultada pela presença no tecido vegetal de compostos heterocíclicos “refratários” como o nicotínico e piridina, ou outros contendo ligações N-N e N-O. Devem ser utilizados, portanto, na digestão, catalisadores (cobre e selênio) e alta temperatura (esses são os motivos de se utilizar temperatura entre 350°-375°C): a adição de sais como Na_2SO_4 eleva o ponto de ebulição do ácido.

O procedimento adotado é baseado no método recomendado por Bremner (1965) para solos, com inclusão da H_2O_2 . As proporções de reagentes foram mantidas.

Para a determinação do NH_4^+ , uma alíquota de 10-20 ml é destilada em micro-destilador, conforme descrito por Bremner e Edwards (1965) e modificado por Tedesco e Gianello (1979), após a adição de NaOH, coletando-se o destilado em indicador ácido bórico e titulando-se com H_2SO_4 diluído.

8.2.2. Fósforo

O teor de P no tecido vegetal varia em geral entre 0,08 e 1,5%.

Adiciona-se uma alíquota do extrato após adição de molibdato de amônio e ácido aminonaftolsulfônico e determina-se por espectrofotometria. Este método possui sensibilidade adequada sendo livre de interferências por H_2O_2 e sais da mistura de digestão.

8.2.3. Potássio

O teor de K no tecido vegetal varia na maior parte dos casos entre 0,2 e 10%.

É determinado por fotometria de chama após a diluição do extrato, ajustando-se a sensibilidade do aparelho para os padrões adequados.

A presença de Na = (aproximadamente 420 mg/L⁻¹) não causa interferência, observando-se, entretanto, o efeito supressor de ionização Tedesco (1982).

8.2.4. Cálcio e Magnésio

Os teores de Ca no tecido vegetal variam geralmente entre 0,05 e 2,5%, e os de Mg entre 0,02 e 1,5%. São determinados por espectrofotometria de absorção atômica após a diluição do extrato e a adição de La ou Sr em solução ácida.

8.3. MATERIAL NECESSÁRIO

- a) Bloco digestor para tubos de digestão de 25 x 250 mm com controle eletrônico de temperatura com capacidade para 40 provas;
- b) Espectrofotômetro de absorção atômica;
- c) Fotômetro de chama;
- d) Espectrofotômetro (visível);
- e) Destilador de arraste de vapor (micro-Kjeldahl), conforme descrição no capítulo;
- f) Microbureta de 5 ml com carregamento automático (graduação de 0,01 ml).

8.4. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄);
- b) Peróxido de hidrogênio (H₂O₂);

- c) Sulfato de sódio (Na_2SO_4);
- d) Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- e) Hidróxido de sódio (NaOH);
- f) Ácido bórico (H_3BO_3);
- g) Molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,38%.

8.4.1. Solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30%

- a) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30%: É volatilizado o O_2 com o tempo, necessitando de armazenamento em frasco adequado protegido da luz (pode ser usado o produto comercial de 130 volumes, de baixo custo).

8.4.2. Mistura de digestão

- a) Moer 100 g de Na_2SO_4 , 10 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1 g de selênio (ou selenito, fazer conversão teor de água, para calcular o peso necessário de selenito em equivalência ao selênio), e misturar bem.

8.4.3. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 mol

- a) Dissolver 400 g de NaOH (produto técnico) em 800 ml de H_2O destilada em copo de béquer de pyrex (ou aço inox);
- b) Após esfriar, transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar o volume;
- c) Guardar em recipiente plástico.

8.4.4. Solução de indicador de ácido bórico

- a) Pesar 40 g de ácido bórico em um béquer de 1000 ml dissolvendo o ácido com água destilada quente (em torno de 400 ml de água destilada);
- b) Deixar esfriar e transferir para o balão volumétrico de 2000 ml;
- c) Medir 40 ml de solução obtida pela dissolução de 0,660 g de verde de bromocressol e 0,330 g de vermelho de metila em balão de 100 ml de

etanol 95% (produto técnico), em proveta de 50 ml, e 400 ml de álcool etílico ou comum em proveta de 500 ml;

d) Misturar as soluções no balão volumétrico de 2000 ml e adicionar cuidadosamente cerca de no máximo 9 ml de NaOH 0,1N sendo que deve ser colocado de 1 ml em 1 ml, até que observe-se uma mínima mudança de cor de roxo para verde claro;

e) Para saber se a solução está pronta, adicionar em um béquer de 50 ml, 1 ml de água destilada e colocar 1 ml do indicador de ácido bórico. (O ponto de viragem é verde claro);

f) Completar o volume com água destilada e homogeneizar. Guardar em frasco escuro.

8.4.5. Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,025 mol

a) Dissolver 1,4 ml de H_2SO_4 concentrado e elevar a 1000 ml com água destilada (1 ml desta solução gasto na titulação corresponde a 700 μg de N).

8.4.6. Solução de molibdato de amônio

8.4.6.1. Preparo de 10 L de solução P-B (HCl 0,87M e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,38%):

a) Dissolver 38,0 g de molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,38% em 1500 ml de água destilada previamente aquecida a 60°C em copo de béquer de 2.000 ml;

b) Deixar esfriar e transferir para um balão volumétrico de 2.000 ml e completar o volume com água destilada;

c) Transferir para um tambor plástico com capacidade de 10 L;

d) Colocar aproximadamente 800 ml de água destilada ou deionizada em balão volume de 2.000 ml;

e) Adicionar 707 ml de HCl concentrado ($d = 1,191:37,7\%$ e 12,31M) e

agitar (se o ácido não tiver estas especificações consultar a Tabela 21 para a modificação da quantidade a usar);

f) Completar o volume com água destilada e agitar;

g) Transferir para o tambor plástico de 10 L onde já se encontra a solução de molibdato de amônio e agitar;

h) Adicionar 6 L de água destilada ou deionizada utilizando balões volumétricos de 2.000 ml e agitar bem o tambor para uma perfeita homogeneização da solução.

8.4.6.2. Preparo da solução P-C (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, sulfito de sódio e metabissulfito de sódio):

a) Preparar um estoque de pó redutor, misturando e triturando em um almofariz os seguintes reagentes:

I. ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico: 2,50 g;

II. sulfito de sódio (Na_2SO_3): 5 g;

III. metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$): 146 g.

b) Guardar o pó redutor em vidro fosco, envolto com folha de alumínio (no máximo 40 dias);

c) Dissolver 32 g do pó redutor (item I, II e III) em 200 ml de água destilada morna (50°-60°C) em copo de béquer;

d) Transferir para um vidro e deixar em repouso até cristalizar. O tempo de cristalização é de 3 a 6 dias. Depois de cristalizado pode ser filtrado. É necessário preparar nova solução a cada 3 semanas.

8.4.7. Solução de estrôncio a 0,3% em HCl 0,2 M

a) Diluir 5,42 g de SrCl_2 e 16,7 ml de HCl concentrado a 1 L com água destilada ou deionizada.

8.4.8. Solução de magnésio (1.200 mg L^{-1} de Mg^{2+})

- a) Pesar 0,600 g de Mg metálico. Dissolver em 10 ml de HCl a 50%. Completar o volume a 500 ml com água destilada ou deionizada.

8.4.9. Solução de padrão misto de P, K, Ca e Mg

- a) Pesar 1,999 g de CaCO_3 (seco a 105°C por 2 horas) e colocar em balão volumétrico de 1 litro;
- b) Adicionar 20 ml de HCl 50% para dissolver. Adicionar 1,318 g de KH_2PO_4 e 3,472 g de KCl (secos a 105°C por 2 horas);
- c) Adicionar 200 ml da solução de magnésio (com $1,200 \text{ mg/L}$ de Mg) e completar o volume com água destilada;
- d) Esta solução contém 300 mg/L de P, $2,200 \text{ mg/L}$ de K, 800 mg/L de Ca e 240 mg/L de Mg.

8.5. PROCEDIMENTO

8.5.1. Digestão das amostras

- a) Pesar 0,200 g da amostra e colocar em tubo de digestão seco. (usar funil de haste longa e diâmetro interno de 10 mm);
- b) Adicionar 1 ml de H_2O_2 ;
- c) Adicionar vagarosamente 2 ml de H_2SO_4 concentrado (a reação é rápida); fazer o procedimento na capela;
- d) Adicionar 0,7 g da mistura de digestão (usar medida calibrada (dosador) e funil de haste longa e diâmetro interno de 10 mm);
- e) Colocar no bloco digestor a $160^\circ\text{--}180^\circ\text{C}$ até evaporar a água, para evitar projeção do líquido para fora do tubo (a solução escurece devido à oxidação de compostos orgânicos solúveis não decompostos, por apresentar temperatura mais baixa);

- f) Aumentar a temperatura à 350°-375°C. Após clarear (cor amarelo-esverdeada) manter esta temperatura por 1 hora;
- g) Retirar os frascos do bloco e deixar esfriar (colocar o conjunto numa placa de amianto ou madeira para evitar choque térmico);
- h) Completar o volume com água destilada até a marca de aferição de 50 ml (o tubo deve ter a temperatura de 50°-60°C, suportável ao tato, para evitar solidificação da amostra);
- i) Agitar com ar comprimido (usar um tubo capilar ou pipeta de 1 ml, colocando um filtro de algodão no tubo flexível. Lavar e enxaguar o capilar entre o processamento de cada amostra);
- j) Transferir para frascos “snap-cap” de 90 ml. Deixar decantar algumas horas antes de retirar as alíquotas para as determinações de P, K, Ca e Mg (pode-se, também, deixar decantando durante a noite).

