

Análises bromatológicas para determinação da qualidade nutricional de forrageiras – Compêndio de POPs



ISSN 1983-974X
outubro, 2017

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

Documentos 236

Análises bromatológicas para determinação da qualidade nutricional de forrageiras – Compêndio de POPs

Gustavo Eugenio Gerhard Barrocas
Janaína Paula Marques Tanure
Rodrigo da Costa Gomes

Embrapa
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS, 79106-550

Fone: (67) 3368 2000

Fax: (67) 3368 2150

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Thais Basso Amaral*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Alexandre Romeiro de Araújo, André Dominghetti Ferreira, Andréa Alves do Egito, Kadijah Suleiman Jaghub, Liana Jank, Lucimara Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Rodney de Arruda Mauro, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Imagens da capa:

1ª edição

Versão online (2017)

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 Gado de Corte.**

Análises bromatológicas para determinação da qualidade nutricional de forrageiras –
Compêndio de POPs [recurso eletrônico] / Gustavo Eugênio Gerhard Barrocas... [et
al] – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2017.
138 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 236).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC236.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 17 de outubro de 2017).

Outros autores: Janaína Paula Marques Tanure; Rodrigo da Costa Gomes.

1. Análise bromatológica. 2. Forrageiras. 3. Embrapa Gado de Corte. I. Barrocas, Gustavo Eugênio Gerhard. II. Tanure, Janaína Paula Marques. III. Gomes, Rodrigo da Costa.

Autores

Gustavo Eugenio Gerhard Barrocas

Químico, Pesquisador, Embrapa Gado de Corte,
Campo Grande, MS

Janaína Paula Marques Tanure

Bióloga, Mestre em Genética e Melhoramento,
Analista, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande,
MS

Rodrigo da Costa Gomes

Zootecnista, Doutorado em Qualidade e
Produtividade Animal, Pesquisador, Embrapa Gado
de Corte, Campo Grande, MS

Sumário

Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).....	9
Determinação da fibra em detergente neutro (FDN).....	19
Determinação da fibra em detergente ácido (FDA)	29
Determinação de nitrogênio/proteína bruta (N/PB)	39
Determinação de digestibilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca e/ou da matéria orgânica (DIVMS/DIVMO)	49
Determinação de lignina via ácido sulfúrico e de celulose	61
Determinação de atividade da enzima alfa-amilase	69
Determinação de sílica	77
Determinação de nitrogênio amoniacal em silagens	84
Determinação de digestibilidade por produção de gás.....	92
Determinação de extrato etéreo (EE)	111
Determinação de macroelementos	120
Determinação de microelementos	130

Análises bromatológicas para determinação da qualidade nutricional de forrageiras – Compêndio de POPs

*Gustavo Eugenio Gerhard Barrocas
Janaína Paula Marques Tanure
Rodrigo da Costa Gomes*

Apresentação

As análises bromatológicas para determinação de qualidade nutricional são metodologias estabelecidas há muitos anos e consagradas para a avaliação de alimentos para animais, sendo amplamente utilizadas tanto em instituições de ensino e pesquisa quanto em laboratórios privados ao redor de todo o mundo. Os métodos analíticos compilados nesta publicação foram desenvolvidos e validados para as condições específicas do Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte e são utilizados no desenvolvimento de diversas tecnologias como na produção de novas cultivares forrageiras, de técnicas de manejo de pastagens, de suplementação alimentar a pasto e de alimentação de bovinos em regime de confinamento. São, portanto, de importância estratégica no desenvolvimento e garantia da qualidade de inúmeras tecnologias relacionadas à cadeia produtiva da bovinocultura de corte, desenvolvidas na Unidade e oferecidas à sociedade.

Devido à sua importância, os métodos foram incluídos como Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) no Sistema Integrado de Gestão (SIG) da Embrapa Gado de Corte. O SIG congrega requisitos das principais normas, nacionais e internacionais, e da legislação pertinente à Gestão da Qualidade, Gestão Ambiental, Saúde e Segurança do Traba-

lhador e tem abrangência transversal nos cinco macroprocessos da Embrapa Gado de Corte: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I), Transferência de Tecnologia (TT), Administração (ADM), Desenvolvimento Institucional (DI), Tecnologia da Informação (TI) e Comunicação Organizacional (CO). O SIG é um dos pilares do Modelo Integrado de Gestão da Embrapa Gado de Corte, modelo inovador e dinâmico, com foco em melhoria contínua de processos e na qualidade e excelência para resultados, que dá subsídios para que a Unidade possa alcançar a curto, médio e longo prazo, a visão de futuro almejada.

A divulgação desse documento serve como veículo de compartilhamento de um conjunto de análises bromatológicas estabelecidas e validadas para a determinação da qualidade nutricional de forrageiras, que podem servir como referência analítica para outras instituições de pesquisa e laboratórios que façam uso dessas metodologias em seus experimentos de pesquisa e/ou análises laboratoriais.

Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO)

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico*

Código SIG: PM.057.002 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinar os teores de matéria seca por secagem em estufa a 105°C e da matéria orgânica por calcinação em forno mufla a 550°C.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO) no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal,**

nutrição animal e alimentos: 1. coleta, acondicionamento e preparo de amostras. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 43-66.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** Viçosa, UFV, 1981. 166p.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

Formulários aplicáveis

FO.057.003 – Determinação da matéria seca e da matéria orgânica.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
MS	Matéria Seca
MO	Matéria Orgânica

EPLNA: programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%MS: porcentagem de matéria seca da amostra. Em amostras de origem vegetal também é chamada de matéria seca definitiva, pelo fato de já ser sido feita a pré-secagem da amostra antes da moagem.

%MO: porcentagem de matéria orgânica da amostra, que é eliminada na calcinação.

%Cinzas: porcentagem do resíduo resultante da calcinação da amostra em forno mufla.

Os valores de %MO e %Cinzas são complementares, ou seja, podem ser obtidos por diferença, pois $\%MO + \%Cinzas = 100$.

Procedimento

Sumário do método

As determinações da MS e MO são comumente realizadas em produtos e subprodutos de origem animal, vegetal e mineral, rações e concentrados. O valor em porcentagem da matéria seca serve para corrigir os resultados de outras determinações bromatológicas, porque estes são expressos com base na matéria seca da amostra. O valor em porcentagem da matéria orgânica é usado no cálculo do resultado da digestibilidade “*in vitro*” da matéria orgânica de amostras vegetais, e por diferença, também no teor de cinzas da amostra.

O valor da MS é obtido após a secagem da amostra em estufa a 105°C por no mínimo seis horas, sendo a porcentagem do peso seco em relação ao peso total. O valor da MO, que é determinada sequencialmente à MS, é a porcentagem do peso seco da amostra que é perdido após a calcinação em forno mufla a 550°C por quatro horas. O valor das cinzas é obtido por diferença da MO.

Condutas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) Sempre utilizar pinças de metal para colocar e retirar os cadinhos com amostras das estufas e fornos mufla. Elas devem ter um comprimento suficiente para garantir o manuseio seguro dos materiais.
- c) O manuseio dos materiais e amostras dentro das muflas e estufas devem ser realizados com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.
- d) No caso da necessidade de utilização de ácido nítrico concentrado ou peróxido de hidrogênio a 30% (m/v) para pré-extração de gordura ou clareamento das cinzas, estes procedimentos devem ser realizados dentro de capela de exaustão.

Informações da amostra

- a) As amostras de origem vegetal e de fezes devem ser pré-secas e moídas com peneira de 1 mm;
- b) Em outros tipos de amostras a análise pode ser feita no material como fornecido, a não ser que o solicitante da análise indique a necessidade de pré-processamento.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Estufa de secagem sem circulação de ar;

- c) Forno mufla;
- d) Capela de exaustão.

Materiais

- a) Pinça de aço inoxidável;
- b) Espátula de aço inoxidável, meia cana.

Vidraria

- a) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (com indicador de umidade);
- b) Cadinhos de porcelana.

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e reagentes

- a) Ácido nítrico concentrado;
- b) Peróxido de hidrogênio a 30% (m/v).

Padrões

Em cada lote de amostras é utilizada uma amostra padrão fornecida pelo EPLNA, para comparação do resultado obtido, com o fornecido pelo programa.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Colocar o cadinho onde será pesada a amostra (previamente lavado e seco em estufa a 105°C por uma hora), em forno mufla a 600°C durante 30 minutos.
- b) Retirar o cadinho do forno mufla, colocar em dessecador, deixar esfriar por uma hora e pesar em balança analítica com precisão de 0,0001 g (P1). Registrar o peso no FO.057.003.
- c) Adicionar de 1 a 5 g da amostra ao cadinho e pesar novamente (P2). Registrar o peso no FO.057.003.
- d) Transferir o cadinho com a amostra para estufa a 105°C, até massa constante (aproximadamente seis horas). Pode-se pesar maior número de amostras e colocá-las na estufa ao final do expediente, retirando-as na manhã seguinte. A abertura frequente da estufa ou a presença de outros materiais úmidos ou com teor elevado de umidade na estufa pode requerer tempo maior para secagem das amostras.
- e) Retirar a amostra da estufa, deixar resfriar em dessecador por uma hora e pesar (P3). Registrar o peso no FO.057.003.
- f) Para se dar sequência na determinação de MO, coloca-se o cadinho (com a amostra seca em estufa e pesada) no forno mufla. Aumentar lentamente a temperatura até 600°C para evitar queima violenta do material e, conseqüentemente, as perdas. Deixar nessa temperatura de 600°C por quatro horas.

g) Desligar o forno e esperar que atinja aproximadamente 100°C. Logo após, transferir a amostra para dessecador.

h) Após esfriar por uma hora no dessecador, realizar a pesagem do material (P4). Registrar o peso no FO.057.003.

i) Para amostras com alto teor de gordura, deve-se fazer pré-extração da gordura antes da incineração. Para isso, adicionar à amostra duas ou três gotas de ácido nítrico concentrado (HNO₃) e deixar sobre chapa aquecedora, até a secagem do ácido, dentro de capela de exaustão. Esse procedimento evita que haja perda de material em função de eclosão da amostra.

j) Quando não se obtiver cinzas claras após o período mínimo de calcinação, deve-se adicionar duas a três gotas de ácido nítrico (HNO₃) concentrado ou de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% (m/v), e retornar ao forno mufla por mais uma hora.

k) Cinzas escuras indicam que a calcinação não foi completa. A adição de HNO₃ ou H₂O₂ auxilia na continuidade da oxidação da amostra.

Cálculos

Para se obter os valores da %MS, %MO e %Cinzas, proceder aos cálculos indicados abaixo, fazendo uso dos registros de P1, P2, P3 e P4:

$$\%MS = \frac{(P3 - P1) \times 100}{(P2 - P1)}$$

$$\%MO = \frac{(P3 - P4) \times 100}{(P3 - P1)}$$

$$\% \text{Cinzas} = 100 - \% \text{MO}$$

Onde:

P1: peso do cadinho (g)

P2: peso do cadinho + amostra (g)

P3: peso do cadinho + amostra seca na estufa (g)

P4: peso do cadinho + amostra calcinada na mufla (g)

Controle de qualidade

a) O resultado obtido para a amostra utilizada como controle deve ser comparado com o resultado fornecido pelo EPLNA.

b) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

a) Para amostras de misturas minerais e de fezes contendo óxido de cromo (III) como marcador de digestibilidade, os resíduos deverão ser descartados como resíduos químicos. Os resíduos deverão ser colocados em recipientes apropriados, que serão descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

- b) Os resíduos dos demais tipos de amostras deverão ser descartados como lixo comum.
- c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

- a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.
- b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.
- c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.
- d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação da fibra em detergente neutro (FDN)

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico*

Código SIG: PM.057.003 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinar o teor de fibra em detergente neutro (FDN) de amostras vegetais, por digestão a quente do material em solução específica de detergente neutro, seguida de filtração para obtenção do resíduo insolúvel.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de fibra em detergente neutro (FDN) no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares:

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H.

G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 2. métodos de análise**. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 249-253.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa, UFV, 1981. 166p.

Referências cruzadas:

DQ.027.00 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

PM.057.011 – Determinação da atividade da enzima alfa-amilase.

Formulários aplicáveis

FO.057.004 – Determinação de fibra em detergente neutro.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
FDN	Fibra em detergente neutro
MS	Matéria Seca

EPLNA: Programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

%FDN: Porcentagem da fibra em detergente neutro, que corresponde ao teor de componentes das paredes celulares da amostra, insolúveis na solução de detergente usada na análise.

Procedimento

Sumário do método

A determinação da fibra em detergente neutro é utilizada em produtos e subprodutos de origem vegetal, e é um dos indicadores do valor nutricional da amostra. Neste procedimento se separa o conteúdo celular, constituído principalmente de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água, da parede celular (parte da forrageira insolúvel em detergente neutro), também chamada fibra em detergente neutro (FDN) que é constituída basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada.

A amostra é digerida, em ebulição e sob refluxo, em uma solução de detergente neutro por uma hora, solubilizando todo o conteúdo celular. Em seguida é feita a filtração a vácuo, lavando o material do cadinho com água quente e acetona, restando o resíduo insolúvel (FDN).

Condutas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) Sempre utilizar pinças de metal para colocar e retirar os cadinhos com amostras das estufas e fornos mufla. Elas devem ter um comprimento suficiente para garantir o manuseio seguro dos materiais.
- c) O manuseio dos materiais e amostras dentro dos fornos muflas, estufas e blocos digestores devem ser realizados com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.
- d) A filtração das amostras deve ser feita sempre no interior da capela de exaustão.

Informações da amostra

As amostras de origem vegetal devem ser pré-secas a 65°C e moídas com peneira de 1 mm.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;
- c) Bloco digestor para análise de fibra, com controlador de temperatura e condensadores;
- d) Agitador magnético com aquecimento;
- e) Estufa sem circulação de ar;
- f) Forno mufla, com controlador de temperatura;

- g) Capela de exaustão;
- h) Bomba de vácuo, com sistema de filtração.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável.

Vidrarias

- a) Tubos de vidro para a digestão de amostras, próprios do bloco digestor;
- b) Béquer de 500 mL;
- c) Balão volumétrico de 1.000 mL;
- d) Proveta de 50 mL;
- e) Bastões de vidro (aproximadamente 10 cm);
- f) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade);
- g) Cadinho filtrante de vidro borossilicato, com placa porosa de vidro sinterizado, com porosidade de média a grossa (100 a 160 μm).

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e reagentes

- a) Sulfato láurico de sódio (dodecil sulfato de sódio ou lauril-sulfato de sódio) P.A.;

- b) Sal dissódico do EDTA (etilenodiaminotetraacetato dissódico) P.A.;
- c) Borato de sódio decahidratado P.A.;
- d) Fosfato ácido de sódio (fosfato de sódio dibásico) anidro P.A.;
- e) 2-Metoxietanol (éter monometílico do etilenoglicol) P.A.;
- f) Solução de detergente neutro;
- g) Acetona P.A.;
- h) Decahidronaftaleno, (decalina) P.A.;
- i) Enzima alfa-amilase termoestável (Termamyl 120 L);
- j) Ureia P.A.

