

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

RENATA SOARES TAVARES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA FIBROSA POR
MEIO DE DIFERENTES SISTEMAS ANALÍTICOS E SUA COMPARAÇÃO AO
MÉTODO OFICIAL AOAC**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2016

RENATA SOARES TAVARES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA FIBROSA POR
MEIO DE DIFERENTES SISTEMAS ANALÍTICOS E SUA COMPARAÇÃO AO
MÉTODO OFICIAL AOAC**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, no curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, na Área de Concentração de Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Alberto Magno Fernandes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

127/2016

Silva, Renata Soares Tavares da

Avaliação da determinação da matéria orgânica fibrosa por meio de diferentes sistemas analíticos e sua comparação ao método oficial AOAC / Renata Soares Tavares da Silva. – Campos dos Goytacazes, 2016.

64 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Zootecnia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Alberto Magno Fernandes.

Coorientadores: Ricardo Augusto Mendonça Vieira e Leonardo Siqueira Glória.

Área de concentração: Nutrição e produção animal.

Bibliografia: f. 60-64.

1. ACURÁCIA 2. ANALISTAS 3. BLUP 4. FIBRA INSOLÚVEL 5. RUMINANTES I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Zootecnia II. Título

CDD

636.085

RENATA SOARES TAVARES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA FIBROSA POR
MEIO DE DIFERENTES SISTEMAS ANALÍTICOS E SUA COMPARAÇÃO AO
MÉTODO OFICIAL AOAC**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, no curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, na Área de Concentração de Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Aprovada em 28 de Abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues (Ph. D. Dairy Science - DZO - UFV)

D. Sc. Tadeu Silva de Oliveira (D. Sc. Zootecnia - LZO - UENF)

D. Sc. Leonardo Siqueira Glória (D. Sc. Genética e Melhoramento)
(COORIENTADOR)

Prof. Ricardo Augusto Mendonça Vieira (D. Sc. Zootecnia - LZO - UENF)
(COORIENTADOR)

Prof. Alberto Magno Fernandes (D. Sc. Zootecnia – LZO - UENF)
(ORIENTADOR)

Aos meus pais, *Adelino e Maria Teresa*, pelo grande amor,
Por todo ensinamento e sabedoria, exemplo e confiança
Que me guiaram ao longo destes anos.

À *Walter (in memoriam)* e à *Maria Aparecida*
Por todo carinho, exemplo e
Encorajamento para buscar mais e mais.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu amor imensurável e pelo seu cuidado todo especial, em todas as etapas da minha vida.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por proporcionar minha formação acadêmica ao longo destes anos.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo fomento ao projeto de pesquisa.

Ao meu orientador Alberto Magno Fernandes, por seus ensinamentos, orientação, conselhos, apoio e pela grande amizade, essenciais para continuidade de minha formação pessoal, acadêmica e profissional. Muito obrigada, professor!

Ao co-orientador Ricardo Augusto Mendonça Vieira por todos os ensinamentos durante todo este percurso, pelo incentivo e pelas importantes contribuições durante a execução desta Tese e pelas análises estatísticas.

Ao professor e membro da banca Marcelo R. Teixeira por suas valiosas sugestões para este trabalho.

Aos Doutores e membros da banca: Leonardo S. Glória e Tadeu Silva de Oliveira pela grande contribuição durante a execução deste trabalho. Obrigada D.Sc. Leonardo por sua atenção com minhas dúvidas.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa e ao professor Edenio Detmann por proporcionarem a utilização laboratório para execução das análises do sistema Ankom.

Ao professor Silvaldo Felipe da Silveira e ao técnico Vicente Mussi Dias, da Clínica Fitossanitária da UENF, por compartilhar o uso do aparelho Autoclave. Vicente, agradeço por toda cordialidade, disponibilidade e generosidade.

Ao técnico do Laboratório de Zootecnia Almir Carvalho Junior e à graduanda Thais Imbelloni pelo comprometimento, disponibilidade e responsabilidade na execução das análises. E ao Zootecnista Maicow Boechat por toda contribuição no início do experimento.

Às minhas queridas amigas: Inês, Juliana, Priscilla, Roberta, Rosana, Raquel, Júlia Felisardo, Julia Jardim, Erika Tavares e Liana. Vocês me encorajaram nesta jornada por meio

do apoio, dos exemplos, dos nossos incríveis momentos de risadas, dos nossos cafés, das conversas sérias... amo vocês. Agradeço também à amiga Karla Rodrigues, que fez este último ano muito mais divertido e leve. Obrigada por tudo! E também aos meus amigos Pedro, Bernardo, Tiago, Edinho, Marcelo Polese e João Gomes que sempre estiveram presentes!

Aos colegas da Pós-graduação Matheus, Raphael Gomes, Flávio (Maraca), Laila, Bebeth, Verônica, Nardele, Natália, Yara, Jonas, Marcelo Cabral e Wagner, pelo ótimo convívio, pela amizade, boas risadas e por toda contribuição durante a realização deste trabalho. E também aos alunos Rafael Freitas e Davi! Obrigada!

Aos professores do Laboratório de Zootecnia Humberto Couto, Rita Nobre Soares, Manuel Vasquez, Antônio Gesualdi e Dálcio, pela amizade, pelos ensinamentos e conselhos profissionais. E aos professores Carlos Augusto e Aloísio Fonseca pelo exemplo profissional e amizade.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação Jovana e Conceição por toda contribuição, amizade e excelente trabalho!

À Bia Mercadante por sempre estar disponível a nos ajudar e pelo seu bom dia bem-humorado! Ao técnico Cláudio Lombardi pela disponibilidade e amizade!

À Miria Ferreira e a sua família por acreditar nos meus sonhos e por me acolher com tanto carinho. Obrigada!

Aos meus pais, Adelino e Teresa, que sempre me encorajaram a buscar meus sonhos e acima de tudo, por tanto amor! Obrigada por sempre segurar minhas mãos...

Ao meu noivo Celso, pelo amor e apoio, pela cumplicidade e paz que me fortalecem e me tornam uma pessoa mais feliz. Agradeço também a minha sogra, D. Leonice, que sempre com um forte abraço me recebeu muito bem...

À minha querida irmã Raquel, pelas boas risadas e fortes abraços! E ao meu cunhado André pelos bons momentos em família.

Ao Sr. Walter (*in memoriam*), à D. Aparecida e à sua grande família pelo carinho, apoio, amizade e bons conselhos.

À toda minha família que sempre me apoiou e me mostrou o significado do amor, da amizade e da união!