8.5.1.1. Observações

- a) Para as curva padrão, medir (com microbureta) 0,0 – 0,5 – 1,0 – 2,0 – 3,5 e 5,0 ml da solução padrão misto para tubos de digestão, seguindo o procedimento descrito a partir do item 8.5.1.b. Após a diluição a 50 ml, ter-se-á (Tabela 16):

TABELA 16. Diluições para 50 ml da digestão da amostra.

ml de padrão: mg/L ⁻¹	0,0	0,5	1,0	2,0	3,5	5,0
P	0,0	3,0	6,0	12,0	21,0	30,0
K	0,0	22,0	44,0	88,0	154,0	220,0
Ca	0,0	8,0	16,0	32,0	56,0	80,0
Mg	0,0	2,4	4,8	9,6	16,8	24,0

- a) Com as diluições e os métodos de determinação descritos abaixo, as concentrações finais serão em mg/L-1 (Tabela 17):

TABELA 17. Concentrações finais

P	0,0	0,5	1,0	2,0	3,5	5,0
K	0,0	2,0	4,0	8,0	14,0	20,0
Ca	0,0	2,0	4,0	8,0	14,0	20,0
Mg	0,0	0,2	0,4	0,8	1,4	2,0

a) Não é necessário repetir a curva a cada bateria (quando em trabalho continuado com as mesmas soluções e condições de trabalho), mas somente a prova em branco e 2 padrões.

8.5.2. Determinação de nitrogênio (N)

a) Pipetar 10 ml do extrato para balão de destilação de 100 ml (ajustar a vazão do vapor a 35-40 ml em 3 a 4 minutos);

b) Adicionar 5 ml de NaOH 10 mol/L⁻¹ e iniciar a destilação imediatamente (receber o destilado em erlenmeyer de 50 ml contendo 5 ml de indicador de ácido bórico);

c) Destilar até coletar 35-40 ml;

d) Titular com H₂SO₄ 0,025 mol (usar microbureta de 5 ml).

8.5.2.1. Observações

a) Iniciar com a prova em branco e observar se o valor obtido é aceitável;

b) A determinação de N é geralmente feita por último, não sendo afetada pela presença do precipitado na alíquota;

c) O tempo requerido para a digestão, em geral, é menor nas análises de tecido, devido a menor quantidade de compostos refratários presentes;

d) Cada ml de H₂SO₄ 0,025 mol utilizado na titulação (descontando o branco) corresponde a 700 µg/L⁻¹ de N. Caso a concentração do ácido utilizado for diferente desta, calcular a concentração de N utilizando o fator;

e) A sensibilidade do método (com as especificações dadas) é de 0,017% de N (para 0,01 ml de ácido utilizado na titulação). Maior sensibilidade pode ser obtida destilando 20 ml do extrato;

f) Para maiores detalhes quanto à operação do destilador semimicro-kjeldahl consultar o manual do aparelho.

8.5.2.2. Cálculos

a) Utilizar a fórmula:

$$\%N = \frac{\left(ml \ H^+ am - ml \ H^+ br \right) \times 700 \times 5 \times 5}{10.000}$$

(no caso de utilizar 0,200 g da amostra, destila-se 10 ml do extrato (após a diluição a 50 ml) e titula-se com H_2SO_4 0,025 mol).

b) Expressar o resultado em % de N (mm^{-1}), com 2 dígitos decimais.

8.5.3. Determinação de fósforo (P)

a) Transferir uma alíquota de 1 ml do extrato obtido através da digestão da amostra para copo plástico descartável de 50 ml. (usar seringa calibrada);

b) Adicionar 2 ml de água destilada. (usar seringa calibrada);

c) Adicionar 3 ml de solução P-B. (usar seringa calibrada);

d) Adicionar 3 gotas de solução P-C;

e) Agitar e determinar a absorbância em 660 nm após quinze minutos. (após 20-35 minutos em dias frios).

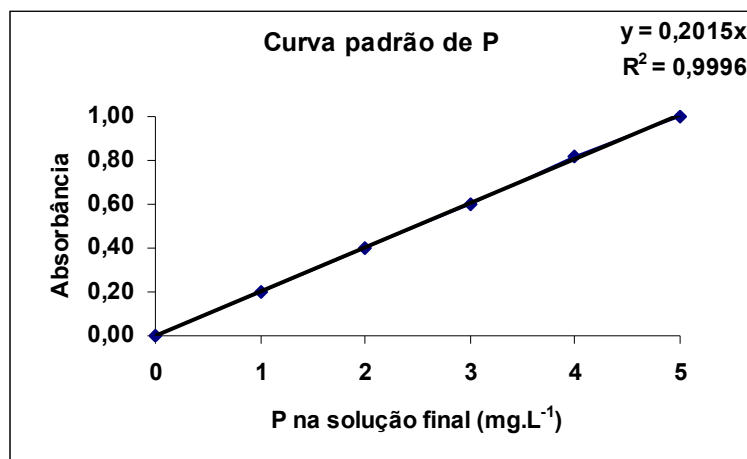
8.5.3.1. Observações

a) Utilizar as mesmas seringas calibradas para a preparação das amostras e padrões;

- b) Amostras com alto teor de P (absorbância situada fora da parte reta da curva padrão) devem ser diluídas convenientemente com o extrato da prova em branco;
- c) A sensibilidade do método (absorbância igual 0,002) corresponde a aproximadamente 0,0015% de P na amostra. Pode-se determinar até aproximadamente 0,66% de P na amostra sem diluição;
- d) Para leitura direta, pode-se ajustar o valor de 0,30% com o padrão de 2,0 mg/L⁻¹ de P.

8.5.3.2. Cálculos

- a) Curva padrão de P;



- b) Fator de concentração; É determinado pela curva padrão.
- c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{50}{0,20} \times \frac{3}{1} \times \frac{6}{3} = 1,500$$

A diluição pelo P-C não está sendo considerada.

a) Teor de P;

$$P(\%) = \frac{L \times FC \times FD}{10.000}$$

Onde:

P(%) = é o teor de fósforo em porcentagem

L = Leitura

FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

b) Expressar o resultado em % de P (mm⁻¹), com 2 dígitos decimais.

8.5.4. Determinação de potássio (K)

a) Retirar uma alíquota de 1 ml e transferir para um copo plástico descartável. (usar seringa calibrada);

b) Adicionar 10 ml de água destilada ou deionizada;

c) Determinar a emissão de luz no fotômetro de chama.

8.5.4.1. Observações

a) Nos fotômetros que dispõem de controle de sensibilidade, ajusta-se o máximo da escala com padrão adequado conforme as amostras. Se houver amostras com baixo teor, estas podem ser determinadas utilizando como ajuste máximo um padrão intermediário. As amostras com teor alto de K podem ser analisadas utilizando como ajuste máximo o padrão maior. Evita-se assim a necessidade de diluir as amostras;

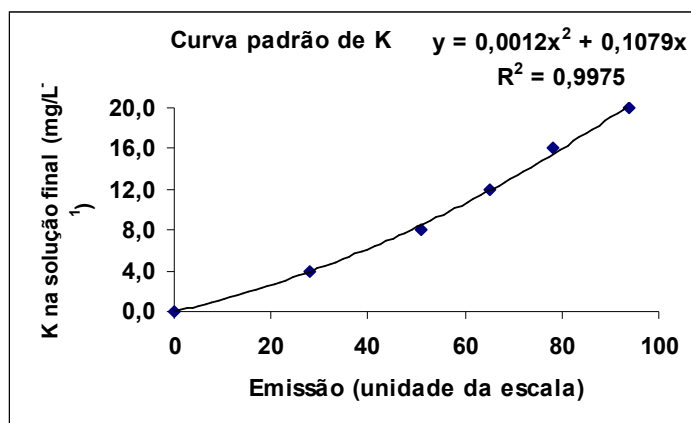
b) A sensibilidade do método (leitura = 1), para o caso de ajustar o ponto 100 da escala com o padrão de 8 mg/L⁻¹ de K na solução final corresponde a 0,022% de K na amostra. O teor máximo que pode ser determinado com

a diluição recomendada é de 5,5% de K na amostra (ajustando-se a leitura 100 com o padrão de 20 mg/L⁻¹);

c) Para leitura direta em fotômetro com escala iluminada fixa pode-se desenhar uma escala (em %) sobreposta à escala do aparelho, ajustando-se o valor de 2,2% para o padrão de 8 mg/L⁻¹.

8.5.4.2. Cálculos

a) Curva padrão de K;



b) Concentração na solução final (cs), determinada pela curva padrão;

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{50}{0,20} \times \frac{11}{1} = 2,750$$

d) Teor de K;

$$K(\%) = \frac{L \times CS \times FD}{10000}$$

Onde:

$K(\%)$ = é o teor de potássio em porcentagem

L = Leitura

CS = Concentração na solução final

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado com 2 dígitos decimais (em % mm^{-1}).

8.5.5. Determinação de cálcio e magnésio (símbolo químico – Ca e Mg)

a) Transferir uma alíquota de 2,5 ml do extrato para copo plástico descartável (usar seringa calibrada);

b) Adicionar 2,5 ml de água destilada ou deionizada;

c) Adicionar 5 ml da solução de Sr 0,3% em HCl 0,2 M;

d) Determinar a absorbância do Ca no fotômetro de absorção (Observar as instruções peculiares de cada aparelho);

e) Retirar uma alíquota de 5 ml (do copo plástico após a leitura da absorbância do Ca);

f) Adicionar 10 ml de água destilada;

g) Determinar a absorbância do Mg no fotômetro de absorção.