Padrões

Em cada lote de amostras é analisada uma amostra padrão fornecida pelo EPLNA, para comparação do resultado obtido, com o fornecido pelo programa.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de ensaio

Análise

a) Pesar, em balança analítica, em torno de 1 g de amostra com precisão de 0,0001 g (P1), e transferir para tubo de digestão. O peso da

amostra deve ser registrado no FO.057.004.

b) Adicionar 100 mL de solução de detergente neutro, colocar o tubo no bloco digestor e conectar o condensador.

c) Fazer a digestão, a aproximadamente 125°C, por exatamente 60 minutos contados a partir do início da ebulição.

d) Transferir para cadinho filtrante, previamente seco por uma hora a 105°C e pesado (P2). O peso do cadinho deve ser registrado no FO.057.004.

e) Filtrar por sucção a vácuo imediatamente após a digestão do material, isto é, quando ainda estiver bem quente. A sucção deve ser lenta no início e mais forte no final.

f) Dispersar o resíduo fibroso da digestão sobre a placa porosa do cadinho filtrante com um bastão de vidro e lavar três vezes com água destilada fervente, ou até não haver mais presença de espuma, tendo o cuidado de lavar tanto as paredes do tubo como as paredes do cadinho.

g) Em seguida, fazer duas lavagens com acetona, utilizando 30 a 40 mL, mexendo o resíduo com bastão de vidro, a fim de que o solvente entre em contato com todas as partículas da fibra.

h) Secar em estufa a 105°C por 8 horas, ou durante a noite.

i) Esfriar em dessecador e pesar (P3). Registrar o peso no FO.057.004.

Pré-tratamento para amostras com alto teor de amido

a) Para amostras com alto teor de amido, deverá ser feito um tratamento preliminar, adicionando-se à amostra no tubo de vidro, 30 mL de solução de ureia 8,0 mol/L, 2 mL de solução de alfa-amilase termo estável e incubar a 80-90°C por 5 minutos.

b) A seguir, adicionar 100 mL de solução de detergente neutro, levar à ebulição e, após 40 minutos, adicionar mais 2 mL da solução de alfa-amilase. Continuar a digestão até completar os 60 minutos e seguir o procedimento descrito no subitem 6.7.1, a partir da alínea d), para a filtração da amostra e finalização da análise.

c) A concentração da solução de enzima alfa-amilase para as duas adições de 2 mL, deve ser determinada pelo teste de atividade da enzima concentrada, descrita em POP específico para este procedimento (PM.057.011).

Limpeza dos cadinhos de filtração

a) Para limpeza e desobstrução dos cadinhos de filtração, eles devem ser calcinados em forno mufla por uma hora a 500°C.

b) Após esfriar, passar água destilada fervente através da placa porosa (superfície de filtração) nos dois sentidos.

Cálculos

Para se obter o valor da %FDN, proceder aos cálculos indicados abaixo, fazendo uso dos registros de P1, P2 e P3:

$$\%FDN = \frac{((P3 - P2) \times 100)}{P1}$$

Onde:

P1: peso da amostra (g);

P2: peso do cadinho vazio (g);

P3: peso do cadinho com o resíduo (g).

Para o valor de %FDN corrigido pela matéria seca (%FDNc) basta divi-

dir o resultado pela %MS e multiplicar por 100:

$$\%FDNc = \frac{\%FDN \times 100}{\%MS}$$

%MS

Controle de qualidade

- a) Após o preparo de uma nova solução de detergente neutro, analisar 2 ou 3 amostras padrão do EPLNA.
- b) Analisar uma amostra padrão do EPLNA para cada grupo de 15 a 20 amostras.
- c) O resultado obtido para a amostra utilizada como controle deve ser comparado com o resultado fornecido pelo EPLNA.
- d) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

- a) Os resíduos gerados na digestão, após a filtração, contendo a solução de detergente neutro com acetona, são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.
- b) O material fibroso da amostra, que fica retido no cadinho, pode ser descartado como lixo comum.

c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

8. Anexos

Não se aplica.

Determinação da fibra em detergente ácido (FDA)

Procedimento Operacional Padrão (POP) de Método Analítico

Código SIG: PM.057.004 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinação do teor de fibra em detergente ácido (FDA) de amostras vegetais, por digestão a quente do material em solução específica de detergente ácido, seguida de filtração para obtenção do resíduo insolúvel.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de fibra em detergente ácido (FDA) no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produ-

tos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 2. métodos de análise.** São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 258-260.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** Viçosa, UFV, 1981. 166p.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

Formulários aplicáveis

FO.057.005 – Determinação de fibra em detergente ácido, lignina via ácido sulfúrico, celulose e sílica.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

CTAB	Brometo de cetil trimetilamônio
EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal

MS	Matéria seca
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro

EPLNA: programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

%FDA: Porcentagem de fibra em detergente ácido, que é a parte das paredes celulares da amostra insolúvel na solução de detergente usada na análise.

%FDN: Porcentagem da fibra em detergente neutro, que corresponde ao teor de componentes das paredes celulares da amostra, insolúveis na solução de detergente usada na análise.

Procedimento

Sumário do método

A determinação da fibra em detergente ácido é utilizada em produtos e subprodutos de origem vegetal, e é um dos indicadores do valor nutricional da amostra. Essa é a porção menos digerível da parede celular e composta por lignina, celulose e sílica (cinza insolúvel). Conhecendo-se a porcentagem dos constituintes da parede celular (FDN) e da FDA da amostra, é possível calcular a fração de hemicelulose, apenas pela diferença entre estas frações.

A amostra é digerida, em ebulição e sob refluxo, em uma solução de

detergente ácido por uma hora, solubilizando todo o conteúdo celular e a hemicelulose. Em seguida é feita a filtração a vácuo, lavando o material do cadinho com água quente e acetona, restando o resíduo insolúvel (FDA).

Condutas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) Sempre utilizar pinças de metal para colocar e retirar os cadinhos com amostras das estufas e fornos mufla. Elas devem ter um comprimento suficiente para garantir o manuseio seguro dos materiais.
- c) O manuseio dos materiais e amostras dentro dos fornos mufla, estufas e blocos digestores devem ser realizados com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.
- d) A filtração das amostras deve ser feita sempre no interior da capela de exaustão.

Informações da amostra

As amostras de origem vegetal devem ser pré-secas a 65°C e moídas com peneira de 1 mm.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;

- c) Bloco digestor para análise de fibra, com controlador de temperatura e condensadores;
- d) Agitador magnético com aquecimento;
- e) Estufa sem circulação de ar;
- f) Forno mufla, com controlador de temperatura;
- g) Capela de exaustão;
- h) Bomba de vácuo, com sistema de filtração.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável;
- b) Pinceta plástica.

Vidrarias

- a) Tubos de vidro para a digestão de amostras, próprios do bloco digestor;
- b) Béquer de 500 mL;
- c) Balão volumétrico de 1.000 mL;
- d) Proveta de 50 mL;
- e) Bastões de vidro (aproximadamente 10 cm);
- f) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade);
- g) Cadinho filtrante de vidro borossilicato, com placa porosa de vidro sinterizado, com porosidade de média a grossa (100 a 160 μm).

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e Reagentes

- a) Brometo de cetil trimetilamônio (CTAB);
- b) Ácido sulfúrico concentrado P.A.;
- c) Solução de ácido sulfúrico a 0,5 mol/L;
- d) Solução de detergente ácido;
- e) Decahidronaftaleno P.A.;
- f) Acetona P.A.

Padrões

Em cada lote de amostras é analisada uma amostra padrão fornecida pelo EPLNA, para comparação do resultado obtido, com o fornecido pelo programa.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Pesar, em balança analítica, em torno de 1 g de amostra com precisão de 0,0001 g (P1), e transferir para tubo de digestão. O peso da amostra deve ser registrado no FO.057.005.
- b) Adicionar 100 mL de solução de detergente ácido, colocar o tubo no

bloco digestor e conectar o condensador.

- c) Fazer a digestão, a aproximadamente 125°C, por exatamente 60 minutos contados a partir do início da ebulição.
- d) Transferir para cadinho filtrante, previamente seco por uma hora a 105°C e pesado (P2). O peso do cadinho deve ser registrado no FO.057.005.
- e) Filtrar por sucção a vácuo imediatamente após a digestão do material, isto é, quando ainda estiver bem quente. A sucção deve ser lenta no início e mais forte no final.
- f) Dispersar o resíduo fibroso da digestão sobre a placa porosa do cadinho filtrante com um bastão de vidro e lavar três vezes com água destilada fervente, ou até não haver mais presença de espuma, tendo o cuidado de lavar tanto as paredes do tubo como as paredes do cadinho.
- g) Em seguida, fazer duas lavagens com acetona, utilizando 30 a 40 mL, mexendo o resíduo com bastão de vidro, a fim de que o solvente entre em contato com todas as partículas da fibra.
- h) Secar em estufa a 105°C por 8 horas, ou durante a noite.
- i) Esfriar em dessecador e pesar (P3). Registrar o peso no FO.057.005.

Limpeza dos cadelhos de filtração

- a) Para limpeza e desobstrução dos cadelhos de filtração, eles devem ser calcinados em forno mufla por uma hora a 500°C.
- b) Após esfriar, passar água destilada fervente através da placa porosa (superfície de filtração) nos dois sentidos.

Cálculos

Para se obter o valor da %FDA, proceder aos cálculos indicados abaixo fazendo uso dos registros P1, P2 e P3:

$$\%FDA = \frac{((P3 - P2) \times 100)}{P1}$$

Onde:

P1: peso da amostra (g)

P2: peso do cadinho vazio (g)

P3: peso do cadinho com o resíduo (g)

Para o valor de %FDA corrigido pela matéria seca (%FDAc) basta dividir o resultado pela %MS e multiplicar por 100:

$$\%FDAc = \frac{\%FDA \times 100}{\%MS}$$

$$\%Hemicelulose = \%FDN - \%FDA$$

Controle de qualidade

a) Após o preparo de uma nova solução de detergente ácido, analisar 2 ou 3 amostras padrão do EPLNA.

b) Analisar uma amostra padrão do EPLNA para cada grupo de 15 a 20 amostras.

c) O resultado obtido para a amostra utilizada como controle deve ser comparado com o resultado fornecido pelo EPLNA.

d) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

a) Os resíduos gerados na digestão, após a filtração, contendo a solução de detergente ácido com acetona, são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) O material fibroso da amostra, que fica retido no cadinho, pode ser descartado como lixo comum.

c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de nitrogênio/ proteína bruta (N/PB)

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico
Código SIG: PM.057.005 - Rev (00)*

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinação do teor de nitrogênio total da amostra utilizando o método de Kjeldahl.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de nitrogênio/proteína bruta (N/PB) no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal,

nutrição animal e alimentos: 1. coleta, acondicionamento e preparo de amostras. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 270-274.

SILVA, D.J. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, UFV, 1981. 166p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. Arlington, 1990. v.1, p.72-74.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

Formulários aplicáveis

FO.057.006 – Determinação de nitrogênio/proteína bruta.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
-------	---

N	Nitrogênio
PB	Proteína bruta
MS	Matéria seca

EPLNA: Programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%N: Porcentagem de nitrogênio da amostra.

%PB: Porcentagem de proteína bruta da amostra.

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

Procedimento

Sumário do método

A determinação de nitrogênio total é utilizada em produtos e subprodutos de origem animal, vegetal e mineral, rações e concentrados. Como a maioria das proteínas de amostras de origem vegetal contém em suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio, o valor de proteína bruta destas amostras é obtido por multiplicação pelo fator 6,25.

A amostra é digerida em ácido sulfúrico concentrado, a quente, e as proteínas e outros compostos nitrogenados são decompostos produzindo sulfato de amônio. Nesta etapa é adicionado sulfato de potássio ou de sódio para aumentar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico, e sulfato de cobre como catalisador da reação para facilitar e agilizar a digestão. O sulfato de amônio formado, na presença de hidróxido de sódio, libera amônia que após destilação por arraste de vapor é reco-

lhida e complexada em solução de ácido bórico com indicador. É feita então uma titulação com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico de concentração conhecida, determinando-se o teor de nitrogênio da amostra. O valor da proteína bruta das amostras de origem vegetal é obtido após a multiplicação do teor de nitrogênio por 6,25.

Condutas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) A digestão das amostras deve ser feita em capela de exaustão para esta finalidade (resistente a vapores de ácido sulfúrico), provida de lavador de gases, sempre utilizando máscara facial com filtros indicados para vapores ácidos e avental de napa.
- c) Usar luva de amianto para manuseio de vidraria quente.

Informações da amostra

- a) As amostras de origem vegetal devem ser pré-secas e moídas com peneira de 1 mm.
- b) Em outros tipos de amostras a análise pode ser feita no material como fornecido, a não ser que o solicitante da análise indique a necessidade de pré-processamento.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;

- c) Bloco digestor com controlador de temperatura;
- d) Capela de exaustão de gases apropriada para vapores de ácido sulfúrico, provida de lavador de gases;
- e) Microdestilador por arraste de vapor (tipo Kjeldahl);
- f) Titulador automático.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável

Vidrarias

- a) Frascos dosadores de líquidos
- b) Tubos de ensaio com borda reforçada (25 x 250 mm), próprios do bloco digestor
- c) Erlenmeyer de 125 mL

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e reagentes

- a) Mistura catalizadora;
- b) Solução de hidróxido de sódio a 40% (m/v);
- c) Solução de ácido bórico a 2% (m/v);
- d) Verde de bromocresol a 0,1% (m/v);

- e) Vermelho de metila a 0,1% (m/v);
- f) Solução receptora-indicadora de ácido bórico a 2% (m/v);
- g) Solução de THAM [tris(hidroximetil)aminometano] 0,05 N;
- h) Ácido sulfúrico concentrado;
- i) Solução de ácido sulfúrico 1,0 N (solução-estoque);
- j) Solução de ácido sulfúrico 0,05 N padronizado.

Padrões

Em cada análise é utilizada uma amostra padrão fornecida pelo EPLNA, para comparação do resultado obtido, com o fornecido pelo programa.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de Ensaio

Análise

- a) Pesar, usando a espátula de aço inoxidável meia cana, em torno de 0,2 g da amostra seca e moída em balança com precisão de 0,0001 g (P). O peso da amostra deve ser registrado no FO.057.006.
- b) Transferir as amostras para tubo de digestão de 25 x 250 mL. Preparar uma prova em branco que só não conterá a amostra.
- c) Adicionar aproximadamente 0,3 g de mistura catalisadora. Pode-se usar uma espátula ou colher dosadora para medir a quantidade necessária da mistura catalisadora.