Aos funcionários e vigilantes do CCTA, agradeço o carinho e amizade.

E a todos que não citei, mas que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Renata Soares Tavares da Silva, filha de Adelino Roberto Tavares da Silva e Maria Teresa Soares da Silva, nasceu em Petrópolis, no Rio de Janeiro, em 20 de fevereiro de 1985.

Em junho de 2003 ingressou na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no curso de Zootecnia, colando grau em dezembro de 2008. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/UENF/CNPq no período de 2004 a 2009, orientada pelo professor Carlos Augusto de Alencar Fontes, na área de Nutrição e Produção de Ruminantes.

Em março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Ciência Animal na UENF, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, sob a orientação do professor Carlos Augusto de Alencar Fontes, submetendo-se à defesa de dissertação em dezembro de 2011.

Em abril de 2012, iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob a orientação do professor Alberto Magno Fernandes, na área de concentração de Nutrição e Produção Animal, submetendo-se a defesa de Tese em 28 de abril de 2016.

RESUMO

SILVA, RENATA SOARES TAVARES, D. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2016. **Avaliação da determinação da matéria orgânica fibrosa por meio de diferentes sistemas analíticos e sua comparação ao método oficial AOAC.** Professor Orientador: Alberto Magno Fernandes. Coorientadores: Ricardo Augusto Mendonça Vieira e Leonardo Siqueira Glória.

Objetivou-se comparar os sistemas de extração de análise de matéria orgânica fibrosa, descritos como *Filter Bag System* e Micro-FDN com o método oficial recomendado pela AOAC em sistema de refluxo e cadinhos filtrantes (AOAC 2002.04). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5x20x3, em que cinco sistemas de extração: refluxo convencional e Fibertec® (oficiais), Ankom®, Sistema de Extração em Sacos (SES) e Micro-FDN (Autoclave) foram comparados, empregando-se 20 alimentos, operados por três analistas. Em todos os sistemas empregou-se solução de detergente neutro, α -amilase termoestável, Na₂SO₃ e correção para cinzas. As variáveis resposta foram transformadas por meio do procedimento BOX COX e analisadas com uso do PROC MIXED do SAS, com auxílio do método de estimação de máxima verossimilhança restrita. Médias e respectivos intervalos de confiança (95%) foram obtidos por meio do melhor preditor não viesado (BLUP). Para a comparação múltipla de médias foram obtidos intervalos de confiança (95% de significância), adotando-se o procedimento SIMULATE. Não houve efeito significativo para o componente de variância de analista (P=0,083). Contudo, foram constatados efeitos para as interações alimento*analista, método*analista e alimento*método*analista, o que permite inferir que as determinações analíticas de aFDNmo dos alimentos nos diferentes métodos de extração foram influenciadas diretamente pela execução do analista. Provavelmente alimentos que demandam maior manipulação, como aqueles com alto teor de amido, proteína ou gordura, possam ter contribuído para este resultado. Os aparelhos recomendados por métodos oficial, refluxo convencional e Fibertec, determinaram valores convergentes e idênticos de fibra. Os valores de fibra determinados em Ankom não diferiram do método oficial AOAC. O SES apresentou valores elevados de fibra para uma série de alimentos, à saber: milho, sorgo, farelo de soja, soja e composto lácteo. Estes alimentos apresentam baixa concentração de fibra e algum componente de difícil extração na análise, como amido, gordura ou proteína. A dificuldade em atingir o valor convergente do método oficial para este método possivelmente deve-se à ausência de contato entre reagentes e amostra provocada pela presença de bolhas de ar no interior dos sacos. O método de Micro-FDN superestimou a quantidade de fibra para o sorgo, o que poderia estar relacionada à baixa eficiência de extração do sistema devido à possível ausência de agitação das partículas. Os sistemas analíticos SES e Micro-FDN não apresentam sensibilidade nas análises de fibra de alimentos concentrados em comparação ao método AOAC 2002.04. Mas o uso destes métodos na análise de forragens e subprodutos concentrados não compromete a acurácia dos resultados analíticos. O sistema Ankom foi conveniente para todos os alimentos quando comparado ao Método Oficial AOAC 2002.04.

Palavras-chave: acurácia; analistas; BLUP; fibra insolúvel; ruminantes

ABSTRACT

SILVA, RENATA SOARES TAVARES, D. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; april 2016. **Evaluation of determination of fibrous organic matter by means of different analytical systems and their comparison with official AOAC method.** Advisor: Alberto Magno Fernandes. Committee members: Ricardo Augusto Mendonça Vieira and Leonardo Siqueira Gloria.

This research aimed to compare the extraction systems of analysis of fibrous organic matter described as Filter Bag System and Micro-NDF with the official method recommended by the AOAC in reflux system and filter crucibles (AOAC 2002.04). The experiment was carried in factorial 5x20x3, in which five extraction systems: conventional reflux and Fibertec® (official), Ankom®, bags in Extraction System (SES) and Micro-NDF (Autoclave) were compared. For this 20 food was used, operated by three analysts. For all systems we used neutral detergent solution, α -amylase, Na_2SO_3 and correction ashes. The response variables were transformed by BOX COX procedure and analyzed using the SAS PROC MIXED with the support of the estimation restricted maximum likelihood method. Averages and confidence intervals (95%) were obtained from best linear unbiased prediction (BLUP). For multiple comparisons of averages were obtained confidence intervals (95% significance), by SIMULATE procedure. Significant effect was not found for analyst variance component ($P = 0.083$). However, it was found significant effect for the interactions: food* analyst, method* analyst and food*method*analyst. Those results allow to infer that the analytical determinations of aFDN_{mo} of foods in different extraction methods were directly influenced by execution analyst. Probably foods that require more handling, such as those with high starch content, protein or fat, may have contributed to this result. The recommended equipments for official methods, conventional reflux and Fibertec, showed convergent values and identical values of fiber. The estimates of fiber determined by Ankom was similar to official AOAC method. The SES showed high levels of fiber for a number of foods, namely: corn, sorghum, soybean meal, soybean and lactic compound. These foods have a low concentration of fiber and some component of difficult extraction, such as starch, fat or protein. The difficulty in achieving convergent value of the official method of this method may be due to the absence of contact between reagents and sample caused by the presence of air bubbles inside the bags. The Micro-NDF method overestimated the amount of fiber for sorghum, this result could be related to low efficiency system of extraction due the possible absence of particle agitation. Analytical systems SES and Micro-NDF are insensitive in the food fiber analysis concentrated compared to the AOAC 2002.04 method. However, the use of these methods in the forage analysis and concentrated by-products does not compromise the accuracy of analytical results. The Ankom system was convenient for all foods when compared to the AOAC Official Method 2002.04.