8.5.5.1. Observações

a) Amostras com alto teor de Ca e Mg devem ser diluídas convenientemente com o extrato da prova em banco [2 ml do extrato, 2 ml de água destilada e 4 ml da solução de estrôncio (Sr)];

b) Com a metodologia adotada é possível determinar entre 0,002% e 0,83% de Ca e entre 0,001% e 0,57% de Mg na amostra, sem necessidade de diluição;

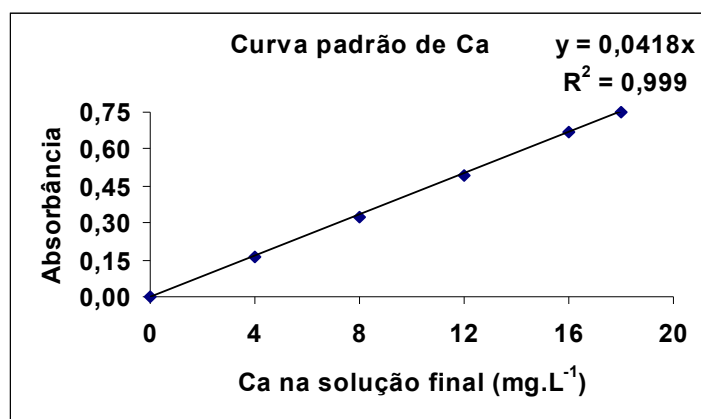
c) Para a leitura direta do teor de Ca, ajustar o aparelho para 0,80% de Ca com o padrão de 8,0 mg/L-1;

d) Para a leitura direta do teor de Mg, ajustar o aparelho para 0,24% de Mg com o padrão de 8,0 mg/L-1.

8.5.5.2. Cálculos

8.5.5.2.1. Cálcio

a) Curva padrão de Ca;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{50}{0,20} \times \frac{5}{2,5} \times \frac{10}{5} = 1.000$$

d) Teor de Ca;

$$Ca(\%) = \frac{L \times FC \times FD}{10.000}$$

Onde:

Ca(%) = é o teor de cálcio em porcentagem

L = Leitura

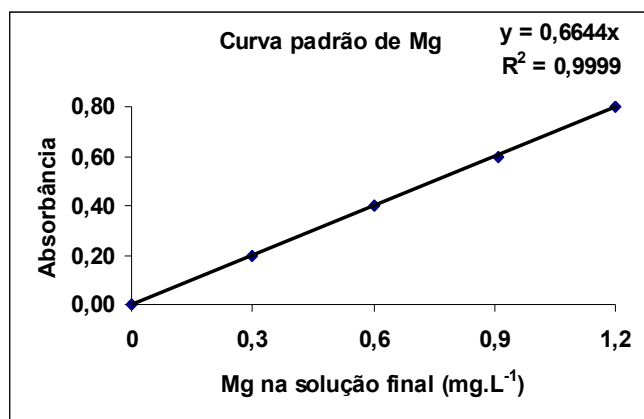
FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado com dois dígitos decimais (% mm⁻¹).

8.5.5.2.2. Magnésio

a) Curva padrão de Mg;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{50}{0,20} \times \frac{5}{2,5} \times \frac{10}{5} \times \frac{15}{5} = 3.000$$

d) Teor de Mg;

$$Mg(\%) = \frac{L \times FC \times FD}{10.000}$$

Onde:

Mg(%) = é o teor de magnésio em porcentagem

L = Leitura

FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado com dois dígitos decimais (% mm⁻¹).

9. MICRONUTRIENTES (ZN, CU, MN E FE), ENXOFRE E SÓDIO EM PLANTAS E RESÍDUOS ORGÂNICOS

9.1. PRINCÍPIO

A digestão de tecido vegetal e outros materiais orgânicos com HNO₃ – HClO₄ é amplamente utilizada na determinação do teor total de vários nutrientes Blanchar et. al., (1965); Chapman; Pratt (1961); Johnson; Ulrich, (1959); Sarruge; Haag, (1974); Tabatabai, Bremner, (1970). Os procedimentos adotados variam conforme a sensibilidade desejada, os nutrientes a determinar, a vidraria, os equipamentos utilizados, etc.

9.2. METODOLOGIA ADOTADA

A digestão com HNO₃ – HClO₄ deve ser feita com cuidado Johnson e Ulrich (1959) alertam para os cuidados que devem ser observados no uso.

Apresenta, entretanto, as seguintes vantagens:

- a) Não há perda de elementos por volatilização, com exceção de B e Cl, porque a temperatura não ultrapassa o ponto de ebulição do HClO₄ (203°C), e;
- b) Não ocorre absorção de elementos metálicos na sílica (o que se observa na queima a 500-600°C). É portanto, amplamente utilizada para a extração de Zn, Cu, Fe, Mn, Na e S no tecido de plantas e outros materiais (composto, adubos orgânicos, resíduos de origem animal e vegetal, etc.).

Outros elementos podem também ser determinados no extrato, como metais pesados (Pb, Ni, Cd, Cr, etc) e macronutrientes (P, K, Ca e Mg).

Na digestão de amostras de adubos organo-minerais, com altos teores de minerais pode ocorrer a explosão do perclorato, sendo recomendada, neste caso, a digestão com Br-CCl₄ BR-MA-Lanarv, (1983).

A concentração dos micronutrientes no tecido das plantas é em geral menor que 20 mg/kg⁻¹ para o cobre, entre 10 e 100 mg/kg⁻¹ para o zinco, entre 20 e 1.000 mg/kg⁻¹ para o manganês, e entre 20 e 1.000 mg/kg⁻¹ para o ferro. O sódio pode variar entre 10 e 200 mg/kg⁻¹ (em solos salinos os teores são maiores). O teor de S é compatível ao do P, variando entre 0,05 a 1,2%.

No procedimento adotado, as quantidades de HNO₃ – HClO₄ recomendadas foram reduzidas ao máximo para agilizar a etapa de digestão e manter uma concentração de HClO₄ de, aproximadamente, 0,5M no extrato (após diluição a 20 ml, supondo não haver perda de ácido), compatível com a leitura direta no fotômetro de absorção com nebulizador especial (para evitar corrosão).

Para evitar a perda de HClO₄ (e secagem de extrato) é adotado o uso de um pequeno funil tampado nos tubos de digestão, para propiciar a condensação do ácido, que então escorre pelas paredes do tubo. Este procedimento oferece as vantagens de lavar as paredes de resíduos que aderem durante a fase de digestão com HNO₃ e evitar que as mesmas sequem, o que pode provocar perdas de S, As e P.

Tubos de digestão podem ser adquiridos já calibrados a 20 ml. Deve-se ter cuidado ao ajustar o volume até a marca de 20 ml, pois um erro de 0,5 ml (facilmente visível) representa um desvio de 2,5%. Com cuidado, este erro pode ser reduzido a menos de 1%.

Atenção especial deve ser dada à limpeza dos tubos de digestão. Após a digestão com H₂O₂-H₂SO₄ (para macronutrientes), os tubos apresentam em geral um depósito persistente de silicatos nas paredes, resistente à solução

de limpeza ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Este depósito pode, entretanto, ser removido com um banho de HF concentrado. Deixa-se o ácido em contato com o vidro por alguns segundos (3 a 4), passando-se o mesmo de um tubo a outro, lavando-se, em seguida, com água da torneira (o melhor é dispor de dois conjuntos para macro e micronutrientes – deve-se ter cuidado com o uso do HF: se derramado nas mãos, lavar imediatamente com bastante água e gelo para neutralizar o ácido). Após, livre de depósitos, a vidraria pode ser lavada com HCl 1M e, a seguir, por várias vezes, com água destilada.

No procedimento adotado, o extrato é deixado em repouso para decantação da sílica (e fração mineral), determinando-se os elementos metálicos no extrato por fotometria (absorção ou emissão), após diluição adequada. O S é determinado por turbidimetria conforme o método descrito por Tabatabai e Bremner (1970).

9.3. MATERIAIS/EQUIPAMENTOS

- a) Bloco digestor, para tubos de digestão de 25 x 250 mm, com 40 provas, com temperatura regulável até 300°C;
- b) Funil para depositar o tecido no fundo do tubo de digestão (haste de 18 mm de diâmetro externo e comprimento de 20 cm);
- c) Funis (condensador) de 30 mm de diâmetro na parte mais larga, 45 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro externo da haste;
- d) Fotômetro de absorção atômica;
- e) Fotômetro de chama;
- f) Calorímetro (UV - visível) ou turbidímetro;
- g) Capela – A forma ideal de ventilação dos vapores de HClO_4 seria o borbulhamento em água, ou absorção em soda (JOHNSON; ULRICH, 1959). Pode ser utilizada uma capela de PVC, com a condensação do ácido. Não se deve trabalhar com compostos orgânicos na mesma capela.

9.4. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Cobre (Cu);
- b) Zinco (Zn);
- c) Ferro (Fe);
- d) Manganês (Mn);
- e) Sódio (Na);
- f) Cloreto de sódio (NaCl);
- g) Ácido nítrico concentrado (65%; $d = 1,40$), p.a. (HNO_3);
- h) Ácido perclórico concentrado (70%; $d = 1,67$), p.a. (HClO_4);
- i) Sulfato de Potássio anidro p.a. (K_2SO_4).

9.4.1. Padrão de Cu de 1.000 mg L⁻¹

- a) Pesar 1.000 g de Cu metálico;
- b) Dissolver com 20 ml de HNO_3 a 50%;
- c) Diluir a 1 litro com HCl 0,1M.

9.4.2. Padrão de Zn de 1.000 mg L⁻¹

- a) Pesar 1.000 g de Zn metálico;
- b) Dissolver com 20 ml de HNO_3 a 50%;
- c) Diluir em 1 litro.

9.4.3. Padrão de Fe, Mn e Na

- a) Pesar 0,600 g de Fe metálico e 0,450 g de Mn metálico;
- b) Dissolver em 20 ml de HNO_3 50%, utilizando balão volumétrico de 500 ml;

- c) Adicionar aproximadamente 300 ml de água destilada ou deionizada;
- d) Adicionar 1,524 g de NaCl (seco a 105°C por 2 horas);
- e) Completar o volume;
- f) Esta solução possui 1.200 mg/L⁻¹ de Fe, 900 mg/L⁻¹ de Mn e 1.200 mg/L⁻¹ de Na.