- d) Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, empregando frasco dosador de reagentes, lavando as paredes dos tubos (girando-os na hora da adição).
- e) Colocar os tubos no bloco de digestão, aumentando a temperatura em 50°C a cada 15 minutos até 350°C e manter aquecendo até ser observado que a mistura está completamente clara, com uma coloração verde brilhante.
- f) O tempo médio de digestão é de aproximadamente, 45 minutos, podendo variar de acordo com a natureza da amostra e com o tipo de sistema de digestão. Durante a digestão, deve observar se existe material aderido nas paredes do tubo e que não sofreu completa digestão.
- g) É recomendável, durante a digestão, agitar o tubo por duas vezes mais ao final da digestão, de forma que o material aderido volte à mistura e seja digerido completamente.
- h) Retirar o tubo do bloco e deixar esfriar a temperatura ambiente.
- i) Colocar no tubo de digestão, aproximadamente, 20 mL de água destilada e agitar, para evitar a cristalização da mistura.
- j) Encaixar o tubo no microdestilador e colocar 10 mL da solução receptora-indicadora em erlenmeyer de 125 mL.
- k) Mergulhar o bico de saída do condensador do sistema de destilação na solução receptora-indicadora, contida no erlenmeyer.
- l) Adicionar, cuidadosamente, ao tubo, 15 mL de hidróxido de sódio a 40% e iniciar o aquecimento. Neste momento, os registros do sistema de destilação devem estar todos fechados, sendo que a saída do vapor que será produzido se dará para o condensador do sistema.
- m) Destilar por, aproximadamente, 10 minutos. A destilação só finalizará quando o erlenmeyer totalizar um volume de cerca de 50 mL.

Durante a destilação deve-se observar se o condensado, na saída do condensador está próximo à temperatura ambiente. Caso esteja acima, diminuir um pouco a temperatura do destilador.

n) Retirar o erlenmeyer do tubo de saída do condensador, lavar a ponta do tubo com água destilada, recolhendo-a no próprio erlenmeyer e, mantendo o tubo ainda no erlenmeyer, porém não mergulhado na solução.

o) Deixar destilar mais alguns segundos para que o condensado lave a parede interna da ponta do tubo. A coloração final da solução no erlenmeyer deverá estar verde cristalina.

p) Titular, usando titulador automático, o conteúdo do erlenmeyer, com ácido clorídrico 0,05 N ou ácido sulfúrico 0,05 N até coloração rósea clara e anotar o volume de ácido gasto na titulação da amostra (VA), assim como a normalidade exata do ácido (C) no FO.057.006.

q) Fazer o mesmo procedimento com a prova em branco, e anotar o volume da solução ácida gasta na titulação da prova em branco (VB) no FO.057.006.

Cálculos

Para se obter o valor da %N, proceder aos cálculos indicados abaixo:

$$\%N = \frac{(VA - VB) \times C \times 1,40067}{P}$$

Onde:

VA: volume gasto na titulação da amostra (mL)

VB: volume gasto na titulação da prova em branco (mL)

C: concentração do ácido (expressa em normalidade)

P: peso da amostra (g).

No caso de amostras vegetais, o cálculo da proteína é:

$$\%PB = \%N \times 6,25$$

Para os valores de nitrogênio e proteína bruta corrigidos pela matéria seca (%Nc e %PBc respectivamente) basta dividir os resultados pela %MS e multiplicar por 100:

$$\%Nc = \frac{\%N \times 100}{\%MS}$$

$$\%PBc = \frac{\%PB \times 100}{\%MS}$$

Controle de qualidade

a) Para cada lote (bloco de digestão de 40 tubos), deverá ser preparada uma prova em branco, pois seu volume é usado no cálculo da porcentagem de nitrogênio da amostra.

b) Inserir uma amostra padrão do EPLNA para cada bloco de digestão de 40 tubos.

c) O resultado obtido para a amostra utilizada como controle deve ser comparado com o resultado fornecido pelo EPLNA.

d) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

a) Os resíduos da digestão, que contém hidróxido de sódio, sulfatos de cobre, de amônio e de potássio (ou de sódio), e os resíduos da destilação/titulação, que contém ácido sulfúrico, ácido bórico, álcool etílico, verde de bromocresol e vermelho de metila, são considerados resíduos

químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas) para descarte. Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca e/ou da matéria orgânica (DIVMS/DIVMO)

Procedimento Operacional Padrão (POP) de Método Analítico
Código SIG: PM.057.007 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinar o valor da digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca (DIVMS) e/ou da matéria orgânica (DIVMO) em amostras vegetais, por incubação em líquido ruminal com saliva artificial, seguida de filtração para obtenção do resíduo insolúvel.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca (DIVMS) e/ou da matéria orgânica (DIVMO), no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produ-

tos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 1. Métodos de análise.** São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 234-239.

TILLEY, J.M.A. and TERRY, R.A. 1963. **A Two-stage Technique for the in vitro Digestion of Forage Crops.** J. British Grassl. Soc. 18: 104-111.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** Viçosa, UFV, 1981. 166p.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

IT.057.001 – Coleta de líquido ruminal.

Formulários aplicáveis

FO.057.008 – Determinação de digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS).

FO.057.009 – Determinação de digestibilidade “in vitro” da matéria orgânica (DIVMO).

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
DIVMS	Digestibilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca
DIVMO	Digestibilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria orgânica
MS	Matéria seca
MO	Matéria orgânica

EPLNA: Programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%DIVMS: Porcentagem da matéria seca da amostra que é solubilizada após dois estágios de incubação “*in vitro*”, onde é simulada a digestão pelo animal.

%DIVMO: Porcentagem da matéria orgânica da amostra que é solubilizada após dois estágios de incubação “*in vitro*”, onde é simulada a digestão pelo animal.

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

%MO: Porcentagem de matéria orgânica da amostra, que é eliminada na calcinação, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

Procedimento

Sumário do método

A técnica consiste em dois estágios de incubação, onde se tentam reproduzir as condições predominantes no rúmen-retículo do animal em tubos de ensaio, ou seja, na ausência de oxigênio e temperatura de 39°C. Na primeira etapa a amostra é incubada em líquido ruminal na presença de uma solução tampão por 48 horas, e na segunda etapa a atividade microbiana é paralisada pela adição de ácido clorídrico em presença de pepsina ficando a amostra incubada por mais um período 48 horas. Esta segunda etapa é recomendável, principalmente, para amostras de alta digestibilidade e ricas em proteínas. A quantidade de matéria seca ou matéria orgânica que desaparece após os dois períodos de incubação é considerada como a parte digerida da amostra, que é determinada pela diferença de peso.

Conduas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) Utilizar luvas de cano longo, fixadas próximo ao ombro, para o procedimento de coleta de líquido ruminal e para forrar os cadinhos tipo gooch com lã de vidro que serão usados para a filtração das amostras.
- c) Sempre utilizar pinças de metal para colocar e retirar os cadinhos com amostras das estufas e fornos mufla. Elas devem ter um comprimento suficiente para garantir o manuseio seguro dos materiais.
- d) O manuseio dos materiais e amostras dentro dos fornos muflas e estufas devem ser realizados com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.
- e) A filtração das amostras deve ser feita sempre no interior da capela de exaustão.

Informações da amostra

As amostras de origem vegetal devem ser pré-secas a 65°C e moídas com peneira de 1 mm.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;
- c) Banho-maria;
- d) Capela de exaustão;
- e) Potenciômetro;
- f) Estufa sem circulação de ar;
- g) Forno mufla, com controlador de temperatura;
- h) Bomba de vácuo, com sistema de filtração.

Materiais

- a) Garrafa térmica;
- b) Rolo de gaze “tipo queijo”;
- c) Lã de vidro;
- d) Reservatório de vidro ou plástico de até 4 litros

Vidrarias

- a) Frascos dosadores/dispensadores de líquidos;
- b) Tubos de ensaio de 100 mL;

- c) Rolhas de borracha para os tubos, com válvula tipo Bunsen* (Figura 1);
- d) Funil de vidro grande (diâmetro = 230 mm);
- e) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade);
- f) Cadinhos de porcelana tipo gooch;
- g) Bastão de vidro com ponta recoberta de borracha;
- h) Béqueres, provetas e pipetas.

*Esta válvula é composta de um tubo de vidro que atravessa a rolha; na extremidade superior do tubo é ajustado um pedaço de mangueira de borracha ou silicone, com um corte longitudinal de aproximadamente 6 mm de comprimento para escape de gás; a mangueira é fechada na extremidade livre com um pedaço de bastão de vidro.

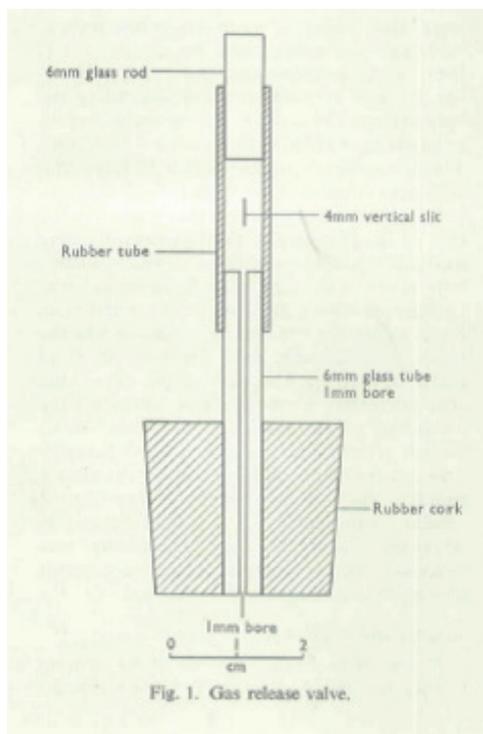


Figura 1 – Válvula tipo Bunsen.

Soluções, reagentes e padrões

- a) Bicarbonato de sódio P.A;
- b) Fosfato de sódio dibásico heptaidratado P.A;
- c) Cloreto de potássio P.A;
- d) Cloreto de sódio P.A;
- e) Sulfato de magnésio heptaidratado P.A;
- f) Cloreto de cálcio P.A;
- g) Ácido clorídrico concentrado P.A;
- h) Pepsina em pó (atividade proteolítica 1:10000);
- i) Solução tampão (de McDougall);
- j) Solução de coreto de cálcio a 4% (m/v);
- k) Saliva artificial;
- l) Solução de ácido clorídrico a 20% (v/v);
- m) Solução de pepsina a 5% (m/v);
- n) Líquido ruminal (Coleta descrita na IT.057.001);
- o) Cilindro de dióxido de carbono (CO₂) comercial.

Condições ambientais

Dois fatores muito importantes desta determinação são a anaerobiose e a temperatura. Todos os cuidados devem ser tomados para se evitar um contato mais prolongado do líquido ruminal e do inóculo (líquido ruminal com saliva artificial) com o ar atmosférico, assim como a manutenção da sua temperatura. O banho-maria a ser utilizado deve ter um bom controle de temperatura que deve ser mantida a 39°C durante todos os períodos de incubação. Caso contrário, durante o primeiro estágio, os microrganismos do rúmen podem não sobreviver, comprometendo assim os resultados da análise.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Determinar a matéria seca da amostra, para a correção do resultado da digestibilidade “*in vitro*”. No caso de haver interesse na digestibilidade “*in vitro*” da matéria orgânica, determinar também a matéria orgânica da amostra, conforme procedimentos descritos no PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).
- b) Pesar em torno de 0,5 g da amostra com precisão de 0,0001 g (P1), e transferir para os tubos de ensaio de 100 mL. O peso da amostra deve ser registrado no FO.057.008 no caso da DIVMS, ou no FO.057.009 no caso da DIVMO.
- c) Adicionar 2 mL de água destilada ou deionizada, para umedecer as amostras e colocar em banho-maria a 39°C.
- d) Transferir a saliva artificial para o recipiente plástico ou de vidro de até 4 litros, colocar em banho-maria a 39°C, deixar tempo suficiente para que a temperatura se estabilize e borbulhar dióxido de carbono (CO₂) até que o pH da solução fique na faixa de 6,9-7,1.
- e) Adicionar então o líquido ruminal na proporção de uma parte para cada 4 partes de saliva artificial, e continuar borbulhando dióxido de carbono por mais 10 minutos.
- f) Adicionar 50 mL do inóculo constituído da mistura de saliva artificial e líquido ruminal, por tubo de amostra, eliminar imediatamente o ar presente com dióxido de carbono e tampar os tubos com as rolhas de borracha com válvulas tipo Bunsen.
- g) Preparar quatro tubos, sem adição de amostra, e seguindo todas as etapas da análise, como provas em branco.
- h) Colocar em seguida os tubos em banho-maria com temperatura

constante de 39°C. O conteúdo dos tubos deve ser agitado vagarosamente para assegurar que todas as partículas da amostra estejam em contato com o inóculo. Esta agitação deve ser repetida duas vezes no primeiro dia e três vezes no segundo.

i) Após 48 horas de incubação, agitar vagorosamente os tubos, retirar as rolhas e lavar para dentro dos tubos quaisquer partículas que porventura tenham aderido às rolhas usando um mínimo de água destilada ou deionizada.

j) Adicionar lentamente 6 mL de ácido clorídrico a 20% em três etapas a cada tubo: 1 mL + 1 mL + 4 mL, para que a formação de espuma não cause a perda de amostra. Adicionar 2 mL de solução de pepsina a 5%, agitar, e retornar os tubos para o banho-maria por mais 48 horas a 39°C, agitando os tubos regularmente três vezes por dia.

k) No dia que antecede a filtração, forrar os cadinhos tipo gooch com lã de vidro (dentro de capela e com luvas de cano longo), passar água destilada ou deionizada quente sob vácuo, secar a 105°C durante a noite, resfriar em dessecador e pesar (P2). Registrar o peso no FO.057.008. Este peso é utilizado apenas no cálculo da DIVMS.

l) Filtrar a vácuo esfregando as paredes do tubo com um bastão de vidro com ponta recoberta de borracha para evitar perdas de material não digerido e lavando com água destilada ou deionizada quente.

m) Secar o cadinho com o resíduo da filtração em estufa a 105°C durante uma noite, esfriar em dessecador e pesar (P3). O peso deve ser registrado no FO.057.008 no caso da DIVMS, ou no FO.057.009 no caso da DIVMO.

n) No caso da determinação da DIVMO calcinar em forno mufla a 500°C por 3 horas, esfriar em dessecador e pesar (P4). O peso deve ser registrado no FO.057.009.

Cálculos

Para se obter o valor da %DIVMS, proceder aos cálculos indicados abaixo, fazendo uso dos registros de P1, P2, P3, da prova em branco (PB) e da %MS. O valor da prova em branco para a DIVMS ($PB = P3 - P2$) é obtido pela média dos valores das quatro repetições utilizadas.

$$\%DIVMS = \frac{\{(P1 \times \%MS/100) - [(P3 - P2) - PB]\} \times 100}{(P1 \times \%MS/100)}$$

Onde:

P1: peso da amostra (g);

P2: peso do cadinho de filtração (g);

P3: peso do cadinho com o resíduo (g);

PB: prova em branco para a DIVMS.