Keywords: accuracy; analysts; BLUP; insoluble fiber; ruminants

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DE FIBRA NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES	14
3.2. APARELHOS PARA DETERMINAÇÃO DA FIBRA INSOLÚVEL	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. LOCAL EXPERIMENTAL E AMOSTRAS	23
4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS	24
4.3. ANÁLISES BROMATOLÓGICAS	24
4.4. ANÁLISES DE FIBRA E ANALISTAS	25
4.5. SISTEMAS DE ANÁLISE DE FIBRA	26
4.6. ANÁLISE DE FIBRA PELO MÉTODO AOAC 2002.04	27
4.7. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TRABALHO DE α -AMILASE	30
4.8. ANÁLISE DE FIBRA EM SISTEMA AUTOCLAVE OU MICRO-FDN MODIFICADO	31
4.9. ANÁLISE DE FIBRA PELO SISTEMA ANKOM	32
4.10. ANÁLISE DE FIBRA NO SISTEMA DE EXTRAÇÃO EM SACOS FILTRANTES (SES)	34
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4.11.1. Métodos estatísticos e critérios de avaliação de modelos	35
4.11.2. Análise Estatística dos Resultados Analíticos da Determinação da Fibra ..	36
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

Uma das análises de maior relevância na nutrição de ruminantes refere-se à determinação fibra, uma entidade nutricional, que permite caracterizar um alimento quanto ao seu valor energético e o seu potencial de consumo. A fibra possui digestibilidade variável para ruminantes, dado seu grau de associação com lignina (MERTENS, 2002; 2003), e, portanto, “ocupa espaço no trato”, podendo limitar o consumo e o desempenho animal (JUNG, 1997). O método analítico de determinação de fibra, conhecido como sistema detergente neutro, é um método empírico e foi desenvolvido segundo a definição nutricional da fibra. Em função disso, a fibra pode assumir diversas naturezas de acordo com o procedimento de análise. Em nutrição de ruminantes é caracterizada como entidade nutricional e definida como a fração orgânica da dieta, que é indigestível ou lentamente digestível e que ocupa espaço no trato gastrointestinal dos animais (MERTENS, 2002; 2003).

O método original de obtenção dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) foi desenvolvido por Peter Van Soest e colaboradores, nos anos de 1960, nos Estados Unidos e, desde então, sofreu numerosas modificações. Nesse sistema, a fibra é determinada gravimetricamente como a diferença de peso antes e após o processo de extração do material em detergente neutro, e o material remanescente é denominado fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), primariamente constituída de componentes majoritários da parede celular vegetal, celulose, hemicelulose e lignina (VAN SOEST, 1964; 1967; VAN SOEST *et al.*, 1991), e em alimentos de origem animal, compreende também a matéria nitrogenada indigestível (MERTENS, 2002).

O método original de análise sofreu diversas modificações ao tentar melhorar sua aplicabilidade, principalmente para alimentos concentrados. Algumas foram desenvolvidas em laboratórios individuais e, devido à falta de testes rígidos para determinar a aptidão do método para os diversos tipos de alimentos, essas modificações resultaram em variações entre laboratórios na medição da FDN (MERTENS, 2002).

David Mertens, na década de 80, iniciou esforços para padronizar a análise de FDN entre os laboratórios dos EUA, percebendo que a única forma de reduzir o erro entre laboratórios seria prescrever um único método analítico para todos os tipos de alimentos. Os esforços de Mertens resultaram na recomendação que todos os alimentos devem ser analisados com o uso de solução de trabalho padronizada de α -amilase termoestável, sulfito de sódio e corrigidos para cinzas, e nomeou o material remanescente como “aFDN_{mo}” (matéria orgânica

fibrosa, tratada com amilase) (UDÉN *et al.*, 2005), definida como entidade nutricional (MERTENS, 2002; 2003). O método padronizado por Mertens (2002) foi adotado como oficial pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International* (AOAC Official Method - 2002.04/ *Amylase-Treated Neutral Detergente Fiber in Feeds*).

As metodologias oficiais, originalmente descritas por Van Soest e Wine (1967) e por último, padronizadas por Mertens (2002), são realizadas em sistema de refluxo em béquer denominado refluxo convencional ou sistema de refluxo em cadinhos filtrantes chamado de Fibertec[®], além da filtração do resíduo em cadinhos filtrantes de placa porosa. No Brasil, e também em outros países (FERREIRA; MERTENS, 2007; HRISTOV *et al.*, 2010), outro sistema, com uso de sacos filtrantes (*Filter Bag System*), em que as amostras são acondicionadas e então submetidas à extração com detergente neutro em ambiente pressurizado, é amplamente utilizado. Este sistema se mostra vantajoso por ser menos laborioso, eliminando etapas individuais do método convencional, como filtração e lavagem.

O sistema Ankom[®] para análise de fibras baseia-se na digestão e filtração das amostras de alimentos contidas em saquinhos filtrantes, em um recipiente fechado e pressurizado. Apresenta vantagens em relação ao sistema convencional por ter menor custo e ser menos laborioso (VOGEL *et al.*, 1999). O sistema de extração denominado Digestor de Fibras em Sacos de Extração, da marca Tecnal[®] (TE-149) apresenta o mesmo princípio de funcionamento do sistema Ankom[®], no entanto, não é pressurizado.

Os aparelhos Ankom[®] de análises de fibra têm sido amplamente utilizados em instituições de pesquisa, universidades e empresas particulares, tanto no Brasil como em outros países. Em relação ao método convencional em sistema de refluxo, o *Filter Bag System* da Ankom[®] apresenta a vantagem de determinar um grande número de análises por dia, o que tem tornado esse aparelho mais atrativo na condução das análises. Entretanto, uma dúvida pertinente ao uso deste sistema é quanto à concentração de FDN obtida com esta técnica. Contudo, são escassas as publicações que avaliaram este sistema em relação ao método convencional publicado na AOAC (MERTENS, 2002). As citações mais frequentes que relatam a existência de diferenças entre os teores obtidos nos diferentes sistemas são de Vogel *et al.* (1999), Bortolassi *et al.* (2000), D'heer *et al.* (2000), em estudos anteriores à padronização realizada por Mertens (2002). Em função disso, o uso do sulfito de sódio e de amilase foram omitidas nestas publicações.