9.4.4. Padrão diluído

- a) Dissolver 7,175 g de K₂SO₄ (seco a 105°C por 2 horas) em aproximadamente 300 ml de água destilada e completar com água deionizada em um balão volumétrico de 1000 ml;
- b) Adicionar 40 ml da solução 9.4.1. (1.000 mg/L⁻¹ de Cu), 24 ml da solução 9.4.2. (1.000 mg/L⁻¹ de Zn) e 200 ml da solução 9.4.3. (Fe, Mn e Na);
- c) Completar o volume;
- d) Esta solução contém 40 mg/L⁻¹ de Cu, 24 mg/L⁻¹ de Zn, 240 mg/L⁻¹ de Fe, 180 mg/L⁻¹ de Mn, 240 mg/L⁻¹ de Na e 1.320 mg/L⁻¹ de S.

9.4.5. BaCl₂-gelatina

- a) Dissolver 0,6 g de gelatina (pode-se usar produto comercial incolor) em 200 ml de água destilada ou deionizada aquecida a 60-70°C;
- b) Colocar em geladeira (-4°C) por 16-18 horas;
- c) Trazer à temperatura ambiente (20-25°C);
- d) Adicionar 2,0 g de BaCl₂ nessa solução e agitar até a completa dissolução;
- e) Esta solução deve ser guardada em geladeira à temperatura entre 4-8°C (mantém-se estável por aproximadamente 10 dias);
- f) Antes de usar, trazer à temperatura ambiente e agitar.

9.5. PROCEDIMENTO

9.5.1. Digestão das amostras

- a) Pesar 1.000 g de amostra e colocar no tubo de digestão (os tubos devem ser marcados a 20 ml. Usar funil com haste longa);
- b) Adicionar 6,0 ml de HNO_3 concentrado (usar seringa calibrada);
- c) Deixar em repouso até o dia seguinte (na capela);
- d) Agitar manualmente cada tubo (tomar cuidado para não elevar a mistura nas paredes do tubo);
- e) Aquecer a 80-90°C por trinta minutos (tomar cuidado para não elevar a mistura nas paredes do tubo);
- f) Aumentar a temperatura para 120°C [desprende fortes vapores de óxidos de nitrogênio do HNO_3 (cor marrom)];
- g) Manter esta temperatura até restar 0,5-1,0 ml de ácido (retirar os tubos que tendem a secar);
- h) Deixar esfriar por 10 minutos (sobre placa de amianto ou madeira);
- i) Adicionar 1,0 ml de HClO_4 concentrado (usar seringa calibrada);
- j) Aquecer a 180-190°C (desprende vapores de óxidos de nitrogênio do HNO_3 remanescente);
- k) Quando começar o desprendimento de vapor de HClO_4 (branco), colocar os funis de 30 mm de diâmetro nos tubos de digestão (para evitar perda de HClO_4 e secagem do material);
- l) Manter a esta temperatura por 2 horas;
- m) Deixar esfriar e adicionar aproximadamente 5 ml de água destilada [sobre placa de amianto ou madeira, até poder tocar o tubo com a mão (50-60°C). Se houver formação de cristais aquecer levemente];

n) Ajustar o volume a 20 ml com água destilada (a concentração final do ácido é 0,57M);

o) Homogeneizar cada tubo (manualmente);

p) Deixar decantar até o dia seguinte (em frascos “snap-cap” de 90 ml).

9.5.1.1. Observação

a) Para as curvas padrão, medir (com microbureta) 0,0 – 0,5 – 2,5 e 4,0 ml do padrão misto para tubos de digestão, seguindo o procedimento descrito a partir do item 9.5.1.n. Após a diluição para 20 ml, verificar-se-á (Tabela 18):

TABELA 18. Diluições para 20 ml da digestão da amostra

ml de padrão	0,0	0,5	1,0	1,5	2,5	4,0
Teor de Cu (mg/L ⁻¹)	0,0	1,0	2,0	3,0	5,0	8,0
Teor de Zn (mg/L ⁻¹)	0,0	0,6	1,2	1,8	3,0	4,8
Teor de Fe (mg/L ⁻¹)	0,0	6,0	12,0	18,0	30,0	48,0
Teor de Mn (mg/L ⁻¹)	0,0	4,5	9,0	13,5	22,5	36,0
Teor de Na (mg/L ⁻¹)	0,0	6,0	12,0	18,0	30,0	48,0
Teor de S (mg/L ⁻¹)	0,0	33,0	66,0	99,0	165,0	264,0

a) Com as diluições e os métodos de determinação descritos abaixo, as concentrações finais serão (sem diluição para Cu, diluição de 3x para Zn, Fe, Mn e Na e diluição de 11x para S) (Tabela 19):

TABELA 19. Concentrações finais

Teor de Cu (mg/L ⁻¹)	0,0	1,0	2,0	3,0	5,0	8,0
Teor de Zn (mg/L ⁻¹)	0,0	0,2	0,4	0,6	1,0	1,6
Teor de Fe (mg/L ⁻¹)	0,0	2,0	4,0	6,0	10,0	16,0
Teor de Mn (mg/L ⁻¹)	0,0	1,5	3,0	4,5	7,5	12,0
Teor de Na (mg/L ⁻¹)	0,0	2,0	4,0	6,0	10,0	16,0
Teor de S (mg/L ⁻¹)	0,0	3,0	6,0	9,0	15,0	24,0

c) Em trabalho cotidiano, não é necessário repetir as curvas padrão a cada batelada, somente a prova em branco e 2 padrões.

9.5.2. Determinação de enxofre

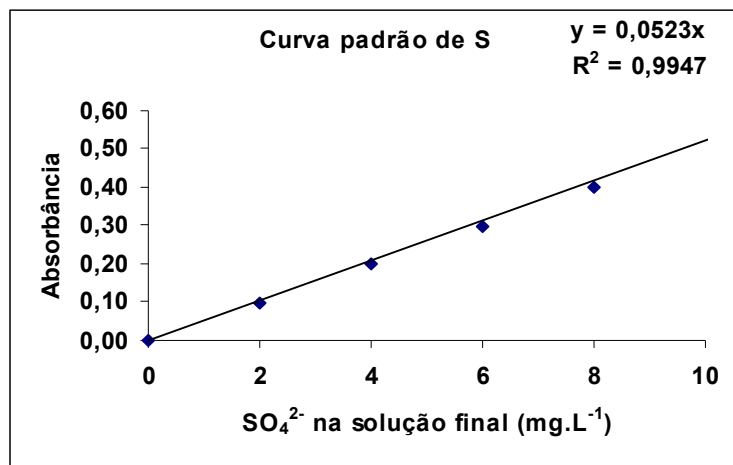
- a) Pipetar 1,0 ml de sobrenadante (pode-se usar seringa calibrada e copos descartáveis);
- b) Adicionar 10 ml de HCl 0,1M (usar seringa calibrada);
- c) Adicionar 1,0 ml da solução BaCl_2 -gelatina. Agitar alguns segundos (usar seringa calibrada e agitar com pequeno bastão de vidro);
- d) Deixar em repouso por 30 minutos;
- e) Agitar novamente e determinar a absorbância no fotômetro em 440 nm (fazer a leitura entre 30 e 60 minutos após a adição de BaCl_2 -gelatina).

9.5.2.1. Observações

- a) A sensibilidade (absorbância igual 0,002) é de 0,052 mg/L⁻¹ na solução de leitura (para o ponto 2,5 mg/L⁻¹ na curva do item 9.5.2.2), ou 25 mg/kg⁻¹ (0,0011%) na amostra (diluição de 220 vezes);
- b) Com o procedimento descrito podem-se determinar teores de até 0,35% de S no tecido, sem outra diluição;
- c) Para a leitura direta do teor de S na amostra, ajustar a absorbância de 0,095 com o padrão de 2,5 mg/L⁻¹ de S na solução final.

9.5.2.2. Cálculos

a) Curva padrão de S;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

Fator de concentração = 0,0265 mg/L⁻¹ por mil absorbâncias;

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{11}{1} = 220$$

d) Teor de enxofre;

$$S(\%) = \frac{L \times FC \times FD}{10.000}$$

Onde:

S(%) = é o teor de enxofre em porcentagem

L = Leitura

FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado com dois dígitos decimais (% mm^{-1}).

9.5.3. Determinação do cobre, zinco, ferro, manganês e sódio

a) Pipetar 10 ml de sobrenadante (usar seringa calibrada e copos plásticos descartáveis);

b) Determinar a absorbância de Cu no fotômetro de absorção;

c) Pipetar 5,0 ml da solução restante e adicionar 10 ml de água destilada (usar seringa calibrada, com cuidado para evitar contaminação);

d) Determinar as absorbâncias de Zn, Fe, e Mn no fotômetro de absorção;

e) Determinar a emissão de Na no fotômetro de chama (regular o fotômetro de chama com os padrões convenientes).