Para se obter o valor da %DIVMO, proceder aos cálculos indicados abaixo, fazendo uso dos registros de P1, P3, P4, da prova em branco (PB), da %MS e da %MO. O valor da prova em branco para a DIVMO ($PB = P3 - P4$) é obtido pela média dos valores das quatro repetições utilizadas.

$$\%DIVMO = \frac{\{(P1 \times \%MS \times \%MO/10000) - [(P3 - P4) - PB]\} \times 100}{(P1 \times \%MS \times \%MO/100)}$$

Onde:

P1: peso da amostra (g);

P3: peso do cadinho com o resíduo (g);

P4: peso do cadinho com o resíduo calcinado (g);

PB: prova em branco para a DIVMO.

Controle de qualidade

a) Como esta determinação envolve muitos fatores biológicos que afetam o resultado da análise, é recomendável que seja feita com repetição e considerada a média dos dois valores. As repetições devem ser feitas preferencialmente em semanas diferentes.

b) No caso da determinação da digestibilidade “in vitro” da matéria orgânica, como os cadinhos com os resíduos das amostras devem ser calcinados, a lâ de vidro deve ser previamente testada, pois não deve perder massa a 500°C.

c) Analisar duas amostras-padrão do EPLNA em cada corrida de amostras. Os padrões a serem inseridos nas corridas devem, se possível, ter resultados bem distintos entre eles.

d) Os resultados obtidos para as amostras utilizadas como controle devem ser comparados com os resultados fornecidos pelo EPLNA.

e) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

a) Os resíduos gerados na incubação, após a filtração, contendo a saliva artificial, líquido ruminal, ácido clorídrico e pepsina, são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) O material fibroso da amostra, que fica retido no cadinho, juntamente com a lã de vidro pode ser descartado como lixo comum.

c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de lignina via ácido sulfúrico e de celulose

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico
Código SIG: PM.057.010 - Rev (00)*

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinação do teor de lignina e de celulose de amostras vegetais, utilizando ácido sulfúrico a 72% (v/v) para reação com o resíduo da determinação da FDA.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam as atividades de determinação de lignina via ácido sulfúrico e de celulose no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produ-

tos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 2. métodos de análise**. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 265-268.

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

Referências cruzadas:

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

PM.057.004 – Determinação da fibra em detergente ácido (FDA).

Formulários aplicáveis

FO.057.005 - Determinação de fibra em detergente ácido, lignina via ácido sulfúrico, celulose e sílica.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
MS	Matéria seca
FDA	Fibra em detergente ácido

EPLNA: programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

%FDA: Porcentagem de fibra em detergente ácido, que é a parte das paredes celulares da amostra insolúvel na solução de detergente usada na análise.

Procedimento

Sumário do método

A determinação da lignina é utilizada em produtos e subprodutos de origem vegetal, e é um dos indicadores do valor nutricional da amostra. Essa é a porção menos digerível da forrageira.

Ao resíduo da determinação da FDA é adicionado ácido sulfúrico a 72% (v/v) para solubilizar a celulose, restando, após a filtração, a lignina e as cinzas insolúveis em ácido. Após a calcinação, que elimina a lignina, ficam as cinzas insolúveis em ácido que depois da reação com ácido bromídrico concentrado, resta a sílica.

Os teores dos componentes são determinados pela diferença de peso entre os resíduos nas etapas da análise.

Condutas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) Sempre utilizar pinças de metal para colocar e retirar os cadinhos com amostras das estufas e fornos mufla. Elas devem ter um comprimento suficiente para garantir o manuseio seguro dos materiais.
- c) O manuseio dos materiais e amostras dentro dos fornos mufla, estufas e blocos digestores devem ser realizados com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.
- d) A filtração das amostras deve ser feita sempre no interior da capela de exaustão.

Informações da amostra

As amostras de origem vegetal devem ser pré-secas a 65°C e moídas com peneira de 1 mm.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;
- c) Estufa sem circulação de ar;
- d) Forno mufla, com controlador de temperatura;
- e) Capela de exaustão
- f) Bomba de vácuo, com sistema de filtração.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável;
- b) Bandeja de vidro retangular tipo Pyrex®;
- c) Pinceta plástica.

Vidrarias

- a) Béquer de 2.000 mL;
- b) Balão volumétrico de 100 mL;
- c) Proveta de 1.000 mL;
- d) Bastões de vidro (aproximadamente 10 cm);
- e) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade);
- f) Cadinho filtrante de vidro borossilicato, com placa porosa de vidro sinterizado, com porosidade de média a grossa (100 a 160 μm).

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e reagentes

- a) Ácido sulfúrico concentrado P.A.;
- b) Solução de ácido sulfúrico a 72% (v/v).

Padrões

Em cada lote de amostras é analisada uma amostra padrão fornecida pelo EPLNA, para comparação do resultado obtido, com o fornecido pelo programa.

Condições ambientais

A temperatura da sala onde é feito o tratamento do resíduo da FDA com a solução de ácido sulfúrico a 72% (v/v) em bandeja de vidro, deve ser mantida entre 20 e 23°C para que não haja interferência na reação.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Colocar o cadinho com o resíduo da determinação da FDA em bandeja de vidro, cobrir o conteúdo com a solução de ácido sulfúrico a 72% (v/v) frio (5°C) e misturar com um bastão de vidro até formar uma pasta macia, quebrando todos os aglomerados.
- b) Encher o cadinho até a metade com ácido, misturar e deixar o bastão de vidro permanecer dentro do cadinho.
- c) Manter por três horas em ambiente com temperatura entre 20 e 23°C, deixando que o ácido escoe lentamente, completando o volume do cadinho frequentemente (a amostra precisa ficar coberta com o ácido sulfúrico a 72%).
- d) Filtrar a vácuo até a remoção completa da solução ácida, e lavar três vezes o resíduo com água fervente. Lavar e retirar o bastão de vidro do cadinho.
- e) Levar o cadinho com o resíduo (lignina e cinzas insolúveis) para estufa de secagem a 105°C e secar por oito horas ou durante a noite.
- f) Retirar o cadinho da estufa, esfriar em dessecador e pesar (P4). Registrar o peso no FO.057.005.
- g) Calcinar o cadinho com o resíduo em forno mufla a 500°C por três horas, esperar esfriar, retirar e colocar em dessecador.
- h) Após atingir a temperatura ambiente, pesar (P5) e registrar o peso no FO.057.005.

Limpeza dos cadinhos de filtração

- a) Para limpeza e desobstrução dos cadinhos de filtração, eles devem ser calcinados em forno mufla por uma hora a 500°C.
- b) Após esfriar, passar água destilada fervente através da placa porosa (superfície de filtração) nos dois sentidos.

Cálculos

$$\% \text{Lignina} = \frac{((P4 - P5) \times 100)}{P1}$$

$$\% \text{Celulose} = \frac{((P3 - P4) \times 100)}{P1}$$

Onde:

P1: peso da amostra utilizada na análise de FDA (g);

P3: peso do cadinho com o resíduo da FDA;

P4: peso do cadinho com o resíduo após o tratamento com H₂SO₄ (g);

P5: peso do cadinho com o resíduo da calcinação (g).

Para os valores de %Lignina e de %Celulose corrigidos pela matéria seca (%Ligninac e %Celulosec) basta dividir os resultados pelo valor da %MS e multiplicar por 100:

$$\% \text{Ligninac} = \frac{\% \text{Lignina} \times 100}{\% \text{MS}}$$

$$\% \text{Celulosec} = \frac{\% \text{Celulose} \times 100}{\% \text{MS}}$$

Controle de qualidade

- a) Analisar uma amostra padrão do EPLNA para cada grupo de 15 a 20 amostras.
- b) O resultado obtido para a amostra utilizada como controle deve ser comparado com o resultado fornecido pelo EPLNA.
- c) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

a) O resíduo gerado na filtração, contendo a solução de ácido sulfúrico a 72% (v/v) é considerado resíduo químico, e deverá ser colocado em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) O material fibroso da amostra, que fica retido no cadinho, pode ser descartado como lixo comum.

c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de atividade da enzima alfa-amilase

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico
Código SIG: PM.057.011 - Rev (00)*

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinar a atividade da enzima alfa-amilase, que servirá como parâmetro para definir a concentração da solução que será utilizada na análise de FDN em amostras com alto teor de amido.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de fibra em detergente neutro (FDN) em amostras vegetais com alto teor de amido no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

D. R. MERTENS; M. ALLEN; J. CARMANY; J. CLEGG; A. DAVIDOWICZ; M. DROUCHES; K. FRANK; D. GAMBIN; M. GARKIE; B. GILDE-

MEISTER; D. JEFFRESS; C-S. JEON; D. JONES; D. KAPLAN; G-N. KIM; S. KOBATA; D. MAIN; X. MOUA; B. PAUL; J. ROBERTSON; D. TAY-SOM; N. THIEX; J. WILLIAMS; M. WOLF. **Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study.** Journal of AOAC International, vol. 85, n. 6, 2002, p. 1217- 1240.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte;

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte;

P.M.057.003 – Determinação da fibra em detergente neutro (FDN).

Formulários aplicáveis

FO.057.010 – Teste de atividade da enzima alfa-amilase.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

FDN	Fibra em detergente neutro
-----	----------------------------

%FDN: Porcentagem da fibra em detergente neutro, que corresponde ao teor de componentes das paredes celulares da amostra, insolúveis na solução de detergente usada na análise.

Procedimento

Sumário do método

Em tubos de digestão de fibras é feita a digestão, em ebulição e sob refluxo, de amostras de amido de milho ou farinha de arroz (como fontes de amido) em solução de FDN, na presença de diferentes quantidades de solução teste de alfa-amilase. Após a fervura, é adicionada uma solução à base de iodo e iodeto de potássio em todos os tubos, sendo que onde ainda há a presença de amido o conteúdo fica roxo ou âmbar, indicando que a quantidade de enzima não foi suficiente para degradar todo o amido presente. O menor volume adicionado de enzima em que o tubo fica amarelo, indicando a degradação do amido presente, é usado como parâmetro para o cálculo da concentração da solução de alfa-amilase a ser preparada para a análise de FDN de amostras com alto teor de amido.

Condutas de segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) O manuseio dos materiais e amostras nos blocos digestores deve ser realizado com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.

Informações da amostra

O amido de milho ou farinha de arroz a ser usado deve ser finamente moído, que passe em peneira de 1 mm, e não pode ser pré-cozido ou instantâneo.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);

b) Bloco digestor para análise de fibra, com controlador de temperatura e condensadores.

Materiais

- a) Espátula;
- b) Pipeta automática de 500 μ L;
- c) Cronômetro;
- d) Cubas plásticas para banhos de gelo e água.

Vidrarias

- a) Pipetas de 1, 2, 3, 4, 6 e 8 mL;
- b) Béquer pequeno;
- c) Balão de 50 mL;
- d) Balão de 100 mL;
- e) Proveta de 50 mL;
- f) Tubos para análises de fibras.

Soluções, reagentes e padrões

- a) Farinha de arroz ou amido de milho, finamente moídos;
- b) Iodo metálico P.A.;
- c) Iodeto de potássio P.A.;
- d) Enzima alfa-amilase termoestável em pó ou líquido, concentrada;
- e) Solução de detergente neutro;
- f) Solução teste de alfa-amilase a 5% m/v ou v/v;
- g) Solução de Burke;
- h) Gelo.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Pesar 0,5 g de farinha de arroz ou amido de milho com precisão de 0,0001 g e transferir para tubos de digestão de fibra. Preparar sete tubos desta forma.
- b) Adicionar 50 mL de solução de FDN a cada tubo e colocar no bloco digestor pré-aquecido em intervalos de um minuto, de forma que a fervura se inicie em 4 a 5 minutos.
- c) Após o início da fervura, adicionar a primeira dose da solução teste de alfa-amilase a 5% (0, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 mL) em cada tubo respectivamente e refluxar por 10 minutos.
- d) Em intervalos de um minuto remover os tubos, adicionar a segunda dose da solução teste de alfa-amilase a 5% (os mesmos volumes utilizados na primeira dose), agitar e deixar na bancada por 60 segundos, sucessivamente.
- e) Colocar os tubos em banho de gelo, com exceção da prova em branco (sem adição de enzima), por 5 minutos. O banho deve ter gelo suficiente para manter a temperatura abaixo de 1 °C.
- f) Retirar os tubos do banho de gelo, e colocá-los em banho de água à temperatura de $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ até que todos os tubos atinjam esta temperatura, o que pode levar 5 minutos ou mais.
- g) Retirar os tubos do banho de água, e colocá-los em ordem crescente de adição de doses da enzima sobre um fundo branco.

h) Adicionar rapidamente 0,5 mL da solução de Burke, agitar, aguardar 90 segundos, sem olhar para os tubos. Depois de decorrido este tempo observar as colorações obtidas, que devem variar do roxo ao amarelo, fazendo uma rápida decisão (antes de completar 120 segundos) e registrar as anotações no FO.057.010 usando a seguinte escala:

- Roxo = enzima não adequada
- Âmbar = enzima não adequada
- Amarelo = enzima adequada

O menor volume de solução teste de alfa-amilase a 5% que indique a ausência de amido (cor amarela) após a reação com iodo, é usado para calcular a dose da solução para a análise de FDN.

h) Tempo e temperatura são críticos na definição da dose adequada de alfa-amilase. As soluções devem estar a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a definição das cores deve ser feita entre 90 e 120 segundos após a adição da solução de Burke. Como a cor âmbar perde a intensidade rapidamente, esperar mais de 120 segundos para fazer a definição das cores pode resultar em uma dosagem muito baixa.

i) Soluções concentradas de enzima não são recomendadas como solução de trabalho porque uma gota contém atividade significativa, o que pode afetar o resultado da análise. Enzima em excesso não é benéfico e pode ser prejudicial à determinação de FDN

j) Após o preparo, a solução de trabalho de alfa-amilase para uso na determinação de FDN deve ser guardada sob refrigeração e utilizada em até cinco dias.

Cálculos

Melhor que variar a quantidade de enzima a ser usada em cada fonte ou lote, é calcular a concentração da solução de uma enzima específica a ser adicionada na determinação de FDN, em duas adições de 2 mL. O

cálculo seguinte é para a diluição de uma solução estoque ou extração, para permitir a adição de duas doses de 2 mL da solução de trabalho da enzima na determinação da FDN.

$$E = X \text{ mL} \times (V1 \times C) / 2 \text{ mL}$$

Onde:

E: quantidade de enzima em pó (g) ou solução estoque (mL) necessária para fazer X mL de solução de trabalho de alfa-amilase.

V1: volume mínimo em mililitros, de cada adição da solução teste, que resultou na cor amarela na reação com o iodo (que indica a ausência de amido).

C: concentração da solução teste de alfa-amilase em g de enzima em pó/100 mL ou mL de solução estoque/100 mL (no caso C=0,05).

2 mL: volume a ser adicionado em duas doses na determinação de FDN (2 mL + 2 mL).

X mL: volume da solução de trabalho de alfa-amilase a ser preparada.