No estudo colaborativo de Mertens (2002), o sulfito de sódio foi considerado crítico na remoção de material proteínico e foi reintroduzido no método. Outro aspecto considerado pelo autor é que alimentos com teores de lipídeos acima de 100 g.kg⁻¹ devem passar por um processo

de pré-extração antes de serem submetidos ao detergente neutro, devido ao fato dos lipídeos formarem complexos com a solução de detergente neutro e reduzir a eficiência da extração. Além desses fatores, Mertens (2002) é enfático quanto ao uso de soluções concentradas de α -amilase termoestável, as quais não são recomendadas como soluções de trabalho, pois podem apresentar atividade proteolítica e até fibrolítica, afetando assim os resultados.

Embora seja improvável que todos os cientistas sigam rigorosamente o protocolo de Mertens (2002), ele é recomendado como a principal referência para a análise de FDN, a qual deveria ser especificada como aFDN_{mo} ou aFDN, quando omitida a correção das cinzas (UDÉN *et al.*, 2005).

De acordo com Mertens (2003), os métodos de determinação de FDN precisam apresentar relevância e reprodutibilidade. A primeira diz respeito ao fato do método fornecer uma informação nutricional relevante e prover ciência quantitativa para a descrição do alimento. A reprodutibilidade é a capacidade do método de ser conduzido em diversos laboratórios e apresentar resultados similares para a mesma análise e é um atributo fundamental para assegurar que os resultados sejam acurados e comparáveis entre as pesquisas (HORWITZ, 1982; MERTENS, 2003). Acurácia é a habilidade de um resultado ser autêntico ou aproximar-se da verdade. A precisão – outro atributo importante em análises laboratoriais – é a ausência de variação entre os resultados de uma mesma análise de um mesmo alimento (MERTENS, 2003).

Face ao exposto, embora o método da obtenção da aFDN_{mo} tenha sido padronizado por Mertens (2002) e seja recomendado pela AOAC como protocolo oficial, em sistema de refluxo convencional e Fibertec[®], diferentes sistemas de extração encontram-se disponíveis para realização de análises de componentes fibrosos, os quais são diferenciados quanto ao ambiente físico para condução dos procedimentos de extração e forma física de interação entre a amostra e reagentes. Além disso, alguns sistemas apresentam metodologia específica, diferente do método oficial. Estas particularidades dos aparelhos podem resultar em diferenças quanto aos teores de aFDN_{mo} obtidos em cada ambiente.

A utilização ou subutilização de diferentes métodos na análise de aFDN_{mo}, sem a exclusão de possíveis erros em comparação aos resultados obtidos em sistema de refluxo convencional ou Fibertec[®] como metodologia oficial, implicam restrição de seu uso, na acurácia e precisão, dificultando a comparação de resultados de pesquisas. Desta forma, justificam-se pesquisas que busquem eliminar possíveis erros de análise, e verificar a variabilidade intralaboratório para a análise de fibra.

2. OBJETIVO

A presente pesquisa tem como objetivo comparar os diferentes sistemas analíticos de determinação de fibra insolúvel em detergente neutro com o método oficial de análise AOAC 2002.04.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DE FIBRA NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

A fibra dietética é uma entidade nutricional que somente poderia ser determinada verdadeiramente *in vivo*, mais precisamente durante o processo de digestão. No laboratório, métodos químicos e enzimáticos foram idealizados para quantificar a fibra dietética, entretanto, a acurácia e relevância desses métodos baseiam-se sobre a metodologia analítica da fibra, elaborada de acordo com a sua definição nutricional (MERTENS, 2003). Estes métodos analíticos foram desenvolvidos com o propósito de quantificar uma fração resistente à digestão e não uma determinada substância vegetal, anatomicamente ou bioquimicamente reconhecível nas plantas. A fibra é um agregado de compostos e não uma entidade química distinta, assim, a sua composição química depende da metodologia analítica empregada na sua determinação (MERTENS, 2003).

A primeira tentativa de isolar uma fração fibrosa dos alimentos foi conduzida por Einhoff, por volta dos anos de 1808 (VAN SOEST, 1994), que consistiu em obter um macerado fibroso em água filtrado em tecido. Nos anos de 1860, o sistema de análises proximais ou método Weende de análises de alimentos foi padronizado na Estação Experimental da Alemanha (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985). Neste sistema, o alimento era tratado com soluções ácida e alcalina, e o extrato fibroso denominado como Fibra Bruta (FB) em oposição ao Extrativo Não Nitrogenado (ENN), resultante da subtração do montante de Proteína Bruta (PB), Gordura Bruta (GB) e Fibra Bruta (FB) da Matéria Orgânica (MO) do alimento, que deveria assim conter os carboidratos solúveis do alimento (VAN SOEST, 1967; VAN SOEST, 1994). Posteriormente, constatou-se que a FB é composta primariamente de celulose acrescida de quantidades variáveis de hemicelulose e lignina (VAN SOEST, 1994; JUNG, 1997). De tal modo que, para alguns alimentos, o ENN poderia ser menos digestível do que a fibra bruta, devido à presença variável de lignina, um componente indigestível, solubilizado pelo tratamento com solução alcalina (VAN SOEST, 1964), e também hemicelulose (VAN SOEST, 1967), um carboidrato fibroso. Nenhuma destas frações, FB ou ENN, atende ao conceito de uniformidade nutricional ideal (VAN SOEST, 1967). O atributo desta extração correspondia

aos conceitos nutricionais conhecidos na época, as digestões ácida e alcalina, no estômago e no intestino delgado, respectivamente, antes da descoberta das enzimas (MERTENS, 2003), e foi por mais de 100 anos o método de obtenção de fibra dietética empregado na nutrição (VAN SOEST, 1994).

Face à problemática do método da Fibra Bruta, Van Soest e colaboradores, na década de 1960, desenvolveram o sistema detergente, com intuito de isolar a fração fibrosa do alimento e prover um método adequado para substituir a fibra bruta. O método de obtenção de fibra em detergente neutro foi inicialmente desenvolvido para isolar como fibra dietética insolúvel os constituintes majoritários da parede celular das plantas: celulose, hemicelulose e lignina (VAN SOEST, 1964; 1967; VAN SOEST; ROBERTSON, 1985; VAN SOEST *et al.*, 1991). O propósito desta extração com detergente neutro consistiu em caracterizar os alimentos em duas entidades químicas distintas, apresentando digestibilidade e consumo diferentes. A FDN é caracterizada como sendo o material que “ocupa espaço no trato gastrintestinal” e possui digestibilidade variável (MERTENS, 2002). Em função desses fatores, afeta fisiologicamente o consumo alimentar e requer significativa redução do tamanho de partículas, a fim de facilitar o processo digestivo (VAN SOEST, 1967; MERTENS, 2003). Por sua vez, o conteúdo solúvel em detergente neutro (SDN), tem alta e relativamente constante digestibilidade e é totalmente fermentado no rúmen entre vários alimentos (VAN SOEST, 1964; 1967; VAN SOEST *et al.*, 1991; VAN SOEST, 1994; MERTENS, 1996), em função disso, ocupa pequeno espaço no trato (MERTENS, 2003), o que o caracteriza como entidade nutricional ideal (VAN SOEST, 1994).