9.5.3.1. Observações

a) Amostras com altos teores devem ser diluídas convenientemente com o extrato da prova em branco;

b) Para o Cu, a sensibilidade (absorbância = 0,002) é de aproximadamente 0,057 mg/L^{-1} na solução de leitura (fator de concentração para o ponto 4,0 mg/L^{-1} na curva do item 9.5.3.2.1.), ou 1,14 mg/kg^{-1} na amostra (diluição de 20x). Concentrações de até 120 mg/kg^{-1} na amostra podem ser determinadas pelo procedimento descrito, sem outra diluição;

c) Para o Zn, a sensibilidade (absorbância = 0,002) é de aproximadamente 0,016 mg/L^{-1} na solução de leitura (fator de concentração para o ponto 1,0 mg/L^{-1} na curva do item 9.5.3.2.2.), ou 0,98 mg/kg^{-1} na amostra (diluição de 60x). Concentrações de até 95 mg/kg^{-1} na amostra podem ser determinadas pelo procedimento descrito, sem outra diluição;

d) Para o Fe, a sensibilidade (absorbância = 0,002) é de aproximadamente 0,06 mg/L^{-1} na solução de leitura (fator de concentração para o ponto 2,0 mg/L^{-1} na curva do item 9.5.3.2.3.), ou 3,60 mg/kg^{-1} na amostra (diluição

de 60x). Concentrações de até 365 mg/kg^{-1} na amostra podem ser determinadas pelo procedimento descrito, sem outra diluição;

e) Para o Mn, a sensibilidade (absorbância = 0,002) é de aproximadamente $0,045 \text{ mg/L}^{-1}$ na solução de leitura (fator de concentração para o ponto $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ na curva do item 9.5.3.2.4.), ou $2,70 \text{ mg/kg}^{-1}$ na amostra (diluição de 60x). Concentrações de até 140 mg/kg^{-1} na amostra podem ser determinadas pelo procedimento descrito, sem outra diluição;

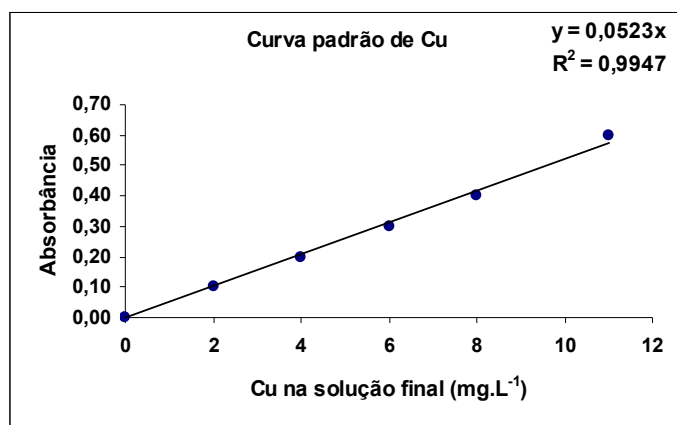
f) Na determinação do Na, o fotômetro de chama pode ser ajustado para registrar 80 nm com o padrão de 4 mg/L^{-1} na solução de leitura. A sensibilidade neste caso (para a leitura de uma unidade) é de aproximadamente $0,05 \text{ mg/L}^{-1}$ na solução de leitura, ou $3,0 \text{ mg/kg}^{-1}$ na amostra (diluição de 60x). Concentrações de 300 a 600 mg/kg^{-1} na amostra podem ser determinadas pelo procedimento descrito, sem outra diluição (determinar o teor de Na na solução pela curva);

g) Para a leitura direta dos teores de Cu, Zn, Fe e Mn da amostra, ajustar o fotômetro de absorção para obter os valores de 40 mg/kg^{-1} de Cu, 24 mg/kg^{-1} de Zn, 240 mg/kg^{-1} de Fe e 180 mg/kg^{-1} de Mn com o extrato com um ml do padrão misto, diluído conforme as amostras (cuja concentração final é de 2 mg/L^{-1} de Cu, $0,4 \text{ mg/L}^{-1}$ de Zn, 4 mg/L^{-1} de Fe e 3 mg/L^{-1} de Mn).

9.5.3.2. Cálculos

9.5.3.2.1 Cobre

a) Curva padrão de Cu;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

Fator de concentração = 0,0288 mg/L⁻¹ por mil absorbâncias.

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{20}{1} = 20$$

d) Teor de cobre;

$$Cu(mg / kg^{-1}) = L \times FC \times FD$$

Onde:

Cu = é o teor de cobre em (mg/kg⁻¹)

L = Leitura

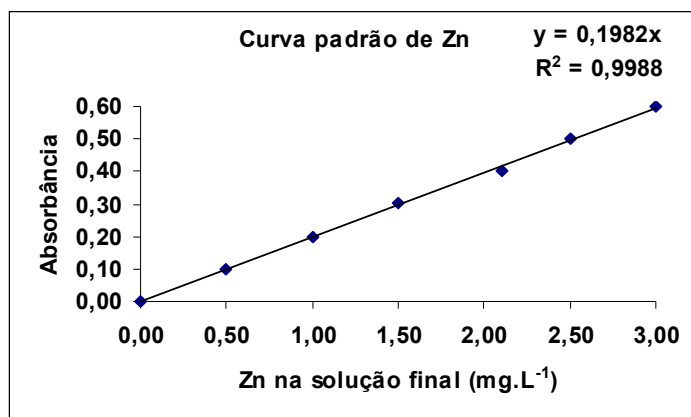
FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado em número inteiro (mg/kg⁻¹).

9.5.3.2.2. Zinco

a) Curva padrão de Zn;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

Fator de concentração = 0,00820 mg/L⁻¹ por mil absorbâncias.

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{5} = 60$$

d) Teor de zinco;

$$Zn(mg / kg^{-1}) = L \times FC \times FD$$

Onde:

Zn = é o teor de zinco em (mg/kg⁻¹)

L = Leitura

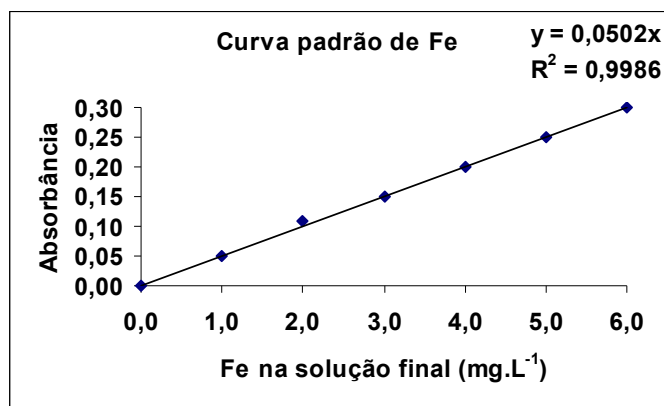
FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado em número inteiro (mg/kg^{-1}).

9.5.3.2.3. Ferro

a) Curva padrão de Fé;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

Fator de concentração = $0,00820 \text{ mg}/\text{L}^{-1}$ por mil absorbâncias.

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{5} = 60$$

d) Teor de ferro;

$$Fe(\text{mg} / \text{kg}^{-1}) = L \times FC \times FD$$

Onde:

Fe = é o teor de ferro em (mg/kg^{-1})

L = Leitura

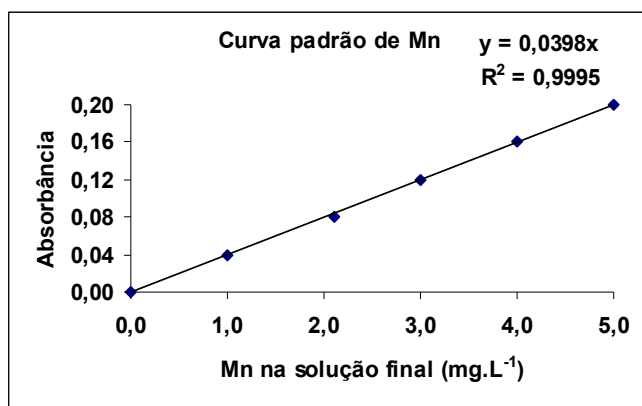
FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado em número inteiro (mg/kg^{-1}).

9.5.3.2.4. Manganês

a) Curva padrão de Mn;



b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão;

Fator de concentração = $0,0227 \text{ mg/L}^{-1}$ por mil absorbâncias.

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{1} = 60$$

d) Teor de manganês;

$$Mn(\text{mg} / \text{kg}^{-1}) = L \times FC \times FD$$

Onde:

Mn = é o teor de manganês em (mg/kg^{-1})

L = Leitura

FC = Fator de concentração

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado em número inteiro (mg/kg^{-1}).

9.5.3.2.5. Sódio

a) Curva padrão de sódio (Na): ajustar a leitura (na escala de zero a 100) com o padrão de 20 (mg/L^{-1});

b) Concentração na solução final (CS), determinado pela curva padrão;

c) Fator de diluição;

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{1} = 60$$

d) Teor de sódio;

$$Na(\text{mg} / \text{kg}^{-1}) = L \times CS \times FD$$

Onde:

Na = é o teor de sódio em (mg/kg^{-1})

L = Leitura

CS = Fator de concentração na solução final

FD = Fator de diluição

e) Expressar o resultado em número inteiro (mg/kg^{-1}).

10. MÉTODOS TITULOMÉTRICOS

10.1. CONCENTRAÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES

10.1.1. Definições

10.1.1.1. Dissociação

Processo de separação de íons, oriundos de uma ligação iônica.

10.1.1.2. Ionização

Processo de produção de íons, a partir do rompimento de ligações moleculares.

10.1.1.3. Cátion

Íon carregado positivamente, gerado a partir da retirada de elétrons da estrutura de um átomo.

10.1.1.4. Ânion

Íon carregado negativamente, gerado a partir do acréscimo de elétrons da estrutura de um átomo.

10.1.1.5. Equivalente-grama

É definido como a relação entre a massa molar de uma substância e a quantidade de cargas positivas e negativas que ela libera durante a reação que participa. Portanto o cálculo do equivalente-grama depende da natureza da substância avaliada:

Para ácidos:

$$Eq / g = \frac{\text{Massa molar (g)}}{N^{\circ} \text{ de } H^{+} \text{ ionizáveis}}$$

Para bases:

$$Eq / g = \frac{\text{Massa molar (g)}}{N^{\circ} \text{ de } OH^{-} \text{ disponíveis}}$$

$$Eq/g = \frac{\text{massa molar (g)}}{\text{n}^\circ \text{ total de cargas positivas do cátion}}$$
$$Eq/g = \frac{\text{massa molar (g)}}{\text{n}^\circ \text{ total de cargas negativas do ânion}}$$
$$Eq/g = \frac{\text{massa molar (g)}}{\text{n}^\circ \text{ de elétrons recebidos pelo oxidante}}$$
$$Eq/g = \frac{\text{massa molar (g)}}{\text{n}^\circ \text{ de elétrons cedidos pelo redutor}}$$

A massa molar de uma substância é definida pela soma das massas atômicas dos elementos químicos que a compõem.