Controle de qualidade

a) O teste de atividade deve ser feito a cada novo lote de enzima recebido no laboratório.

b) A atividade da enzima concentrada deve ser testada periodicamente (a cada seis meses).

Gerenciamento de resíduos

a) Os resíduos gerados no procedimento, contendo a solução de detergente neutro com enzima, iodo e iodeto de potássio, são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados

ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de sílica

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico
Código SIG: PM.057.013 - Rev (00)*

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinar o teor de sílica em amostras vegetais, por reação das cinzas resultantes da análise de lignina via ácido sulfúrico com ácido bromídrico a 48%.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de sílica no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal**,

nutrição animal e alimentos: 2. métodos de análise. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 258-260.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** Viçosa, UFV, 1981. 166p.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

PM.057.004 – Determinação de fibra em detergente ácido (FDA).

PM.057.010 – Determinação de lignina via ácido sulfúrico e de celulose.

Formulários aplicáveis

FO.057.005 – Determinação de fibra em detergente ácido, lignina via ácido sulfúrico, celulose e sílica.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

MS	Matéria seca
FDA	Fibra em detergente ácido
HBr	Ácido bromídrico

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

%FDA: Porcentagem de fibra em detergente ácido, que é a parte das paredes celulares da amostra insolúvel na solução de detergente usada na análise.

HBr: Ácido bromídrico para a dissolução das cinzas, que neste procedimento é usado concentrado (48%).

Procedimento

Sumário do Método

Após a determinação sequencial da FDA, celulose e lignina via ácido sulfúrico da amostra obtém-se o resíduo mineral, que depois de tratamento com ácido bromídrico a 48% permanece apenas a sílica no cadinho. O teor de sílica é calculado por diferença de pesagem entre a massa do cadinho e a massa do cadinho com o resíduo do tratamento das cinzas com ácido bromídrico.

Condutas de Segurança

- a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.
- b) Sempre utilizar pinças de metal para colocar e retirar os cadinhos com amostras dos fornos mufla. Elas devem ter um comprimento suficiente para garantir o manuseio seguro dos materiais.

c) O manuseio dos materiais e amostras dentro dos fornos mufla deve ser realizado com cuidado e atenção, devido às altas temperaturas utilizadas nesses equipamentos.

d) A filtração das amostras deve ser feita sempre no interior da capela de exaustão.

Informações da amostra

A determinação é realizada utilizando-se a cinza residual, resultante da análise sequencial da FDA, celulose e lignina via ácido sulfúrico, feita em uma amostra vegetal de aproximadamente 1 g, pré-seca a 65°C e moída com peneira de 1 mm.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Forno mufla, com controlador de temperatura;
- c) Capela de exaustão;
- d) Bomba de vácuo, com sistema de filtração.

Materiais

- a) Bandeja de vidro retangular tipo Pyrex®;
- b) Pinceta plástica;
- c) Pipeta automática regulável de 1 a 5 mL.

Vidrarias

- a) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade);
- b) Cadinho filtrante de vidro borossilicato, com placa porosa de vidro sinterizado, com porosidade de média a grossa (100 a 160 μm);
- c) Béquer de 50 mL.

Soluções, reagentes e padrões

- a) Ácido bromídrico a 48% P.A.
- b) Acetona P.A.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Determinar sequencialmente a fibra em detergente ácido (FDA), celulose e lignina via ácido sulfúrico, conforme os procedimentos descritos nos PM.057.002, PM.057.004. PM.057.010, em uma amostra de aproximadamente 1 g, fazendo os registros dos pesos no FO.057.005.
- b) Após a pesagem do cadinho com a cinza residual, colocá-lo em bandeja de vidro e adicionar gotas de ácido bromídrico a 48%, suficientes para umedecer toda a cinza do cadinho (não mais que 4 mL).
- c) Deixar em repouso por 90 minutos e adicionar mais algumas gotas de ácido bromídrico a 48%, caso persista coloração vermelha no filtrado.

d) Após esse tempo, succionar o excesso de ácido com vácuo e lavar duas vezes com acetona (30 a 40 mL). Não usar água na lavagem.

e) Levar ao forno tipo mufla durante 30 minutos, à temperatura de 500°C.

f) Desligar o forno, esperar que a temperatura atinja aproximadamente 100°C, transferir para dessecador, deixar esfriar por uma hora e pesar (P6). Registrar o peso no FO.057.005.

Cálculos

$$\% \text{Sílica} = \frac{((P6 - P2) \times 100)}{P1}$$

Onde:

P1: peso da amostra (g);

P2: peso do cadinho vazio (g);

P6: peso do cadinho com a sílica (g).

Para o valor de %Sílica corrigido pela matéria seca (%Sílicac) basta dividir o resultado pela %MS e multiplicar por 100:

$$\% \text{Sílicac} = \frac{\% \text{Sílica} \times 100}{\% \text{MS}}$$

Controle de qualidade

Fazer uma repetição da análise a cada 10 amostras, alternando as repetições com amostras de teores maiores e menores de sílica, para verificar a reprodutibilidade da determinação.

Gerenciamento de resíduos

a) Os resíduos gerados na reação, após a filtração, contendo ácido bromídrico e acetona, são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de nitrogênio amoniacal em silagens

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico*

Código SIG: PM.057.006 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer procedimento para determinação do teor de nitrogênio amoniacal em silagens, após extração com solução de cloreto de potássio, seguida de destilação e titulação.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação do teor de nitrogênio amoniacal em silagens no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 1. coleta, acondicionamento e preparo de amostras**. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 43-66.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

Formulários aplicáveis

FO.057.007 - Determinação do teor de nitrogênio amoniacal em silagens.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes siglas e abreviaturas:

N-NH ₃	Nitrogênio na forma amoniacal
THAM	Tris(hidroximetil)aminometano

%N-NH₃: Porcentagem de nitrogênio presente na forma amoniacal na amostra de silagem verde (*“in natura”*).

Procedimento

Sumário do Método

O método está baseado na determinação de nitrogênio presente na forma amoniacal (NH₃) em amostras de silagem. A principal fonte de nitrogênio livre em silagens é proveniente da degradação de proteínas por proteólise. Alta concentração de amônia indica redução na qualidade da silagem.

A amostra de silagem fresca e picada é triturada em liquidificador com solução resfriada de cloreto de potássio a 15% e em seguida é feita filtração recolhendo-se o extrato líquido. Uma alíquota do extrato é destilada, após a adição de óxido de magnésio, e a amônia é recolhida e complexada em solução de ácido bórico com indicador, para titulação com solução ácida de concentração conhecida, determinando-se o teor de nitrogênio amoniacal da silagem.

Condutas de segurança

a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.

Informações da amostra

a) A amostra de silagem deve ser fresca e deve estar picada para a realização da análise.

b) Não havendo possibilidade de realização da análise logo após a coleta, deve-se congelar a amostra a -10°C e descongelar (em saco plástico fechado), em geladeira, um pouco antes da determinação.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);

b) Liquidificador industrial;

c) Geladeira;

d) Freezer;

- e) Pipeta automática de 10 mL;
- f) Microdestilador por arraste de vapor (tipo Kjeldahl);
- g) Titulador automático.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável;
- b) Papel de filtro.

Vidrarias

- a) Tubo de ensaio com borda reforçada (25 x 250 mm), acessório do destilador;
- b) Béquer de 250 mL;
- c) Proveta de 250 mL;
- d) Erlenmeyer de 125 mL;
- e) Funil de vidro;
- f) Frasco de vidro com tampa para coletar o filtrado.

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e reagentes

- a) Verde de bromocresol a 0,1% (m/v);
- b) Vermelho de metila a 0,1% (m/v);

- c) Solução de cloreto de potássio a 15% (m/v);
- d) Solução de ácido bórico a 4% (m/v);
- e) Solução receptora-indicadora de ácido bórico a 4%;
- f) Solução de THAM [tris(hidroximetil)aminometano] 0,1 N;
- g) Solução de THAM [tris(hidroximetil)aminometano] 0,01 N;
- h) Ácido clorídrico 0,1 mol/L⁻¹ padronizado;
- i) Ácido clorídrico 0,01 mol/L⁻¹ padronizado;
- j) Óxido de magnésio P.A.

Padrões

Não se aplica.

Condições ambientais

Não se aplica.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Pesar, em béquer, 50 g de amostra de silagem fresca e picada. Anotar o peso (P) no FO.057.007.
- b) Transferir para liquidificador, adicionando, com auxílio de proveta, 200 mL de solução de cloreto de potássio a 15%, previamente resfriado por 20 minutos em congelador.

c) Triturar a amostra no liquidificador, durante 10 a 15 minutos.

d) Filtrar em papel de filtro com funil de vidro, recolhendo o filtrado em frasco de vidro com tampa.

e) No tubo de vidro, acessório do destilador, adicionar 10 mL do filtrado (V_1).

f) Realizar a prova em branco, adicionando a outro tubo, 10 mL de solução de cloreto de potássio a 15%, e proceder conforme descrito a seguir, como se fosse uma amostra.

g) Acrescentar 250 mg de óxido de magnésio P.A. ao tubo de vidro do destilador.

h) Conectar o tubo de vidro ao destilador de nitrogênio e proceder a destilação da amostra, recolhendo o destilado em erlenmeyer de 125 mL, contendo 10 mL da solução receptora-indicadora de ácido bórico. Ao iniciar a destilação, a solução receptora-indicadora deverá passar de coloração avermelhada para esverdeada.

i) Deixar destilando até que o volume do erlenmeyer atinja 50 mL no mínimo.

j) Usando um titulador automático, titular o destilado com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ ou 0,01 mol L⁻¹, até que se perceba a mudança de cor do destilado, passando de tonalidade esverdeada para cinza-avermelhada. Anotar o volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (V_A) e o volume gasto na titulação da prova em branco (V_B). Os volumes das titulações da amostra e da prova em branco devem ser registrados no FO.057.007.

k) A concentração da solução de ácido clorídrico pode variar em função da concentração de nitrogênio amoniacal da amostra. Para concentrações mais elevadas, sugere-se a solução 0,1 mol L⁻¹, e para as mais baixas é melhor usar a solução 0,01 mol L⁻¹. Anotar o valor da molaridade do ácido utilizado (C) no FO.057.007.

Cálculos

Para se obter o valor da %N-NH₃, proceder aos cálculos indicados abaixo:

$$\text{Cálculo: \%N-NH}_3 = \frac{(V_A - V_B) \times C \times 280,134}{P \times V_1}$$

Onde:

V₁: volume do filtrado empregado na análise (mL);

V_A: volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL);

V_B: volume de ácido clorídrico gasto na titulação da prova em branco (mL);

P: quantidade de silagem empregada na análise (g);

C: concentração molar do ácido clorídrico utilizado nas titulações.

Controle de qualidade

a) Para cada lote deverá ser preparada uma prova em branco, pois seu volume é usado no cálculo da porcentagem de nitrogênio amoniacal da amostra.

b) A cada lote de amostras deverá ser feita uma repetição.

Gerenciamento de resíduos

a) Os resíduos das titulações, que contém ácido clorídrico, ácido bórico, álcool etílico, verde de bromocresol, vermelho de metila e cloreto de potássio são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas) para descarte. Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

- b) As sobras do filtrado devem ser diluídas e descartadas na pia.
- c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

- a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.
- b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.
- c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.
- d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de digestibilidade por produção de gás

***Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico***

Código SIG: PM.057.001 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer procedimento para a determinação de digestibilidade de amostras vegetais utilizando a técnica de produção de gases *in vitro*.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de digestibilidade por produção de gás no Laboratório de Nutrição Animal.

Documentos de referência

Referências complementares

THIAGO, L. R. L. de S.; BARROCAS, G. E. G. Técnica de produção de gás: adaptações ao método proposto pelo IGER, UK. Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 1998. Documentos, 73.

SCHOFIELD, P., PITT, R.E., PELL, A.N. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. J. Anim Sci., 72(11):2980-2991.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

Formulários aplicáveis

FO.057.001 – Registro das pesagens e valores calculados para a determinação da digestibilidade por produção de gás

FO.057.002 – Registro de dados do procedimento de determinação de digestibilidade por produção de gás obtidos durante a etapa de fermentação.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

Digestibilidade: proporção de nutriente consumido que está disponível para a absorção e utilização pelo organismo do animal.

Incubação: manutenção de um alimento em ambiente digestivo real ou simulado, por determinado período de tempo.

Inóculo: líquido ruminal utilizado para incubação de alimentos em ambiente digestivo simulado.

Fermentação: processo de degradação de alimentos por microrganismos.

Líquido ruminal: líquido retirado do rúmen para ser utilizado como inóculo na incubação inerente ao processo em tela.

Substrato: qualquer matéria incubada em um processo digestivo. No caso da técnica em tela, representada por alimentos para alimentação animal.

MS	Matéria seca
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
TNT	Tecido não tecido

Procedimento

Sumário do método

A técnica da produção de gases é uma das metodologias utilizadas para avaliar a qualidade de ingredientes, dietas e aditivos. Esta técnica mensura a produção de gases a partir da fermentação de uma amostra em líquido ruminal tamponado acondicionado em frasco de vidro. Conforme a fermentação avança, o gás acumulado no espaço superior dos frascos é mensurado através de um transdutor de pressão conectado a uma válvula de três vias e a um amperímetro digital. Uma seringa, também acoplada a esta válvula, é utilizada para registrar e liberar o volume correspondente aos gases. As curvas de produção de gás são estabelecidas, repetindo-se as medições de pressão e volume dos gases, a intervalos regulares, durante o tempo total de incubação.

Condutas de segurança

a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas nitrílicas descartáveis.

b) Máscara para vapores ácidos: Este equipamento deve ser utilizado no momento de preenchimento dos frascos com as soluções dentro da capela e após a eliminação do gás da seringa.

c) A capela de exaustão de gases deverá ser utilizada na etapa de preenchimento dos frascos com as soluções e na eliminação do gás das seringas após a medição do seu volume.

Informações da amostra

As amostras incubadas devem ser secas, moídas em peneira de 1 mm, acondicionadas em sacos plásticos mantidos em ambiente seco.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);

b) Agitador magnético;

c) Capela de exaustão;

d) Banho-maria com temperatura controlada para operação contínua a 39°C;

e) Transdutor de pressão e amperímetro digital.

Materiais

- a) Válvula de três vias capaz de adaptar agulhas hipodérmicas 18 G;
- b) Lacs de alumínio para garrafas de fermentação com DE de 20 mm, topo aberto e sem revestimento;
- c) Tampas de butileno para garrafas de fermentação com boca de 13 mm x 20 mm;
- d) Seladores manuais para fixar lacs de alumínio em garrafas de fermentação de 20 mm de boca;
- e) Seringas descartáveis de 3 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL e 50 mL;
- f) Pipetas automáticas de 100 a 1.000 μ L e de 1 a 5 mL;
- g) Agulhas hipodérmicas 18G e 23G de 1,5 polegadas;
- h) Bolsas de filtro de tecido não tecido (TNT).