O sistema de detergentes apoiou-se sobre a teoria do teste de Lucas, cujo propósito consistiu em identificar uniformidade nutricional ideal das frações químicas dos alimentos, baseado sobre a regressão da quantidade de uma fração vezes o seu coeficiente de digestibilidade em função do conteúdo desta fração no alimento. Van Soest (1967) demonstrou, por meio dos resultados do teste de Lucas, que a parede celular não se comporta como uma entidade nutricionalmente uniforme, o que inviabiliza o uso de uma única fração para prever a digestibilidade da matéria seca (MS). A FDN, apesar de não apresentar-se como fração com uniformidade nutricional ideal, o conteúdo solúvel em detergente neutro (SDN=MS-FDN) é uma entidade nutricional uniforme, com perda metabólica constante (11 a 12% do consumo de MS) e digestibilidade de aproximadamente 98% da MS.

A parede celular e a fibra em detergente neutro (FDN), embora altamente correlacionadas, não são sinônimos, por definição ou composição (VAN SOEST ; ROBERTSON, 1985; MERTENS, 1996; MERTENS, 2003). A fibra não é uma entidade química, nutricional ou fisicamente uniforme (VAN SOEST *et al.*, 1991) e o método analítico

pode isolar alguns constituintes que não são componentes da parede celular vegetal. Já o termo parede celular vegetal não corresponde à fibra insolúvel, mas, sim, a uma definição anatômica da célula e contém pectina, um carboidrato de rápida fermentação, é solubilizado pelo método de obtenção da fibra insolúvel em detergente neutro (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985; MERTENS, 1996; MERTENS, 2003).

Desde sua criação, o método original de análises de fibra desenvolvido por Van Soest e colaboradores para análises de forrageiras passou por diversas modificações com o objetivo de acomodar uma ampla série de alimentos (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985). Van Soest e Robertson (1985) modificaram o método por meio da inclusão de α -amilase para remover o amido, e exclusão do sulfito de sódio, que foi adotado como método de obtenção da FDN mais acurado para alimentos concentrados. Van Soest *et al.* (1991), na década de 1990, mantiveram a α -amilase e recomendaram o uso facultativo do sulfito de sódio nas análises.

Na década de 1980, David Mertens iniciou esforços para padronizar a análise de FDN entre os laboratórios dos EUA, percebendo que a única forma de reduzir o erro entre laboratórios seria prescrever um único método analítico para todos os tipos de alimentos. Os esforços de Mertens resultaram em recomendações que todos os alimentos deveriam ser analisados com o uso de solução de trabalho padronizada de α -amilase termoestável, sulfito de sódio e corrigidos para cinzas, e designou o material remanescente como “aFDNmo” (matéria orgânica fibrosa, tratada com amilase) (UDÉN *et al.*, 2005), que foi definida como entidade nutricional (MERTENS, 2002; 2003). O método padronizado por Mertens (2002) foi adotado como método oficial pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International* (AOAC Official Method - 2002.04/ *Amylase-Treated Neutral Detergente Fiber in Feeds*).

O método padronizado por Mertens (2002) para a obtenção de aFDNmo (fibra livre de amido) foi desenvolvido para todos os alimentos, incluindo as forrageiras, grãos, oleaginosas, plantas e subprodutos de origem animal utilizados na nutrição animal com concentrações de aFDNmo entre 1,5 a 100%. O método constitui em uma modificação do original e inclui a adição de sulfito de sódio para remoção dos contaminantes proteínáceos e α -amilase termoestável para remover amido durante a extração com detergente neutro. O uso de solução de trabalho de α -amilase é necessário, pois o DN (detergente neutro) tem ação limitada para remover o amido dos alimentos (MERTENS, 2003).

Os métodos recomendados por Van Soest *et al.* (1991) e por Mertens (2002) diferem, basicamente, quanto ao emprego facultativo do sulfito de sódio (Na_2SO_3). Van Soest *et al.* (1991) argumentaram que o sulfito produzia reações químicas não biológicas e indesejáveis, que afetariam as proteínas integrantes da parede celular vegetal e poderiam solubilizar parte da

lignina. Para Mertens (2002), o sulfito não reage com a lignina de forma significativa e que o seu emprego é necessário para remoção de material proteínico, a fim de obter teores de fibra comparáveis. Contudo, o emprego do detergente neutro sem o sulfito de sódio deve ser realizado quando o objetivo da extração é quantificar as frações lentamente digestíveis e indigestíveis da proteína bruta – NIDN e NIDA – nitrogênio insolúvel em detergente neutro e nitrogênio insolúvel em detergente ácido, respectivamente (LICITRA *et al.*, 1996).

Além disso, Mertens (2002) recomendou que as análises de aFDN_{mo} sejam conduzidas com soluções de trabalho padronizadas de α -amilase termoestável e com correções de determinações em branco, na ausência de amostras, para retificar os erros sistemáticos associados às pesagens e melhorias na precisão e acurácia dos resultados de análises de alimentos com baixo conteúdo de fibra.

O termo fibra dietética, proposto inicialmente por Hipsley (1953), citado por Mertens (2003), empregado na nutrição de ruminantes, representa o material indigestível ou lentamente digestível que ocupa espaço no trato gastrointestinal. Entretanto, esta definição considera a matéria mineral e, conseqüentemente, adotou-se que a fibra poderia ser definida como sendo a matéria orgânica indigestível ou de lenta digestão que ocupa espaço no trato gastrointestinal, denominada aFDN_{mo}, adotando-se a correção para cinzas (MERTENS, 2003). A correção para cinzas é porque a mesma garante a eliminação de algumas diferenças associadas à lavagem inadequada de resíduos fibrosos, além de permitir aos nutricionistas estimar carboidratos não fibrosos com mais precisão, por diferença (MERTENS, 2002). Essa definição exclui igualmente os constituintes de parede celular como polissacarídeos como a pectina, que apresentam rápida fermentação e digestão ruminal, assemelhando-se ao conteúdo celular. A correção para cinzas permanece facultativa no estudo colaborativo de Mertens (2002), porém a sua adoção, assim como a correção em branco, permite maior acurácia nas análises e também maior concordância com a definição de fibra dietética insolúvel (MERTENS, 2003).