NaOH		Massa molar: 40	
Elemento:	Na	O	H
Massa atômica:	23	16	1
H ₂ SO ₄		Massa molar: 98	
Elemento:	H	S	O
Massa atômica	1x2 = 2	32	16x4 = 64

10.1.1.7. Soluto

Substância que ao compor uma solução ou mistura é dissolvida em outra.

10.1.1.8. Solvente

Substância que ao compor uma solução ou mistura é responsável pela dissolução de outra. A água é o solvente universal.

10.1.1.9. Solução

Sistema homogêneo composto por duas ou mais substâncias.

10.1.1.10. Diluição

Entende-se por diluição, a redução da concentração de uma solução pela adição de volume conhecido de solvente. A relação de uso mais comum ao processar a diluição é volume da solução original/volume de solvente e, com menor frequência, volume de solução original/volume final da solução.

Convém, entretanto, salientar que, para definir o fator de diluição, utiliza-se a fórmula do quociente entre os volumes final e inicial.

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Volume da solução diluída (ml)}}{\text{Volume da solução original (ml)}}$$

10.1.1.10.1. Diluição de soluções

Exemplo:

Álcool 70%

Solução mãe [C] conhecida

Solução diluída [D] desejada

Ex.: Dispõe-se de álcool 96% = solução mãe [C]

Deseja-se álcool 70% [D]

100 ml álcool 96% → 96 partes de álcool
 X → 70 partes de álcool

Como é uma regra indireta:

100 → 70

X → 96

$$X = \frac{96 \times 100}{70} = \frac{960}{7} = 137$$

Conclusão: Adiciona-se 37 ml de água destilada (= 137 – 100) a 100 de álcool puro, i.e., 96%, resultando álcool 70% p.q. $96 \div 137 = 0.7$ ou 70%

10.1.1.11. Densidades Absoluta e Relativa

Entende-se por densidade absoluta, a relação entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa, sob determinadas temperatura e pressão.

$$\text{Densidade absoluta} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Volume (ml)}}$$

Já a densidade relativa parte da comparação da densidade da substância com a água, sob as mesmas condições.

10.1.1.11.1. Reagente padrão primário

Reagente padrão primário são substâncias que têm as seguintes características:

- Devem ser de fácil obtenção, purificação, dessecação e conservação;
- São reagentes com pureza acima de 99,9%;
- Não devem ser higroscópicos;

- Devem ser bastante solúveis.

10.1.1.11.2. Reagente padrão secundário

Um reagente padrão secundário é uma substância que pode ser usada no preparo de soluções através de padronizações em relação a um padrão primário.

10.1.1.11.3. Soluções padrões diretas

São aquelas soluções preparadas com um padrão primário, nas quais pesa-se a quantidade desejada de padrão primário e acrescenta-se o volume de água desejado.

10.1.1.11. 4. Soluções padrões indiretas

São aquelas soluções preparadas com padrões secundários, nas quais, após a pesagem e o acréscimo de água, deve-se fazer uma padronização da solução obtida em relação a um padrão primário.

10.1.2. Normalidade

A normalidade é definida como o número de equivalentes de uma substância presentes em um litro de solução.

$$N = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Equivalente - grama} \times \text{volume (L)}}$$

10.1.3. Molaridade

A molaridade é definida como o número de moles de uma substância presentes em um litro de solução.

$$M = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Massa molar} \times \text{volume (L)}}$$

10.1.4. Concentração

Pressupõem-se as mais diversas relações de peso e volume de substâncias.

Algumas destas relações são de uso mais comum na rotina de um laboratório:

- Percentagem peso/peso (% p/p);
- Percentagem peso/volume (% p/v);
- Percentagem volume/volume (% v/v);
- Massa por litro (g/L).

10.1.4.1. Percentagem peso/peso (% p/p)

Concentração definida pela relação entre o peso de soluto e o peso da solução.

$$\%p / p = \frac{\text{massa de soluto (g)} \times 100}{\text{massa da solução (g)}}$$

10.1.4.2. Percentagem peso/volume (% p/v)

Concentração definida pela relação entre o peso de soluto e o volume da solução.

$$\%p / v = \frac{\text{massa de soluto (g)} \times 100}{\text{volume da solução (ml)}}$$

10.1.4.3. Percentagem volume/volume (% v/v)

Concentração definida pela relação entre o volume de soluto e o volume da solução.

$$\%v / v = \frac{\text{volume de soluto (ml)} \times 100}{\text{volume da solução (ml)}}$$

10.1.4.4. Massa por litro

Concentração definida pela massa de soluto presente em um litro da solução.

$$\%g / L = \frac{\text{massa de soluto (g)} \times 100}{\text{volume da solução (L)}}$$

11. SEGURANÇA EM LABORATÓRIO QUÍMICO

11.1. PRINCÍPIO

O trabalho em laboratórios químicos, pelas peculiaridades das tarefas executadas, é motivo de preocupação quanto aos riscos existentes e à observância das normas de segurança do pessoal, dos trabalhadores permanentes (laboratoristas) ou eventuais (pessoal de limpeza etc.).

O desconhecimento das situações de perigo, característica na fase de aprendizado e mesmo do pessoal já experiente no trabalho, com produtos novos ou não identificados, acentua ainda mais os riscos citados. Cria-se, desta forma, situações que podem causar sérios acidentes.

Para preveni-los, devem ser feitas avaliações dos riscos e tomadas medidas de controle que, rigidamente observadas, propiciam condições de trabalho em níveis de segurança adequados.

Entre os riscos mais comuns destacam-se os seguintes:

- a) Manuseio de material de vidro e de produtos químicos;
- b) Trabalho a temperaturas elevadas;
- c) Trabalho a pressões diferentes da atmosfera;
- d) Uso de fogo;
- e) Uso de eletricidade.

11.2. RISCOS QUÍMICOS

11.2.1. Formas de agressão por produtos químicos

Além do contato direto com a pele, os diversos agentes químicos podem entrar em contato com o organismo humano por três vias:

a) Por inalação;

Constitui a principal via de intoxicação.

b) Por absorção cutânea;

A pele e a gordura protetora são barreiras bastante efetivas, sendo poucas as substâncias que podem ser absorvidas em quantidades perigosas.

c) Por ingestão;

Pode ocorrer de forma acidental (uso indevido de pipetas), ou ao engolir partículas que estejam retidas no trato respiratório, resultantes da inalação de pós ou fumos.

11.2.2. Limites de tolerância

As ações de efeitos dos contaminantes dependem de fatores como:

a) Tempo de exposição;

b) Concentração e características físico-químicos do produto;

c) Suscetibilidade pessoal, além de outros.

O “limite de tolerância” estabelece as concentrações dos agentes químicos presentes a um ambiente de trabalho, sob os quais o homem pode ficar exposto sem sofrer efeitos adversos a sua saúde.

A concentração de um determinado poluente no ar pode ser determinada, de maneira relativamente simples, com o uso de tubos colorimétricos específicos para este fim.

11.2.3. Medidas básicas de segurança

Devem ser tomadas considerando três itens principais, a saber: medidas relativas às instalações, medidas relativas às operações específicas e medidas relativas ao pessoal.

11.2.3.1. Medidas relativas às instalações

Um laboratório deve ser instalado em local previsto para este fim. Inclusive prevendo um plano (esquema) para seu funcionamento racional dentro de padrões de segurança adequados.

A localização deve ser, de preferência, em pavimento térreo, tendo ao redor área isolada e livre. A construção de laboratório em andares dificulta enormemente a tomada de medidas preventivas.

As instalações elétricas e hidráulicas devem ser aparentes ou sob piso falso, para facilitar a manutenção.

As canalizações para gases sob pressão devem ser aparentes e os cilindros de alimentação localizados em área externa ao laboratório, bem ventilada e adequadamente sinalizada.

Para a construção de pisos e bancadas, os materiais devem ser escolhidos de forma a dificultar a combustão e resistir ao ataque de produtos químicos.

Para trabalho com produtos voláteis deverá ser prevista capela, a qual periodicamente será submetida a processo de manutenção.

Os produtos químicos devem ser armazenados em locais especialmente destinados para este fim, permanecendo no laboratório uma quantidade mínima.

Para prevenir e contornar situações de emergência devem ser previstas instalações, tais como:

a) Proteção contra incêndio;

Os locais de trabalho com substâncias inflamáveis ou explosivas devem dispor de saída de emergência, porta contra fogo e sinalização de alarme.

b) Chuveiro de emergência;

São instalados em locais de fácil acesso e em condições de uso a qualquer momento, devendo, portanto, passar por manutenção periódica.

c) Lavadores de olhos;

Para atendimento quando da projeção de produtos químicos nos olhos. Os lavadores de olhos devem passar por manutenção periódica.

d) Sinalização de segurança;

Devem ser demarcadas no piso as áreas de segurança (equipamentos contra incêndio, chuveiros de emergência, etc.), sendo mantidas desobstruídas e em perfeito estado de conservação.

Recomendam-se o uso de cartazes e placas indicando riscos de acidentes, medidas de orientação e localização de equipamentos de segurança.

11.2.3.2. Medidas relativas às operações específicas

a) Manuseio de produtos químicos;

Todo o trabalho com produtos químicos em laboratórios deve ser precedido por pesquisa sobre as propriedades químicas, físicas e toxicológicas dos produtos, seu manuseio seguro e medidas de primeiros socorros em caso de acidente, a fim de conscientizar o operador sobre os riscos aos quais está exposto.