Vidrarias

- a) Garrafas de fermentação, 125 mL, boca (DI X DE) 13 mm x 20 mm;
- b) Provetas graduadas de 50, 100, 250 e 500 mL;
- c) Balões volumétricos de 100 mL e 1L;
- d) Béqueres de 250 mL e 500 mL;
- e) Frasco dosador/dispensador de líquidos;
- f) Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade).

Soluções, reagentes e padrões

Soluções e reagentes

a) Solução: Meio de digestão

Componentes:

Peptona (de digestão ácida de caseína)

Solução micromineral

Solução tampão

Solução macromineral

Solução resazurina

b) Solução micromineral:

Reagentes:

Cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Cloreto de manganês diidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Cloreto de cobalto hexaidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Cloreto férrico (FeCl_3)

c) Solução tampão

Reagentes:

Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3)

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)

d) Solução macromineral

Reagentes:

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)

Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

e) Solução de resazurina

Reagentes:

Resazurina (indicador redox)

f) Solução - Agente redutor

Reagentes - Solução 1:

Cisteína clorohidrato

Hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M

Reagentes - Solução 2:

Sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)

g) Cilindro de dióxido de carbono (CO_2) comercial

Padrões

Não se aplica.

Condições ambientais

Não há condições ambientais específicas para a realização do método.

Procedimentos de ensaio

O procedimento deverá ser executado em diferentes etapas, conforme descrito nos subitens a seguir:

Dia 1

a) Identificar numericamente as bolsas de filtro de tecido não tecido (TNT) com as duas repetições para cada amostra, conforme pode ser observado na Figura 1.



Figura 1. Identificação numérica das bolsas de filtro de TNT.

b) Lavar as bolsas com água e detergente neutro.

c) Acondicionar as mesmas em uma estufa de ventilação forçada a 55°C.

d) Pesar as bolsas vazias (P_1) e registrar os valores no FO.057.001.

e) Pesar duas repetições de 0,5 g de amostra do substrato (forrageira) diretamente em cada bolsa (P_2). Registrar os valores obtidos no FO.057.001.

f) Selar as bolsas e transferir para garrafas de fermentação identificadas, reservando três garrafas com bolsas de filtro, sem amostras, para provas em branco.

g) Fechar as garrafas com as tampas de butileno, sem o lacre. Na Figura 2, podem ser observadas as garrafas, contendo as bolsas, devidamente identificadas e fechadas.



Figura 2. Garrafas de vidro identificadas contendo em seu interior as bolsas de filtro de TNT previamente numeradas.

Dia 2

a) No período da tarde, um dia antes do dia da inoculação, adicionar em cada garrafa 85 mL do meio de digestão, gaseificar com CO_2 (Figuras 3A e 3B, respectivamente) e fechar imediatamente com o septo, sem utilizar o lacre de alumínio.

b) Na capela de exaustão de gases, adicionar rapidamente 5 mL do agente redutor e, novamente, gaseificar com CO_2 , tampando e, em seguida, selando com o lacre de alumínio. O lacre de alumínio deve ser fixado através do uso de um selador manual.

c) A solução de agente redutor deve ser feita momentos antes de seu uso, pela mistura em recipiente separado de volumes iguais das soluções 1 e 2.

d) Verificar a alteração de cor da solução de azul para rosa. Logo em seguida, a solução deverá começar a perder a coloração, lentamente, estando completa a redução quando a solução ficar quase incolor. Na Figura 3C são mostradas as alterações da cor da solução.

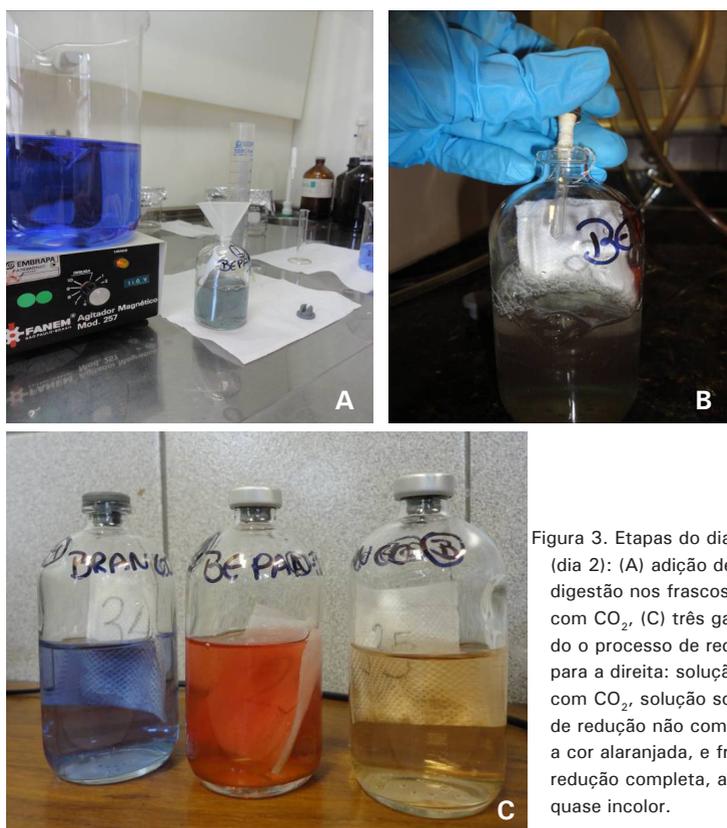


Figura 3. Etapas do dia anterior à coleta (dia 2): (A) adição de 85 ml do meio de digestão nos frascos, (B) gaseificação com CO_2 , (C) três garrafas apresentando o processo de redução, da esquerda para a direita: solução recém-inoculada com CO_2 , solução sofrendo o processo de redução não completa, apresentando a cor alaranjada, e frasco apresentando redução completa, apresentando-se quase incolor.

e) Armazenar as garrafas em geladeira a 4°C durante a noite, conforme mostrado na Figura 4A.

Dia 3

a) Retirar as garrafas da geladeira e colocá-las em banho-maria pré-aquecido a 39°C, três horas antes do início da inoculação, conforme mostrado na Figura 4B.

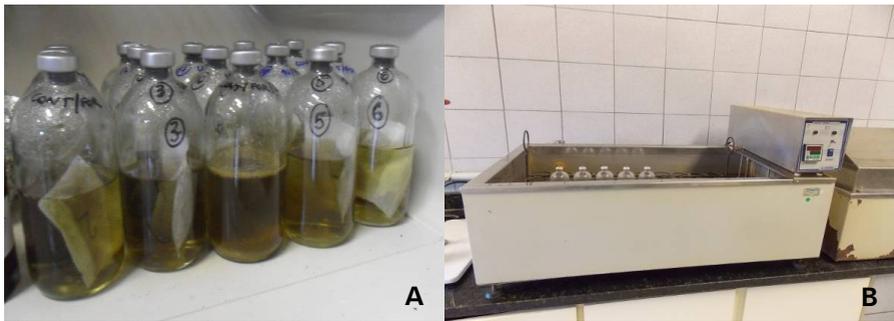


Figura 4. (A) Garrafas armazenadas em geladeira a 4°C durante a noite e (B) garrafas em banho-maria (39°C) durante três horas antes da inoculação para favorecer estabilizar a temperatura.

b) Poucos minutos antes do tempo inicial de incubação, inocular cada garrafa com 5 mL de líquido ruminal, em ordem sequencial, usando uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha 16G x 1,5 polegada. O líquido ruminal deve ser mantido a 39°C durante todo o tempo, inclusive na hora da inoculação.

c) No exato tempo inicial de inoculação, também em ordem sequencial, zerar a pressão em todas as garrafas. Esta etapa deve ser realizada perfurando o septo com a agulha conectada à válvula de três vias e ao sistema de medição de pressão. É importante que esta válvula esteja posicionada de tal forma que permita a remoção do gás de dentro do frasco para o ambiente externo.

d) Após, remover a agulha do septo e colocar, novamente, a garrafa em banho-maria a 39°C.

e) A partir desta etapa, inicia-se o processo de fermentação, seguindo-se os horários das medições de pressão e dos volumes de gás previamente programados. Estas medições deverão ser realizadas conforme descrito no item 6.7.4.

Medições da pressão e do volume de gás durante a fermentação

a) Conectar a válvula de três vias ao transdutor de pressão e amperímetro digital e fixar na saída debaixo desta válvula, uma agulha 23G x 1,5 polegada, conforme mostrado na Figura 5A.

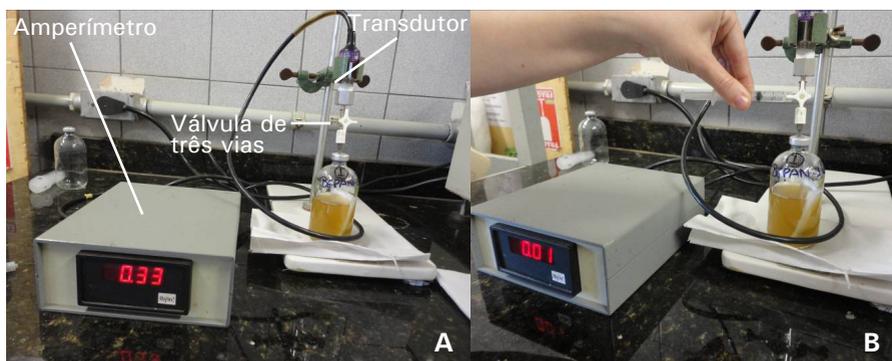


Figura 5. Etapa de medição da pressão: (A) leitura de pressão por meio do transdutor e amperímetro digital e (B) retirada do gás através da fixação de seringa plástica na saída lateral da válvula de três vias.

b) Iniciar a medição da pressão na mesma sequência utilizada para inoculação, assegurando-se que a torneira da válvula de três vias esteja posicionada no sentido garrafa-transdutor de pressão, conforme demonstrado na Figura 5A.

- c) Inserir a agulha através da tampa de butileno no espaço vazio da garrafa e registrar no FO.057.002 a medição obtida no amperímetro digital. A pressão registrada deverá corresponder ao maior valor primeiramente mostrado no visor.
- d) Dentro do menor tempo possível, fixar uma seringa plástica (o volume da seringa depende do valor da pressão obtida) na saída lateral da válvula de três vias, conforme mostrado na Figura 5B.
- e) Girar a torneira da válvula de três vias no sentido horário, alterando o fluxo de gás para garrafa-seringa, conforme demonstrado na Figura 5B.
- f) Lentamente, puxar o êmbolo da seringa de forma a retirar o gás acumulado na garrafa. Nesta etapa, a pressão informada pelo amperímetro digital deverá reduzir.
- g) Continuar puxando o êmbolo da seringa até que a pressão mesma alcance $0,00 (\pm 0,04)$.
- h) Retirar, em primeiro lugar, a agulha da garrafa e retorná-la ao banho-maria.
- i) Em seguida, retirar a seringa da válvula de três vias, registrar no FO.057.002 o volume de gás obtido, eliminando-o, logo após, em um ambiente ventilado, usando máscara para vapores orgânicos.
- j) Nunca esvaziar a seringa enquanto a mesma estiver fixada à válvula de três vias, visto que, este procedimento pode danificar a membrana do transdutor de pressão.
- k) Após o último tempo de mensuração do ensaio, retirar as bolsas de filtro de tecido não tecido (TNT) dos frascos, lavar com abundante água corrente e levar à estufa de ventilação forçada a 55°C .

l) Após a secagem e estabilização da temperatura em dessecador, pesar as bolsas (P3) e registrar os valores no FO.057.001.

Cálculos

a) Para cada frasco, que representa uma amostra, o volume de gás mensurado deve ser corrigido pela leitura do volume do frasco branco em cada tempo de incubação.

b) Os componentes cinéticos da produção de gás, descritos abaixo, devem ser estimados por regressões não lineares do tempo de incubação com o volume de gás acumulado calculado conforme descrito na alínea “b” do item 6.7.5., usando a equação logística de dois compartimentos propostos por Schofield et al. (1994):

$$V = \frac{A}{1 + \exp [2 + 4B(c - t)]} + \frac{D}{1 + \exp [2 + 4E(c - t)]}$$

Onde:

V: volume de gás, mL

t: tempo de incubação, h

A: volume de gás na fração de carboidratos de degradação rápida, mL

B: taxa específica da fração rápida, %/h

c: tempo de espera (“Lag time”), h

D: volume de gás na fração lenta, mL

E: taxa específica da fração lenta, %/h

c) Esse procedimento de regressão não linear pode ser realizado pelo programa SAS (SAS, 2012), conforme segue:

Programa do SAS:

Data gas;

Input tempo Y;

Cards;

1	3,45	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
3	10,55	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
6	20,16	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
8	24,97	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
12	34,58	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
24	63,83	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
30	84,31	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
48	119,20	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
54	140,51	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
72	160,36	(exemplo de volume de gás no referido tempo)
96	187,94	(exemplo de volume de gás no referido tempo)

Proc NLIN best = 10 Method = gauss;

Parms VcnF = 10 to 200 by 50
 kdcnf = 0.01 to 0.8 by 0.05
 L = 0.1 to 5 by 0.2
 VcF = 50 to 150 by 30
 kdcf = 0.01 to 0.8 by 0.05;
 bounds L >= 0;

Model Y = VcnF/(1 + exp(2-4*kdcnf*(tempo-L))) + VcF/(1 + exp(2-4*kdcf*(tempo-L)));

/*Modelo logístico bicompartimental*/

OutPut OUT = Saída p = yhat r = yresid student = respad;

Proc plot;

Plot Y*tempo;

Run;

Proc PRINT Data = Saída;

Title 'Alguns dados e resultados';

Run;

Proc PLOT Data = Saída;

Plot y*tempo = 'a' yhat*tempo = 'p' / overlay vpos = 25;

Plot respad*yhat / vref = 0 vpos = 25;

Title ' Análise de resíduo';

Run;

Proc CORR Data = Saída;

Var y;

With yhat;

Title ' Correlação Linear Simples';

Run;

Quit;

ods html close;

ods preferences;

d) Para cálculo da degradabilidade da matéria seca do substrato:

Calcular a quantidade de matéria seca (g) de substrato na amostra

original: Este valor deve ser obtido pelo cálculo da diferença entre os pesos (g) das bolsas contendo os substratos na matéria original (P_2) e das bolsas de filtro de TNT vazias (P_1), conforme descrito abaixo:

$$MS \text{ do substrato original, } g = (bolsa + substrato, g) - (bolsa vazia, g)$$

Calcular a quantidade de matéria seca (g) de substrato após a fer-

mentação pelo líquido ruminal: Após todas as medições de pressão e volume, calcular a quantidade (g) do substrato após a fermentação através da diferença entre os pesos das bolsas contendo o substrato após a fermentação (P_3) e o peso da bolsa vazia (P_1), conforme descrito abaixo:

$$MS \text{ dos substrato após fermentação, } g = (bolsa + substrato após fermentação, g) - (bolsa vazia, g)$$

Calcular a quantidade (g) de MS degradada do substrato: Após todas as medições de pressão e volume, calcular a quantidade (g) da MS degradada do substrato através da diferença entre a quantidade de MS do substrato original e a quantidade de MS do substrato após fermentação (obtidas na alínea “d” do item 6.7.5).

$$MS \text{ degradada do substrato, g} = (MS \text{ do substrato original, g}) - (MS \text{ do substrato após fermentação, g})$$

Calcular a degradabilidade da MS do substrato:

$$Degradabilidade \text{ da MS, \%} = \frac{MS \text{ degradada do substrato} \times 100}{MS \text{ do substrato original}}$$

e) Registrar no FO.057.001 os valores calculados no item 6.7.5.