Embora o conceito de fibra esteja baseado somente no critério nutricional (com base em seus efeitos digestivos e fisiológicos), na realidade, a determinação da fibra é definida pelo método de análise (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985; MERTENS, 1992; 2003). Normalmente os métodos analíticos são desenvolvidos com base em um padrão primário. No caso da proteína bruta, por exemplo, este padrão é o nitrogênio, que é determinado e, em seguida, convertido em proteína bruta por meio de sua multiplicação por um fator ($N \times 6,25$), considerando-se que as proteínas contêm, em média, 16% de N. No caso da fibra não existe um padrão primário, por que não existe uma substância homogênea que atenda à definição nutricional (RODRIGUES, 1998). Por isto o método de determinação da fibra é empírico, e

todas as etapas detalhadas por Mertens (2002), no método referencial, tais como preparo de reagentes, seleção das amostras, tamanho de partícula da amostra, tempo de fervura, recipientes de fervura e filtragem, tempos de lavagens e secagem, podem afetar os resultados. Desta forma, qualquer modificação no método pode afetar o que se mede como fibra.

Os resultados analíticos do sistema detergente, em termos de acurácia e reprodutibilidade, dependem da observância rigorosa às recomendações para a realização do ensaio, de forma que produza valores comparáveis para quaisquer alimentos e que reflitam, com verossimilhança, a quantidade de fibra que atenda à definição nutricionalmente relevante, que orientou o desenvolvimento do método analítico (MERTENS, 1992; 2002; 2003; VIEIRA; FERNANDES, 2006). Ainda, cabe a observação que o corpo editorial da AFST (*Animal Feed Science and Technology*) sugeriu uma lista de siglas e termos para serem utilizados pelos autores e enfatizou que qualquer desvio do método recomendado deva ser detalhado e justificado para evitar dúvidas (UDÉN *et al.*, 2005).

3.2. APARELHOS PARA DETERMINAÇÃO DA FIBRA INSOLÚVEL

O método de determinação de fibra em nutrição de ruminantes mais utilizado é o sistema detergente. No entanto, existem vários sistemas físicos de extração de FDN e de FDA (Fibra em Detergente Ácido), podendo-se citar o método convencional (VAN SOEST; WINE, 1967), padronizado por Mertens (2002) e adotado pela AOAC e, também, os métodos da *Filter Bag Technique* da Ankom[®] (ANKOM Technology Corporation), do *Filter Bag* em aparelho não pressurizado da Tecnal[®] (TE-149) e sistema da Autoclave, denominado como Micro-FDN, de Pell e Schofield (1993).

O método oficial, adotado pela AOAC (2002.04), segundo a metodologia proposta por Mertens (2002), recomenda que a análise seja realizada em aparelho de refluxo, com condensadores, que a extração seja realizada em béqueres e que o resíduo seja retido em cadinhos filtrantes individuais. Este método é mais laborioso, uma vez que as análises são feitas manualmente, com etapas individuais, como filtrações e lavagens.

A metodologia do sistema Fibertec[®] assemelha-se ao método manual e também é recomendado por Mertens (2002) como sistema analítico de determinação de fibra (aFDN_{mo}).

Neste aparelho, o processo é parcial ou totalmente automatizado e o refluxo ocorre diretamente em cadinhos filtrantes, de acordo com a metodologia oficial.

Metodologias parcial ou totalmente automatizadas, denominadas *Filter Bag System*, foram desenvolvidas com o intuito de eliminar etapas laboriosas e minuciosas, bem como a presença de erros sistemáticos relacionados ao manuseio de equipamentos e vidrarias. Outras características destes métodos seriam o menor custo e maior rapidez na obtenção dos resultados. O sistema Ankom[®] para análise de fibras foi lançado no mercado, em 1993, cujo princípio de funcionamento baseia-se na digestão e filtração das amostras de alimentos contidas em saquinhos, em ambiente fechado, pressurizado, com agitação vertical, preservando-se as características quantitativas do alimento dentro dos saquinhos. Apresenta vantagens em relação ao sistema convencional por ter menor custo e ser menos laborioso (VOGEL *et al.*, 1999) e permite a determinação de 24 amostras simultaneamente.

Os aparelhos Ankom[®] vêm sendo amplamente utilizados em instituições de pesquisa, universidades e empresas particulares, tanto no Brasil como em outros países, entretanto, uma dúvida pertinente ao uso deste equipamento é quanto à concentração de FDN obtida com este sistema. Todavia, são escassas as publicações que compararam os resultados obtidos no *Filter Bag System* com os resultados obtidos por metodologia oficial publicada na AOAC (MERTENS, 2002). As citações mais frequentes, garantindo a existência de diferenças entre os teores obtidos nos diferentes sistemas, são de D'heer *et al.* (2000) e Bortolassi *et al.* (2000), em estudos anteriores à padronização realizada por Mertens (2002). Em função disso, o uso do sulfito de sódio e de amilase foram omitidas nestas publicações.

Desde a invenção do sistema Ankom pesquisas foram conduzidas para comparar as determinações deste método com os métodos de referência vislumbrados à época. Neste aspecto, essas pesquisas se diferenciam não apenas pela avaliação do ambiente físico de extração, mas também quanto às recomendações de reagentes, quantidades de amostra, emprego de α -amilase e sulfito de sódio. Assim, podem ser observados estudos que empregaram as recomendações de Van Soest e Robertson (1985) ou de Van Soest *et al.* (1991) para o sistema Ankom, comparando-o com os resultados obtidos por estes métodos convencionais, tais como os estudos conduzidos por Vogel *et al.* (1999), Bortolassi *et al.* (2000) e Berchielli *et al.* (2001). Em tais estudos foram adotadas as recomendações do método AOAC 2002.04 para o sistema Ankom, como o de Barbosa *et al.* (2015), avaliando apenas o sistema físico de extração em comparação ao método oficial. Por fim, um estudo que seguiu a metodologia recomendada pela Ankom e comparou os resultados obtidos neste sistema com o método AOAC 2002.04, conduzido por Ferreira e Mertens (2007).

Bortolassi *et al.* (2000) compararam os teores de FDN obtidos em sistema Ankom[®] com os determinados em sistema convencional, constatando que o sistema não é adequado para a análise de FDN para o milho grão. O método convencional foi utilizado sem a adoção da solução padronizada de trabalho de α -amilase e do sulfito de sódio como recomendado por Mertens (2002). De acordo com Horwitz (1982), um método de análise deve apresentar aplicabilidade, isto é, ser aplicável a qualquer tipo de amostra.