Recomendam-se, para uma primeira tomada de posição, consulta ao Index Merck, às tabelas de laboratórios previstas para este fim, ou às fichas toxicológicas.

a) Rotulagem;

Nenhum produto deve ser manipulado no laboratório sem que se saiba exatamente o seu comportamento.

Os rótulos devem conter sempre informações necessárias para a perfeita caracterização, bem como indicações de riscos, medidas de prevenção para o manuseio e instruções para o caso de eventuais acidentes, tais como:

- Contato ou exposição;
- Antídotos e informações para manuseio e armazenagem de recipientes.

A fim de evitar a dilaceração de rótulos, estes devem ser periodicamente vistoriados.

b) Operações envolvendo produtos voláteis e tóxicos;

Devem ser feitas exclusivamente em capelas, locais em que a exaustão dos vapores e gases evita a disseminação dos mesmos no ambiente do laboratório.

c) Operações com vidraria;

A vidraria utilizada é dos mais variados tipos e o trabalho com calor intenso, frio, pressão, além da correção e adaptação de peças de vidro, frequentemente conduz a acidentes.

A seguir são apresentadas recomendações básicas de segurança no trabalho com vidraria:

- Nunca trabalhar com vidro trincado ou quebrado;
- Ao introduzir tubos de vidros em rolhas, lubrificar o vidro com vaselina ou silicone e proteger as mãos com luvas grossas ou mesmo toalhas;
- Para o trabalho sob pressão reduzida, verificar previamente a espessura das paredes dos frascos e conexões de vidro, usando somente material resistente a variações de pressão;
- Ao usar pipetas, deve-se verificar o seu estado de conservação.

d) Despejos e resíduos:

Os resíduos químicos de laboratórios não devem ser jogados diretamente no esgoto.

Dependendo das características dos produtos que o compõem, deverá ser feito tratamento que pode envolver operações tais como:

- Diluição;
- Neutralização;
- Interação;
- Combustão;
- Resfriamento;
- Filtração;
- Precipitação, tratamentos com resinas, entre outros.

Quando o resíduo for gasoso, o tratamento usando frascos lavadores é bastante eficiente.

11.2.3.3. Medidas relativas ao pessoal

e) Uso de equipamento de proteção individual:

- O uso de equipamento de proteção individual, tais como: avental de algodão, óculos, luvas, protetores faciais, máscaras para gases são indispensáveis em algumas situações de laboratório;
- O avental de algodão, além de proteger contra a projeção dos produtos químicos, protege o laboratorista contra o fogo, pois, em situações nas quais possa vir a inflamar-se, pode ser rapidamente despido. O tecido deve ser consequentemente, de material de difícil combustão;
- E os aventais de tecidos sintéticos pegam fogo com facilidade e não são recomendados;
- O uso de óculos e protetores faciais é fundamental nos casos em que pode haver qualquer tipo de projeção (respingos, estilhaços, etc.). Os óculos com filtros especiais são recomendados para proteção contra

radiações (ultravioleta e infravermelho), comuns em instrumentos analíticos.

f) Treinamentos periódicos:

Devem ser feitos sistematicamente, com o objetivo de conscientizar o pessoal sobre as normas de segurança, evitando, com isto, a acomodação e displicência no seu cumprimento, assim como verificar a eficiência de equipamentos e medidas em caso de acidentes.

Os principais itens do treinamento devem envolver:

- Medidas de controle a incêndios, derrame ou vazamento;
- Utilização de equipamentos de proteção individual;
- Atendimento de primeiros socorros;
- Manuseio de produtos químicos.

g) Normas pessoais de segurança:

- Não fumar em laboratório;
- Não comer em laboratório;
- Evitar brincadeiras que possam comprometer as normas de segurança;
- Evitar visitas de pessoas estranhas ao laboratório;
- Não usar a vidraria de laboratório para guardar alimentos ou ingerir líquidos;
- Manter rigorosa higiene pessoal diária, lavando cuidadosamente mãos, braços e rosto antes de ingerir bebidas e alimentos após o trabalho;
- Usar, sempre que estiver dentro do laboratório, mesmo que não esteja trabalhando, todo o equipamento de proteção individual disponível, e conhecer, em detalhes, os produtos ou os reagentes em trabalho.

12. SOLUÇÕES DE LIMPEZA

12.1. SOLUÇÃO SULFOCRÔNICA – PARA VIDRARIA

12.1.1. Reagentes

- a) Dicromato de Potássio $K_2Cr_2O_7$;
- b) Ácido sulfúrico H_2SO_4 (pode ser o comercial ou p.a.);
- c) Água destilada.

Observação: Solução utilizada para limpeza de vidraria tais como: pipetas, tubos de ensaio, cadinhos, placa de petri e outros.

12.1.2. Procedimento

- a) Pesar 60 g de dicromato de potássio previamente triturado e dissolvido, com mais ou menos 200 ml de água destilada em aquecimento brando em água destilada quente; deixar esfriar;
- b) Adicionar lentamente 800 ml de ácido sulfúrico comercial;
- c) O recipiente do preparo deve estar parcialmente imerso em banho de água gelada;
- d) Executar a operação em capela;
- e) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

12.2. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 1% - PARA VIDRARIA

12.2.1. Reagentes

- a) Ácido clorídrico (HCl) p.a.;
- b) Água destilada.

12.2.2. Procedimento

- a) Medir em uma proveta 10 ml de ácido clorídrico;

- b) Colocar em torno de 200 ml de água destilada em um balão de 1000 ml;
- c) Adicionar o HCL lentamente ao balão;
- d) Completar o volume de 1000 ml;
- e) Executar a operação em capela;
- f) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

12.3. SOLUÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H_3PO_4) 10% V/V. – PARA DESTILADOR

12.3.1. Reagentes

- a) Ácido fosfórico p.a.;
- b) Água destilada ou deionizada.

12.3.2. Procedimento

- a) Tomar 100 ml de ácido fosfórico comercial (85%), diluir em água destilada e elevar a 1000 ml;
- b) A caldeira do destilador deve ficar com a referida solução por uma noite;
- c) Esta solução pode ser reutilizada mais vezes;
- d) Executar a operação em capela;
- e) Transferir para recipiente apropriado e etiquetado.

13. ANÁLISES REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

- a) Matéria Seca a 65°C (Pré-secagem) (MS 65°C);
- b) Matéria Seca a 105°C (Matéria Seca Definitiva) (MS105°C);
- c) Matéria Orgânica (MO);

- d) Matéria Mineral (MM);
- e) Proteína Bruta (PB);
- f) Extrato Etéreo ou Gordura (EE);
- g) Fibra em Detergente Neutro (FDN);
- h) Fibra em Detergente Ácido (FDA);
- i) Fibra Bruta (FB);
- j) Lignina ácida (Lig);
- k) Sílica (SIL);
- l) Fósforo (P);
- m) Potássio (K);
- n) Cálcio (Ca);
- o) Magnésio (Mg);
- p) Nitrogênio Amoniacal (NA);
- q) Potencial de Hidrogênio (pH).

13.1. CÁLCULO DAS ENERGIAS ATRAVÉS DE EQUAÇÕES

- a) Nutrientes Digestíveis Totais (NDT);
- b) Energia Metabolizável (EM);
- c) Digestibilidade da Matéria Seca (DMS);
- d) Energia Digestível (ED);
- e) Energia Líquida (EL);
- f) Fibra Bruta (FB);

g) Extrativo Não Nitrogenado (ENN);

h) Valor Relativo Nutricional (VRN)

14. REAGENTES USADOS NO LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

a) Acetona;

b) Amylase;

c) Ácido acético glacial;

d) Ácido ascórbico;

e) Ácido bórico;

f) Ácido bromídrico;

g) Ácido cítrico anidro

h) Ácido clorídrico;

i) Ácido fluorídrico;

j) Ácido nítrico;

k) Ácido perclórico;

l) Ácido sulfúrico concentrado;

m) Ácido 1 amino naftol 4 sulfônico;

n) Alcool etílico;

o) Azul de metileno;

p) Brometo de cetil trimetil amônio;

q) Cloreto de potássio;

r) Cloreto de bário;

- s) Cloreto de cálcio anidro;
- t) Cloreto de manganês;
- u) Cloreto de sódio;
- v) Clorofórmio;
- w) Cromato de potássio;
- x) Decalina
- y) Dicromato de potássio;
- z) EDTA sal dissódico;
- aa) Éter de petróleo;
- bb) Éter Etílico;
- cc) Etileno glicol;
- dd) Fenolftaleína;
- ee) Ferricianeto de potássio;
- ff) Ferro metálico;
- gg) Fosfato ácido de sódio anidro;
- hh) Fosfato de potássio;
- ii) Fosfato de sódio;
- jj) Hidróxido de sódio;
- kk) Hexano;
- ll) Iodo metálico;
- mm) Lauril sulfato de sódio;
- nn) Molibdato de amônio;

- oo) Nitrato de Cálcio;
- pp) Nitrato de Ferro III;
- qq) Nitrato de Potássio;
- rr) Nitrato de Prata;
- ss) Óxido de lantânio;
- tt) Óxido de magnésio;
- uu) Ortofenantrolina;
- vv) Permanganato de Potássio;
- ww) Peróxido de hidrogênio 120V;
- xx) Selênio de sódio;
- yy) Selenito de sódio;
- zz) Sub acetato de chumbo;
- aaa) Sulfato de sódio anidro;
- bbb) Sulfato de potássio;
- ccc) Sulfato de zinco;
- ddd) Sulfato de cobre heptaidratado;
- eee) Tetraborato de sódio;
- fff) Vermelho de metila;
- ggg) Verde de bromocresol;
- hhh) Zinco 20 Mesh.