Controle de qualidade

Medidas para o controle de qualidade do método:

- a) O procedimento deve ser realizado em duplicata para todas as amostras.
- b) Devem ser feitas provas em branco, as quais contêm 85 mL do meio de digestão, 5 mL do agente redutor, 5 mL de inóculo, uma bolsa de filtro vazia e não possuem amostras.

Gerenciamento de resíduos

- a) Os resíduos químicos deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas). Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

b) Agulhas e vidrarias quebradas utilizadas durante a execução deste procedimento devem ser descartadas em embalagens próprias para o acondicionamento de materiais perfurocortantes.

c) Para manuseio, identificação, acondicionamento e descarte dos resíduos químicos e biológicos deverão ser obedecidos os requisitos e procedimentos definidos no PGRS da Embrapa Gado de Corte.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores que evidenciarem quaisquer não conformidades na execução deste procedimento informar imediatamente ao coordenador do Laboratório de Nutrição.

d) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal.

e) Esse documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de extrato etéreo (EE)

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico*

Código SIG: PM.057.012 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer o procedimento para determinação da quantidade de gordura bruta (extrato etéreo) em amostras de produtos e subprodutos de origem animal, vegetal, rações e concentrados, desde que não submetidos ao processo de extrusão, por diferença de peso da amostra antes e depois da extração a quente usando como solvente o éter de petróleo.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de extrato etéreo no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H.

G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 1. coleta, acondicionamento e preparo de amostras. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 205-207.

SILVA, D.J. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, UFV, 1981. 166p.

Manual de operações do extrator de gordura marca Ankon, modelo XT 15, Revisão 2014, 27p.

Referências cruzadas

DQ.027.001 – Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 – Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PM.057.002 – Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

Formulários aplicáveis

FO.057.011 – Determinação de extrato etéreo (EE) em amostras com baixo teor de gordura.

FO.057.012 – Determinação de extrato etéreo (EE) em amostras com alto teor de gordura.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EE	Extrato etéreo
EPLNA	Ensaio de proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
MS	Matéria Seca

%EE: Porcentagem de extrato etéreo (gordura bruta) da amostra.

EPLNA: Programa de controle de qualidade interlaboratorial, que tem como objetivo a redução da variabilidade entre os resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições.

%MS: Porcentagem de matéria seca a 105°C da amostra, calculada a partir de uma sub-amostra, conforme descrito no PM.057.002.

Procedimento

Sumário do método

A amostra é pesada em uma bolsa de filtro com capacidade de filtração na faixa de 2 a 3 micrômetros, com porosidade para permitir a passagem rápida do solvente, seca em estufa e colocada no vaso de extração do equipamento, que é então fechado, determinado o tempo de extração (60 minutos), a temperatura de aquecimento (90°C), e então se inicia o processo. O aparelho irá encher, extrair, lavar, remover e destilar todo o solvente automaticamente, recuperando 97% do solvente utilizado. A amostra desengordurada é pesada e o valor do extrato etéreo é determinado pela diferença de peso antes e depois do processo de extração.

Condutas de segurança

a) Durante toda a execução do procedimento é obrigatório o uso de jaleco e luvas de procedimento descartáveis.

b) Tendo em vista que a análise é feita utilizando-se solvente orgânico inflamável e muito volátil, o equipamento deve estar instalado em local bem ventilado, livre de eletricidade estática e longe de qualquer fonte de calor ou faíscas.

c) Não tocar no recipiente de extração durante a operação pois a temperatura será superior a 70°C, podendo causar queimaduras.

d) Deve-se ter muito cuidado quando as amostras são removidas, devido à presença de vapores inflamáveis do solvente.

Informações da amostra

a) As amostras de origem vegetal devem ser pré-secas a 65°C e moídas com peneira de 1 mm.

b) Em outros tipos de amostras a análise pode ser feita no material como fornecido, a não ser que o solicitante da análise indique a necessidade de pré-processamento.

c) Em todos os tipos de amostras é feita uma secagem por 3 horas a 102°C ± 2°C, pois a umidade deve ser retirada da amostra antes do processo de extração da gordura.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);

b) Estufa sem circulação de ar regulada a 102°C ± 2°C;

c) Extrator de gordura ANKOM, modelo XT15;

d) Seladora com aquecimento para bolsas de filtro.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável;
- b) Bolsas de filtro específicas (ANKOM XT4);
- c) Suporte usado para adição de amostras no saco de filtro vazio;
- d) Caneta marcadora resistente a éter de petróleo (ANKON F08);
- e) Barquilha de alumínio (utilizada em amostras com mais de 20% de gordura).

Vidrarias

Dessecador de vidro, tampa com luva, placa de porcelana e silicagel azul (indicador de umidade).

Soluções, reagentes e padrões

Éter de petróleo P.A. (ponto de ebulição 35-65°C).

Condições ambientais

O local da análise deve ser bem ventilado devido à volatilidade e inflamabilidade do solvente utilizado.

Procedimentos de ensaio

Análise

- a) Colocar o número da amostra na bolsa de filtro, utilizando a caneta marcadora resistente ao solvente.
- b) Colocar a bolsa de filtro no suporte para pesagem previamente tarado, adicionar de 1,5 a 2 g de amostra, evitando deixar partículas

próximas à área de selagem da bolsa e anotar o peso, com precisão de 0,0001 g (P_1). O peso da amostra deve ser registrado no FO.057.011.

c) Selar a bolsa de filtro a cerca de 4 milímetros do seu limite superior, para encapsular a amostra. Manter o braço da seladora sobre a bolsa de filtro por dois a três segundos após a luz vermelha se apagar, para resfriar o selo. A vedação pode ser vista como uma tira sólida derretida ao longo da borda superior da bolsa de filtro. Caso a vedação não fique uniforme, repita a operação para selar a bolsa de filtro.

d) No caso de amostras de carne com mais de 15% de gordura ou de amostras vegetais com mais de 20% de gordura, colocar a bolsa de filtro com a amostra em barquilha de alumínio pré-pesada (P_4), com a finalidade de capturar gordura que pode migrar para fora da bolsa de filtro durante o aquecimento. O peso da barquilha de alumínio (P_4) deve ser registrado no FO.057.012.

d) Secar a bolsa de filtro com a amostra, em estufa a $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por três horas.

e) Retirar da estufa, deixar por vinte a trinta minutos, até atingir a temperatura ambiente, dentro de um dessecador e pesar (P_2). Registrar o peso no FO.057.011 (para amostras com baixo teor de gordura). Para as amostras com alto teor de gordura, P_2 se refere ao peso da bolsa de filtro na barquilha de alumínio, e deve ser registrado no FO.057.012.

f) Encaixar a bolsa de filtro com a amostra no suporte (em formato de mola) e inseri-lo no recipiente de Teflon do extrator. Podem ser colocadas até quinze bolsas de filtro com amostras no suporte.

g) Fechar o equipamento, selecionar o tempo de extração (60 minutos), a temperatura (90°C), e dar início ao processo.

h) Ao término da extração, secar a bolsa de filtro com a amostra por 15 a 30 minutos em estufa a $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

i) Retirar da estufa, deixar atingir a temperatura ambiente em dessecador por 20 a 30 minutos e pesar (P3). Registrar o peso no FO.057.011 (amostras com baixo teor de gordura) ou FO.057.012 (amostras com alto teor de gordura).

Cálculos

Para se obter o valor da %EE, proceder aos cálculos indicados abaixo, fazendo uso dos registros de P₁, P₂, P₃ e P₄:

a) Amostras de carne com menos de 15% de gordura e amostras vegetais com menos de 20% de gordura:

$$\%EE = \frac{(P_2 - P_3) \times 100}{P_1}$$

Onde:

P₁: peso da amostra (g);

P₂: peso pré-seco da amostra com a bolsa de filtro (g);

P₃: peso da amostra com a bolsa de filtro após a extração (g).

b) Amostras de carne com mais de 15% de gordura e amostras vegetais com mais de 20% de gordura:

$$\%EE = \frac{((P_2 - P_4) - P_3) \times 100}{P_1}$$

Onde:

P₁: peso da amostra (g);

P₂: peso pré-seco da amostra com a bolsa de filtro na barquilha de alumínio(g);

P₃: peso da amostra com a bolsa de filtro após a extração (g);

P₄: peso da barquilha de alumínio (g).

Para o valor de %EE corrigido pela matéria seca (%EE_c) basta dividir o resultado pela %MS e multiplicar por 100:

$$\%EE_c = \frac{\%EE \times 100}{\%MS}$$

Controle de qualidade

- a) Incluir, periodicamente, uma bolsa de filtro vazia como prova em branco, especialmente quando mudar de solvente, para se medir qualquer efeito sobre a bolsa de filtro.
- b) Analisar uma amostra padrão do EPLNA para cada grupo de 15 a 20 amostras.
- c) O resultado obtido para a amostra utilizada como controle deve ser comparado com o resultado fornecido pelo EPLNA.
- d) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

As amostras desengorduradas podem ser descartadas como lixo comum. Quanto ao solvente utilizado, ele é praticamente todo recuperado no equipamento e não sobram resíduos líquidos.

Responsabilidades

- a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores

que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de macroelementos

*Procedimento Operacional Padrão (POP) de
Método Analítico*

Código SIG: PM.057.008 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer o procedimento para quantificar as concentrações totais dos macroelementos cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio em amostras de origem vegetal, animal e mineral após digestão nítrico-perclórica.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de macroelementos no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal,

nutrição animal e alimentos: 2. Métodos de análise. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 143-169.

Referências cruzadas

DQ.027.00 - Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 - Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PE.057.006 - Operação do bloco digestor marca Marconi, modelo MA-4025.

PM.057.002 - Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

Formulários aplicáveis

FO.057.014 - Determinação de macroelementos.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
P	Fósforo
K	Potássio
Na	Sódio
ppm	Partes por milhão, que corresponde a miligramas por litro
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

Procedimento

Sumário do método

A amostra de origem vegetal, animal ou mineral, é tratada com uma mistura de ácidos nítrico e perclórico concentrados a alta temperatura, a matéria orgânica é oxidada, ficando os macroelementos presentes, solubilizados no extrato líquido. Os elementos são então determinados em equipamentos, após tratamento deste extrato com diluições e/ou reações com reagentes químicos. O cálcio e o magnésio são determinados em espectrofotômetro de absorção atômica, o fósforo em espectrofotômetro UV/Vis (colorímetro), o sódio e o potássio em fotômetro de chama.

Condutas de segurança

a) O manuseio das amostras e ácidos nos tubos de ensaio, e dos blocos digestores na capela de exaustão, deve ser feito com utilização de máscara facial com filtro específico para gases ácidos, avental de napa e luvas, sempre com a capela de exaustão ligada.

b) A capela de exaustão a ser utilizada para a digestão nítrico-perclórica deve ser apropriada para este fim, pois a utilização de capelas comuns pode causar explosões pela formação de percloratos orgânicos explosivos por fricção, pelo contato dos vapores ácidos com materiais orgânicos.

c) Sempre que for manusear tubos quentes no bloco digestor e para o aquecimento dos tubos em bico de Bunsen fazer uso de luvas de amianto.

Informações da amostra

As amostras de origem vegetal devem estar pré-secas e moídas com peneira de 1 mm, as de origem mineral, secas e trituradas e as de origem animal em partes pequenas ou finamente divididas.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;
- c) Bloco digestor com controlador de temperatura;
- d) Capela de exaustão de gases apropriada para digestão nítrico-perclórica, provida de lavador de gases;
- e) Agitador de tubos;
- f) Espectrofotômetro de absorção atômica;
- g) Espectrofotômetro UV/Vis;
- h) Fotômetro de chama.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável;
- b) Bico de Bunsen.

Vidrarias

- a) Frascos dosadores de líquidos;
- b) Tubos de ensaio com borda reforçada (25 x 250 mm), próprios do bloco digestor, graduados para 50 mL;
- c) Funis de vidro pequenos (diâmetro de boca = 30 mm);
- d) Diluidor automático;
- e) Frascos de vidro com tampa de rosca, capacidade 50 mL para armazenamento de extratos líquidos. Utilizar frascos plásticos no caso de se fazer determinação de sódio no extrato, para evitar contaminação.

Soluções, reagentes e padrões

- a) Ácido nítrico P.A.;
- b) Ácido perclórico P.A.;
- c) Ácido clorídrico P.A.;
- d) Mistura nítrico-perclórica 2:1 (v/v);
- e) Solução de lantânio a 10% (m/v);
- f) Solução de lantânio a 0,2% (m/v);
- g) Solução de molibdato de amônio a 5% (m/v);
- h) Solução de vanadato de amônio a 0,25% (m/v);
- i) Reagente molibdato-vanadato;
- j) Reagente molibdato-vanadato diluído;
- k) Padrões de leitura para cálcio, magnésio e potássio;
- l) Padrões de leitura para fósforo;
- m) Padrões de leitura para sódio.

Condições ambientais

Não se aplica

Procedimentos de ensaio

Preparo do extrato líquido

- a) Pesar em balança analítica, 0,2 g de amostra seca e moída, com precisão de 0,1 mg, anotar o valor no FO.057.014 e transferir para tubo de digestão graduado para 50 mL.
- b) Adicionar 4 mL de mistura nítrico-perclórica 2:1 (v/v).
- c) Deixar em repouso durante a noite, com a exaustão da capela ligada,

e no dia seguinte iniciar a digestão em bloco digestor, aumentando gradativamente a temperatura até 100°C e deixar por 45 minutos.

d) Retirar as amostras do bloco digestor e depois de resfriadas adicionar mais 2 mL da mistura nítrico-perclórica 2:1 (v/v), lavando as paredes dos tubos (girando-os na hora da adição).

e) Colocar na boca do tubo um funil de vidro pequeno para fazer a condensação dos vapores e diminuir a emissão de gases.

f) Colocar as amostras novamente no bloco digestor e aumentar a temperatura em intervalos de 15°C a cada 20 minutos, até 200°C e deixar nesta temperatura por aproximadamente, uma hora (ou mais se necessário), até que o extrato fique claro.

g) Retirar os tubos do bloco digestor, deixar esfriar, adicionar aproximadamente 10 mL de água deionizada e aquecer com cuidado, em bico de Bunsen dentro de uma capela, utilizando luva de amianto.

h) O aquecimento feito após adição de 10 mL de água deionizada nos extratos, tem a finalidade de solubilizar percloratos pouco solúveis formados durante a digestão. Caso não seja feito, a concentração obtida para alguns elementos pode ser menor, principalmente para o potássio.

i) Deixar esfriar, completar o volume para 50 mL com água deionizada, agitar para homogeneizar o extrato e transferir para frascos com tampa para armazenamento de extratos líquidos.

j) Preparar uma prova em branco (o mesmo procedimento, sem adicionar amostra), para verificação de possíveis contaminações e uma amostra-padrão do EPLNA com valores conhecidos a cada bloco de 40 provas para garantia dos resultados obtidos. Cada bloco conterá 38 amostras, uma prova em branco e uma amostra-padrão.

k) Transferir os extratos e a prova em branco imediatamente para frascos plásticos, quando houver interesse em se analisar sódio, tendo em vista a contaminação deste elemento causada por frascos de vidro.