Por outro lado, Berchielli *et al.* (2001) confrontaram as determinações de FDN e FDA para a cana-de-açúcar, silagem de milho, capim-braquiária cv. Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), polpa cítrica e fezes bovina obtidas em sistema Ankom, utilizando quatro tipos de sacos filtrantes, com as determinações obtidas no sistema convencional de Van Soest, e não constataram diferenças entre os teores de FDN obtidos com ambos os métodos na análise de fibra. Contudo, para a fibra em detergente ácido (FDA) foram declaradas diferenças para os teores obtidos com a técnica Ankom para polpa cítrica e fezes bovina, que foi conduzida de forma sequencial neste aparelho. A utilização de α -amilase termoestável e sulfito de sódio não foi detalhada nesta publicação.

Ferreira e Mertens (2007) também avaliaram as determinações de FDN (com sulfito), RDN (Resíduo em Detergente Neutro - com amilase) e aFDN (com sulfito e amilase) em dois sistemas de extração, refluxo com cadinhos filtrantes e Ankom com sacos filtrantes, para 33 amostras de silagem de milho. Não constataram diferenças para as concentrações de aFDN obtidas nos dois sistemas de extração. Mas, na ausência de amilase, desaconselharam o uso do Ankom por superestimar o teor de FDN.

No Brasil, recentemente, Barbosa *et al.* (2015) avaliaram os sistemas de extração em aparelho Autoclave e sistema Ankom[®], além de uma modificação do sistema Oficial (AOAC, 2002.04) que utiliza uma única adição de α -amilase bruta em vez de soluções padronizadas de trabalho com a metodologia oficial, com adaptações, em sistema de refluxo. Os autores concluíram que os sistemas Ankom e Autoclave, com mesma quantidade de reagentes adotados no método convencional, produziram estimativas viesadas do teor de FDN para amostras de fezes, forragens e concentrados.

Outro sistema de extração denominado *Filter Bag System* é o de análise de fibra em ambiente não pressurizado, que tem sido fabricado pela empresa Tecnal[®] (Tecnal-149), entre outras. Este aparelho apresenta princípio de extração semelhante ao sistema Ankom, em que as amostras são acondicionadas em saquinhos e, em seguida, submetidas à extração em ambiente fechado. No entanto, no aparelho da Tecnal, o ambiente de extração não é pressurizado tal como no Ankom.

De acordo com Gomes *et al.* (2011), em ambientes não pressurizados, a formação de bolhas de gás dentro dos sacos poderia comprometer a eficiência de contato do detergente com a amostra. Em estudo avaliando os dois sistemas, pressurizado e não pressurizado, os autores verificaram valores mais elevados de FDN no sistema não pressurizado, no entanto, não realizaram a comparação dos dois sistemas com aqueles de referência para o método, segundo as recomendações de Mertens (2002).

O ambiente físico do sistema da autoclave ou Micro-FDN, segundo Pell e Schofield (1993), caracteriza-se por acomodação das amostras em frascos do tipo *penicilina*, que são acrescidos de detergente neutro, vedados e acondicionados em aparelho autoclave, a 105 °C, durante 60 minutos. Após a extração, as amostras contidas nos frascos são filtradas em filtros de lã de vidro e passam por um processo sequencial de lavagem com água quente (100 °C), etanol e acetona. No método original não são utilizados α -amilase termoestável e sulfito de sódio. Os autores advertiram que o método não foi validado para alimentos concentrados.

Este sistema analítico em autoclave com adaptações foi recentemente analisado por Senger *et al.* (2008), que avaliaram as determinações de aFDN obtidas em autoclave sob diferentes combinações de tempo e pressão em comparação aos resultados obtidos por metodologia oficial (MERTENS, 2002). Mas não empregaram sulfito de sódio e padronização da solução de trabalho de α -amilase. Na análise em autoclave utilizaram sacos filtrantes de poliéster (4×5cm, 50 μ m de porosidade) e relação de 100 mL de DN/g de amostra de concentrado e 76 mL de DN/g de amostra de forragem, além de duas doses de 300 μ L de α -amilase, no início e na primeira lavagem para cada conjunto de 10-15 amostras. Dentre os tratamentos avaliados, os autores concluíram que as análises de aFDN e FDA (fibra em detergente ácido), em forragens ou alimentos concentrados, podem ser realizadas em autoclave sem comprometer a acurácia das determinações em comparação ao método convencional, utilizando sacos filtrantes e temperatura de 110 °C por 40 minutos.

De acordo com os escritos de Vieira e Fernandes (2006), o sistema detergente neutro é um método empírico e acurácia e reprodutibilidade de seus resultados dependem da realização severa das recomendações para a realização da avaliação, de forma que produza resultados comparáveis para quaisquer alimentos e plausíveis a quantidade de fibra segundo a definição nutricional relevante (MERTENS, 1992; 2002; 2003). Embora o conceito nutricional e método de obtenção da aFDNmo tenham sido padronizados por Mertens (2002), em sistema de refluxo convencional e Fibertec, com uso de cadinhos filtrantes (AOAC 2002.04), diversos sistemas de extração vêm sendo amplamente utilizados na análise de aFDNmo. Esses sistemas apresentam particularidades em relação ao manuseio das amostras, ambiente físico de extração

e, principalmente, no que se refere ao contato e forma como o reagente interage com a amostra em adição às particularidades de cada sistema quanto à relação entre amostra e detergente neutro (DN), quantidade de α -amilase termoestável e sulfito de sódio. Estas particularidades dos métodos podem resultar em diferenças quanto aos teores de aFDNmo obtidos em cada ambiente para um mesmo alimento. Sendo assim, os teores obtidos por protocolo não oficial devem corresponder aos teores obtidos por protocolo oficial, o que justifica os esforços de pesquisa no sentido de comparar os relativos teores de fibra dos diversos alimentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL EXPERIMENTAL E AMOSTRAS

O projeto de pesquisa foi realizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no Laboratório de Zootecnia (LZO), em Campos dos Goytacazes, RJ.