TABELA 20. Tabela de elementos químicos importantes

Número atômico	Elementos	Símbolo	Peso Atômico	Densidade D ₄ ²⁰	Ponto de Fusão	Ponto de Ebulição
13	Alumínio	Al	26,9815	2,7	658	2057
51	Antimônio	Sb	121,75	6,68	630	1380
33	Arsênio	As	74,9216	5,72	615 subl.	-
7	Azoto	N	14,0067	1,25	-210,5	-195,8
56	Bário	Ba	137,34	3,5	710	1140
83	Bismuto	Bi	208,980	9,8	271	1560
5	Boro	B	10,811	3,33	2300	2550
35	Bromo	Br	79,909	3,14	-7,3	58,78
48	Cádmio	Cd	112,40	8,64	321	767
20	Cálcio	Ca	40,08	1,55	850	1240
6	Carbono	C	12,01115	2,25	3652	-
82	Chumbo	Pb	207,19	1134	327	1620
17	Cloro	Cl	35,453	1,507	-100,5	-34,6
27	Cobalto	Co	58,9332	8,9	1492	2900
29	Cobre	Cu	63,54	8,92	1084	2336
24	Cromo	Cr	51,996	6,92	1920	2480
16	Enxofre	S	32,064	2,07	112,8	444,6
50	Estanho	Sn	188,69	7,2	231,8	2270
38	Estrôncio	Sr	87,62	2,6	757	1150
26	Ferro	Fe	55,847	7,86	1535	3000
9	Flúor	F	18,9984	1,695	-218	-188
15	Fósforo	P	30,9738	1,82	44,1	280
31	Gálio	Ga	69,72	5,9	29,5	1983
1	Hidrogênio	H	1,00797	0,09	-262	-252,8
53	Iodo	I	125,9040	4,93	113,6	184,34
3	Lítio	Li	6,939	0,534	179	1336
12	Magnésio	Mg	24,312	1,74	657	1107
25	Manganês	Mn	54,9381	7,2	1221	1900
80	Mercúrio	Hg	200,59	13,558	-38,8	356,58
42	Molibdênio	Mo	95,94	10,2	2622	4800
28	Níquel	Ni	58,71	8,9	1453	2900
79	Ouro	Au	196,967	19,25	1063	2600
8	Oxigênio	O	15,9997	1,429	-218,7	-182,68
46	Paládio	Pd	106,4	11,97	1555	2200
78	Platina	Pt	195,09	21,45	1773	4300
19	Potássio	K	39,102	0,86	63,5	760
47	Prata	Ag	107,870	10,5	960	1950
34	Selênio	Se	78,96	4,26	220	688
14	Silício (crit.)	Si	28,086	2,4	1414	2355
11	Sódio	Na	22,9898	0,97	97,7	880
81	Tálio	Tl	204,37	11,84	303	1457
52	Telúrio	Te	127,60	6,24	452	1390
22	Titânio	Ti	47,90	4,4	1800	> 3000
92	Urânio	U	238,09	19,0	1689	-
23	Vanádio	V	50,942	6,07	1726	> 3000
74	Volfrâmio	W	183,85	19,3	3380	5900
30	Zinco	Zn	65,37	7,1	419,4	907

Fonte: Tabela auxiliar MERCK (1971).

TABELA 21. Concentrações usuais de diversos ácidos comerciais

Elementos	% em peso	Densidade D20° 4°	Grau	
			Baumé	Normalidade*
Ácido acético glacial	96	1,06	8	17
Ácido acético glacial 99-100%	99-100	1,06	8	18
Ácido acético diluído	30	1,04	5,4	5
Ácido clorídrico	25	1,12	16	8
Ácido clorídrico conc. (1,16)	32	1,16	20	10
Ácido clorídrico conc. (1,18)	36	1,18	22	12
Ácido clorídrico fumegante	38	1,19	23	12,5
Ácido fórmico	98-100	1,22	26	26
Ácido fosfórico	25	1,15	19	9
Ácido fosfórico conc. (1,71)	85	1,69	59	45
Ácido fosfórico conc. (1,75)	89	1,75	62	48
Ácido nítrico	25	1,15	18,6	5
Ácido nítrico conc.	65	1,40	41	14
Ácido nítrico fumegante	ca.99%	1,51	49	21
Ácido sulfúrico conc.	95-97	1,84	66	36
Ácido sulfúrico diluído	16	1,11	14	4
Ácido sulfúrico fumegante aprox. 65% SO ₃	-	1,99	72	-
Anidrido acético	90	1,07	10	-

Fonte: Tabela auxiliar MERCK (1971).

*Valores aproximados.

TABELA22. Indicadores de ácidos e bases.

Indicador	Zona de viragem ph	Mudança de cor
Azul de timol	1,2 – 2,8	Vermelho – amarelo
Púrpura de m-cresol	1,2 – 2,8	Vermelho – amarelo
4-Dimetilaminoazobenzeno	2,9 – 4,0	Vermelho – alaranjado-amarelado
Azul de bromofenol	3,0 – 4,6	Amarelo – violeta-vermelhado
Vermelho congo	3,0 – 5,2	Violeta-azulado – alaranjado-vermelhado
Alaranjado de metila	3,1 – 4,4	Vermelho – alaranjado-amarelado
Verde de bromocressol	3,8 – 5,4	Amarelo – azul
Indicador misto 5 Merck	4,4 – 5,8	Violeta-vermelhado – verde
Vermelho de metila	4,4 – 6,2	Vermelho – amarelo-alaranjado
Tornassol	5,0 – 8,0	Vermelho – azul
Púrpura de bromocressol	5,2 – 6,8	Amarelo – púrpura
Vermelho de bromofenol	5,2 – 6,8	Amarelo-alaranjado – púrpura
Azul de bromotimol	6,0 – 7,6	Amarelo – azul
Vermelho de fenol	6,4 – 8,2	Amarelo – vermelho
Vermelho neutro	6,8 – 8,0	Vermelho-azulado – amarelo-alaranjado
Vermelho de cresol	7,0 – 8,8	Amarelo – púrpura
Púrpura de m-cresol	7,4 – 9,0	Amarelo – púrpura
Azul de timol	8,0 – 9,6	Amarelo – azul
Fenolftaleína	8,2 – 9,8	Incolor – violeta-vermelhado
Timolftaleína	9,3 – 10,5	Incolor – azul
Amarelo de alizarina GG	10,0 – 12,1	Amarelo claro – amarelo acastanhado
Azul de épsilon	11,6 – 13,0	Alaranjado – violeta

Fonte: Tabela auxiliar MERCK (1971).

15. REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 - ed. Washington, 1975. 1094 p.
- ANNISON, E.F.; LEWIX, D. **Metabolism in the rumen**. London: Methuen, 1959. 184 p.
- BLANCHAR, R. W; REHM, G.; CALDWELL, A. C. Sulfur in plant materials by digestion with nitric and perchloric acid. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 29, p. 71-72. 1965.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A.. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society Agronomy Wisconsin, 1965. p.1149-1178.
- BRASIL Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. **Análises de corretivos, fertilizantes e inoculantes métodos oficiais** Brasília, DF, 1988. 103 p.
- CHAPMAN, H. D; PRATT, P. F. **Methods of analysis for soils, plant and waters**. Riverside: University of California, 1961. 309 p.
- CRAMPTON, E. W.; HARRIS, L. E. **Applied animal nutrition**. 2. ed., São Francisco: Freeman, 1989. 749 p.
- CRAMPTON, E. W.; MAYNARD, L. A. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. **Journal Nutrition**, Bethesda, v. 15, n. 4, p. 383-395, 1959.
- FICK, K. R., MILLER, S. M., FUNK, J. D., McDOWELL, L. R., HOUSER, R. H.; SILVA, R. M. **Método de determinação de minerais em tecidos e plantas**. Gainesville: Florida of University, 1976. 62 p.
- HARRIS, L. E. **Os métodos químicos e biológicos empregados na análise de alimentos**. Gainesville: Florida of University, 1970. Paginação irregular.

LENKEIT, W.; BECKER, M. **Inspeção e apreciação de forragens**. Lisboa: Ministério da Economia de Portugal, 1956. 152 p. (Boletim Pecuário, 2).

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, J. K. **Nutrição animal**. 2. ed. Rio de Janeiro, Freitas Bastos, 1974. 550 p.

MERCK. Reagentes Merck: **tabelas auxiliare para o laboratório químico**. Darmstadt, 1971. 22 p.

PHILLIPSON, A. T. **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**. Newcastle: Ypon Tyne, Oriel Press, 1970. 636 p.

PEIXOTO, C. M. **Silagem de milho**. Pionner Sementes, Santa Cruz, v. 4, n. 6, p. 11, 1993. (Informe Técnico)

QUICKE, O.V.; BENTLEY, O.G. Lignin and metoxyl groups as related to the decreasedof digestibilities of matures foragens. **Journal Agricultural Science**, Cambridge, v. 49, n. 1, p. 365-73, 1959.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros - Departamento de Química, 1974. 56 p.

TABATABAI, M. A.; BREMMER, J. M. A simple turbidimetric method of determining total sulfur in plant materials. **Agronomy Journal**, Madison, v. 62, p. 805-806, 1970.

TEDESCO M. J.; GIANELLO C.; BISSANI C. A.; BOHNEN H.; VOLKWEIGS S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. p. 33-52.

TEIXEIRA, J.C; TEIXEIRA LÚCIA DE F. A. C. **Do alimento ao leite: entenda a função ruminal**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. 1998. v. 1. 72 p.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A.. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**. Oxford, v. 18, p. 104-111, 1963.

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., 1965, Sao Paulo. **Proceedings**. Sao Paulo: Secretaria de Agricultura, 1965. p. 783-789.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Development of a lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Baltimore,, v. 51, p. 780-785, 1968.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents is the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Baltimore. v. 46, n. 5, p. 829-35, 1963.

VAN SOEST, P.J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by Ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. **Journal of Animal Science**. Champaign. v. 24, n. 3, p. 834-43, 1965.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.26, n. 1, p. 119-128, 1967.