Após a leitura, descontar o valor da prova em branco, devido ao contato com o vidro dos tubos de digestão.

l) Deixar em repouso durante a noite para que a sílica contida nas amostras, que não é solubilizada, precipite no fundo dos frascos, antes de se iniciar as determinações dos elementos.

Leitura dos elementos

a) Cálcio: diluir cinco vezes o extrato líquido com solução de lantânio a 0,2% (pipetar 1 mL do extrato e adicionar 4 mL de solução de lantânio a 0,2%), agitar e fazer a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica, zerando o aparelho com o branco dos padrões de leitura. No caso de se obter leitura de amostra maior que a leitura do padrão mais concentrado, fazer outra diluição com solução de lantânio a 0,2% ou fazer nova diluição de dez vezes a partir do extrato (pipetar 1 mL do extrato e 9 mL de solução de lantânio a 0,2%).

b) Magnésio: a partir da primeira diluição do cálcio, fazer uma diluição de dez vezes com solução de lantânio a 0,2% (pipetar 1 mL do extrato diluído cinco vezes e adicionar 9 mL de solução de lantânio a 0,2%), agitar e fazer a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica, zerando o aparelho com o branco dos padrões de leitura. Qualquer diluição adicional ou intermediária deve ser feita com solução de lantânio a 0,2%.

c) Potássio: diluir dez vezes o extrato líquido com solução de lantânio a 0,2% (pipetar 1 mL do extrato e adicionar 9 mL de solução de lantânio a 0,2%), agitar e fazer a leitura em fotômetro de chama, zerando o aparelho com o branco dos padrões de leitura. No caso de se obter uma leitura muito baixa, pode se utilizar a primeira diluição do cálcio (cinco vezes com solução de lantânio a 0,2%).

d) Sódio: fazer a leitura em fotômetro de chama diretamente do extrato líquido, ou se necessário fazer diluições com água deionizada zerando o aparelho com o branco dos padrões de leitura.

e) Fósforo: pipetar 5 mL de extrato líquido e adicionar 5 mL do reagente molibdato-vanadato diluído, agitar, aguardar 10 minutos e fazer a leitura da transmitância em espectrofotômetro UV/Vis, no comprimento de onda de 420 nm. Estes volumes podem ser alterados (por exemplo: 3 mL + 3 mL), desde que se utilize o mesmo volume para o extrato e para o reagente. Preparar a prova em branco e os padrões de leitura da mesma forma que as amostras, acertando a transmitância em 100% com o branco dos padrões de leitura. Se alguma amostra estiver muito concentrada, diluir o extrato líquido cinco vezes com água deionizada (pipetar 1 mL do extrato e adicionar 4 mL de água deionizada), adicionar 5 mL do reagente molibdato-vanadato diluído, agitar, aguardar 10 minutos e fazer nova leitura.

Cálculos

Fazer a curva padrão do elemento para determinar a sua concentração em ppm no extrato onde foi feita a leitura (diluído ou não), e aplicar a seguinte fórmula:

$$\% \text{ do elemento na amostra seca} = \frac{C \times V \times D}{P \times (\% \text{ M.S.}/100) \times 10000}$$

Onde:

C = Concentração do elemento, em ppm, no extrato onde foi feita a leitura, obtida através da curva padrão.

V = Volume final do extrato (no caso, 50 mL).

D = Diluição total feita a partir do extrato (no caso de leituras diretas sem diluição, considera-se D = 1).

P = Peso da amostra (em gramas).

% M.S. = Porcentagem de matéria seca determinada a 105°C na sub-amostra. No caso de não se fazer a determinação de matéria seca da amostra, deve-se colocá-la em estufa a 65°C durante a noite antes de fazer a pesagem. Neste caso considerar o valor da % M.S. = 100 para efeito de cálculos.

10000 = Fator para conversão dos valores de ppm para porcentagem. Para resultados em ppm, como no caso de sódio em amostras de algumas plantas, não utilizar este fator.

Controle de qualidade

- a) Para a verificação de possíveis contaminações na prova em branco, fazer a leitura de cálcio e magnésio no extrato líquido diluído cinco vezes com solução de lantânio a 0,2%, de sódio e potássio diretamente do extrato líquido, e de fósforo da mesma forma que as amostras.
- b) Tanto nas diluições como nas leituras diretas do extrato líquido, deve-se ter o cuidado para, durante o seu manuseio, não suspender a sílica que fica depositada no fundo dos frascos. Caso contrário pode-se ter interferências nas leituras ou entupimentos no fotômetro de chama e no espectrofotômetro de absorção atômica.
- c) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

- a) Os extratos líquidos da digestão, que contém ácidos nítrico e perclórico, e os resíduos das leituras dos elementos, que contém coreto de lantânio, molibdato de amônio e vanadato de amônio, são considerados resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas) para descarte. Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

Responsabilidades

- a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.
- b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.
- c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.
- d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Determinação de microelementos

Procedimento Operacional Padrão (POP) de

Método Analítico

Código SIG: PM.057.009 - Rev (00)

Objetivo

Estabelecer o procedimento para quantificar as concentrações totais dos microelementos ferro, manganês, zinco e cobre em amostras de origem vegetal, animal e mineral após digestão nítrico-perclórica.

Campo de aplicação

Aplica-se aos empregados e colaboradores que executam a atividade de determinação de microelementos no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte.

Documentos de referência

Referências complementares

FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, A. de A.; FERNANDES, F. D.; CRUZ, G. M. da; SOUZA, G. B. de; BARROCAS, G. E. G.; BARBOSA FILHO, H. G.; CASTRO, I. M. de; CHAVES, M. B.; MARTINI, M. Tecidos e produtos animais. In: Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos: 2. Métodos de análise. São Carlos, SP: EMBRAPA-CPPSE, 1998. p. 143-146/173-174.

Referências cruzadas

DQ.027.00 - Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS) da Embrapa Gado de Corte.

DQ.002.001 - Manual de boas práticas e segurança em laboratórios da Embrapa Gado de Corte.

PE.057.006 - Operação do bloco digestor marca Marconi, modelo MA-4025.

PM.057.002 - Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO).

Formulários aplicáveis

FO.057.015 - Determinação de microelementos.

Definições, siglas e abreviaturas

Para efeito do referido documento, são adotadas as seguintes definições, siglas e abreviaturas:

EPLNA	Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
Fe	Ferro
Mn	Manganês
Zn	Zinco
Cu	Cobre
ppm	Partes por milhão, que corresponde a miligramas por litro

Procedimento

Sumário do método

A amostra de origem vegetal, animal ou mineral, é tratada com uma mistura de ácidos nítrico e perclórico concentrados a alta temperatura, a matéria orgânica é oxidada, ficando os microelementos presentes, solubilizados no extrato líquido. Os elementos são então determinados em espectrofotômetro de absorção atômica, após diluições deste extrato quando se fizer necessário.

Conduas de segurança

a) O manuseio das amostras e ácidos nos tubos de ensaio, e dos blocos digestores na capela de exaustão, deve ser feito com utilização de máscara facial com filtro específico para gases ácidos, avental de napa e luvas, sempre com a capela de exaustão ligada.

b) A capela de exaustão a ser utilizada para a digestão nítrico-perclórica deve ser apropriada para este fim, pois a utilização de capelas comuns pode causar explosões pela formação de percloratos orgânicos explosivos por fricção, pelo contato dos vapores ácidos com materiais orgânicos.

c) Sempre que for manusear tubos quentes no bloco digestor e para o aquecimento dos tubos em bico de Bunsen fazer uso de luvas de amianto.

Informações da amostra

As amostras de origem vegetal devem estar pré-secas e moídas com peneira de 1 mm, as de origem mineral, secas e trituradas e as de origem animal em partes pequenas ou finamente divididas.

Equipamentos, materiais e vidrarias

Equipamentos

- a) Balança analítica (precisão de 0,0001 g);
- b) Balança de precisão;
- c) Bloco digestor com controlador de temperatura;
- d) Capela de exaustão de gases apropriada para digestão nítrico-perclórica, provida de lavador de gases;
- e) Agitador de tubos;
- f) Espectrofotômetro de absorção atômica.

Materiais

- a) Espátula de aço inoxidável;
- b) Bico de Bunsen.

Vidrarias

- a) Frascos dosadores de líquidos;
- b) Tubos de ensaio com borda reforçada (25 x 250 mm), próprios do bloco digestor, graduados para 25 mL;
- c) Funis de vidro pequenos (diâmetro de boca = 30 mm);
- d) Diluidor automático;
- e) Frascos de vidro com tampa de rosca, capacidade 50 mL para armazenamento de extratos líquidos.

Soluções, reagentes e padrões

- a) Ácido nítrico P.A.;
- b) Ácido perclórico P.A.;

- c) Mistura nítrico-perclórica 2:1 (v/v);
- d) Padrões mistos para leituras de ferro, manganês, zinco e cobre.

Condições ambientais

Não se aplica

Procedimentos de ensaio

Preparo do extrato líquido

- a) Pesar em balança analítica, 1,0 g de amostra seca e moída, com precisão de 0,1 mg, anotar o valor no FO.057.015 e transferir para tubo de digestão graduado para 25 mL.
- b) Adicionar 4 mL de mistura nítrico-perclórica 2:1 (v/v).
- c) Deixar em repouso durante a noite, com a exaustão da capela ligada, e no dia seguinte iniciar a digestão em bloco digestor, aumentando gradativamente a temperatura até 100°C e deixar por 45 minutos.
- d) Retirar as amostras do bloco digestor e depois de resfriadas adicionar mais 2 mL da mistura nítrico-perclórica 2:1 (v/v), lavando as paredes dos tubos (girando-os na hora da adição).
- e) Colocar na boca do tubo um funil de vidro pequeno para fazer a condensação dos vapores e diminuir a emissão de gases.
- f) Colocar as amostras novamente no bloco digestor e aumentar a temperatura em intervalos de 15°C a cada 20 minutos, até 200°C e deixar nesta temperatura por aproximadamente uma hora (ou mais se necessário), até que o extrato fique claro.
- g) Retirar os tubos do bloco digestor, deixar esfriar, adicionar aproximadamente 10 mL de água deionizada e aquecer com cuidado, em bico de Bunsen dentro de uma capela, utilizando luva de amianto.

- h) O aquecimento feito após adição de 10 mL de água deionizada nos extratos tem a finalidade de solubilizar percloratos pouco solúveis formados durante a digestão. Caso não seja feito, a concentração obtida para alguns elementos pode ser menor.
- i) Deixar esfriar, completar o volume para 25 mL com água deionizada, agitar para homogeneizar o extrato e transferir para frascos com tampa para armazenamento de extratos líquidos.
- j) Preparar uma prova em branco (o mesmo procedimento, sem adicionar amostra), para verificação de possíveis contaminações e uma amostra-padrão do EPLNA com valores conhecidos a cada bloco de 40 provas para garantia dos resultados obtidos. Cada bloco conterá 38 amostras, uma prova em branco e uma amostra-padrão.
- k) Deixar em repouso durante a noite para que a sílica contida nas amostras, que não é solubilizada, precipite no fundo dos frascos, antes de se iniciar as determinações dos elementos.

Leitura dos elementos

a) Fazer as leituras dos quatro microelementos em espectrofotômetro de absorção atômica diretamente do extrato líquido, zerando o aparelho com os brancos dos padrões de leitura. No caso de se obter leitura de amostra maior que a leitura do padrão mais concentrado, fazer diluições com água deionizada.

Cálculos

Fazer a curva padrão do elemento para determinar a sua concentração em ppm no extrato onde foi feita a leitura (diluído ou não), e aplicar a seguinte fórmula:

$$\text{ppm do elemento na amostra seca} = \frac{C \times V \times D}{P \times (\% \text{ M.S./100})}$$

Onde:

C = Concentração do elemento, em ppm, no extrato onde foi feita a leitura, obtida através da curva padrão.

V = Volume final do extrato (no caso, 25 mL).

D = Diluição total feita a partir do extrato (no caso de leituras diretas sem diluição, considera-se $D = 1$).

P = Peso da amostra (em gramas).

% M.S. = Porcentagem de matéria seca determinada a 105°C na sub-amostra. No caso de não se fazer a determinação de matéria seca da amostra, deve-se colocá-la em estufa a 65°C durante a noite antes de fazer a pesagem. Neste caso considerar o valor da % M.S. = 100 para efeito de cálculos.

Controle de qualidade

a) Para a verificação de possíveis contaminações na prova em branco, fazer a leitura dos elementos químicos diretamente do extrato líquido.

b) Tanto nas diluições como nas leituras diretas do extrato líquido, deve-se ter o cuidado para, durante o seu manuseio, não suspender a sílica que fica depositada no fundo dos frascos. Caso contrário pode-se ter interferências nas leituras ou entupimentos no fotômetro de chama e no espectrofotômetro de absorção atômica.

c) A decisão sobre repetir ou não as análises é de responsabilidade do pesquisador solicitante, levando-se em consideração o desvio limite aceitável entre o resultado obtido para o controle e o resultado fornecido pelo EPLNA.

Gerenciamento de resíduos

a) Os extratos líquidos da digestão, e os resíduos das leituras dos elementos, que contém ácidos nítrico e perclórico, são considerados

resíduos químicos, e deverão ser colocados em frascos apropriados ou bombonas de 5 L (devidamente identificadas) para descarte. Posteriormente, os frascos ou bombonas deverão ser descartados na bombona azul com identificação para SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS DIVERSAS, para posterior coleta e destinação final por empresa especializada.

Responsabilidades

a) É de responsabilidade do coordenador do Laboratório de Nutrição Animal garantir o treinamento de todos os empregados e colaboradores que realizam esse procedimento, previamente à sua execução. Somente estarão autorizados a executar o procedimento pessoas devidamente treinados nesse PM.

b) É de responsabilidade de todos os empregados e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal que realizam esse procedimento, seguirem os requisitos definidos nesse PM.

c) A aprovação deste POP é de responsabilidade do coordenador do laboratório.

d) Este documento deverá ser analisado criticamente, a intervalos anuais, para verificação da necessidade de sua revisão.

Anexos

Não se aplica.

Embrapa

Gado de Corte

CGPE 13997



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