Para a avaliação dos diferentes sistemas de extração de FDN foram adquiridas 19 amostras de alimentos e uma de serragem de madeira (material de alta celulose), totalizando 20 materiais para compor o banco de amostras, buscando-se alta diversidade em composição química, de forma a obter amplitude dos teores de aFDN_{mo}, entre 0 e 90%, e também para outros analitos (PB, GB, MM, CNF), com o intuito de avaliar algumas das possíveis interações entre composição do alimento e método de análise de fibra. Foram utilizados alimentos de origem animal, com alta gordura e alto conteúdo de matéria mineral, forrageiras conservadas por meio de fermentação, leguminosas e gramíneas, alimentos processados por calor e sementes oleaginosas, de acordo com as sugestões de Mertens (2002).

Foram utilizadas os seguintes alimentos: milho grão (*Zea mays* - MG), silagem de milho (*Zea mays* - SM), sorgo grão (*Sorghum bicolor* - SgG), soja grão (*Glycine max* -SjG), resíduo de cervejaria (RC), feno de alfafa (*Medicago sativa* - FA), feno de tifton 85 (*Cynodon* spp. corte com 45 dias - FT), capim elefante, cv. Napier (*Penisetum purpureum* cv. Napier – corte com 1,5 metros - CE), farelo de soja (*Glycine max* - FS), farelo de trigo (*Triticum* spp - FTr), farelo de glúten de milho (FGM), cana-de-açúcar *in natura* (*Saccharum officinarum* - CA), palha de milho (PA), casca de soja (CS), farelo de algodão - 48% (*Gossypium hirsutum* L. - FAg), polpa cítrica (PC), composto lácteo (CL), farinha de carne e ossos (FCO), feno de azevém (*Lolium multiflorum* - FAz) e serragem de madeira (SMad).

A farinha de carne e ossos (FCO) compôs o banco de amostras por representar uma amostra conhecidamente difícil de analisar (MERTENS, 2002) e apresentar alto conteúdo de proteína, gordura e minerais. Da mesma forma, o composto lácteo, produto de origem animal, apresenta baixo conteúdo de fibra e alto teor de gordura.

As amostras de silagem de milho, feno de tifton 85, capim elefante, cana-de-açúcar, milho grão, farelo de soja, farelo de trigo e sorgo foram obtidos na Unidade de Apoio e Pesquisa

em Zootecnia (UAPZ), do Laboratório de Zootecnia da UENF, enquanto as demais foram adquiridas por empresas comerciais.

4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

Amostras com alto teor de umidade, como silagem de milho, resíduo de cervejaria, cana-de-açúcar e capim elefante foram secas em estufa de ventilação forçada, à temperatura de 55 °C por 72 horas, em sacos de papel previamente tarados, obtendo-se os teores de ASA (matéria seca ao ar), conforme as recomendações descritas em Undersander *et al.* (1993).

As amostras foram moídas em moinhos de facas do tipo Wiley, inicialmente em peneiras com crivo de 5 mm e, em seguida, moídas utilizando-se peneiras com crivo de 1mm. As amostras foram homogeneizadas após a moagem por meio da técnica de quartilhamento descrita por Undersander *et al.* (1993) e Mertens (2002), e retiradas alíquotas que foram armazenadas em potes plásticos vedados e devidamente identificados por números correspondentes. As amostras não foram identificadas pelo próprio nome com intuito de evitar a sua identificação por cada analista.

4.3. ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

Todas as amostras foram analisadas, em duplicatas, para os seus teores de Matéria Seca em Laboratório (MS, AOAC 967.03; AOAC, 1998; UNDERSANDER *et al.*, 1993), Proteína Bruta (PB, AOAC, 2001.11; AOAC, 1998; THIEX *et al.*, 2002), Matéria Mineral (MM, AOAC 942.05; AOAC, 1998), Gordura Bruta (GB, AOAC 2003.06; THIEX *et al.*, 2003), Fibra em Detergente Ácido (FDA, AOAC, 973.18; MÖLLER, 2009) e Lignina (Lig, AOAC 973.18; MÖLLER, 2009).

Amostras que apresentaram teor de gordura bruta superior a 50 g.kg⁻¹ foram pré-desengorduradas imediatamente antes das análises de aFDN_{mo}, conforme a recomendação oficial proposta por Mertens (2002).

Os Carboidratos Não Fibrosos (CNF) foram calculados de acordo com a seguinte Equação, adotando-se os valores de aFDN_{mo} obtidos por meio do sistema refluxo convencional, segundo a metodologia oficial (AOAC 2002.04).

$$CNF(g.kg^{-1}) = 1000 - MM - PB - GB - aFDN_{mo} \quad (1)$$

4.4. ANÁLISES DE FIBRA E ANALISTAS

Para a avaliação dos sistemas de análise de aFDN_{mo} todas as amostras foram analisadas em duplicatas ou mais, por três diferentes analistas, nos cinco diferentes métodos de análise.

Ao início do período experimental, os três analistas foram informados sobre as condições de execução das análises que consistiram na ausência de comunicação entre os analistas sobre resultados ou mesmo na forma de execução das análises de fibra. Os analistas receberam a metodologia da marcha da análise para ser executada em cada método, evitando-se assim, a troca de informações entre os mesmos. As metodologias de cada sistema de análise foram descritas exatamente como nas referências originais (PELL; SCHOFIELD, 1993; MERTENS, 2002; ANÔNIMO, 2015), para cada aparelho. Para os aparelhos refluxo convencional e Fibertec, foi fornecido a cada analista a versão original da metodologia (AOAC 2002.04), descrita por Mertens (2002). O objetivo com este procedimento foi de que cada analista executasse exatamente a mesma metodologia e garantisse a individualidade na execução das análises.

Cada analista elaborou seu próprio reagente, manteve armazenado sob seus cuidados e realizou todo o processo de análise. Os três analistas utilizaram o mesmo frasco de amostra, numericamente identificado, evitando a identificação da amostra. Para cada analista foram recomendadas quais amostras deveriam ser pré-desengorduradas antes das análises de fibra, que consistiram nas amostras de soja grão (SjG), composto lácteo (CL) e farinha de carne e ossos (FCO). Os procedimentos de pré-desengorduramento também foram descritos em marcha, de acordo com o método de análise.

4.5. SISTEMAS DE ANÁLISE DE FIBRA

Três sistemas analíticos descritos como Sistema Ankom, Sistema de Extração em Sacos (SES), da marca Tecnal[®], e Sistema Autoclave foram avaliados e comparados com o sistema oficial AOAC em aparelho de refluxo convencional e aparelho Fibertec[®] de análises de fibras. Os teores de aFDN_{mo} foram determinados em todas as amostras, por cada analista, nos cinco diferentes sistemas de extração.

Foram utilizados os sistemas de refluxo em béquer ou em cadinho filtrante, denominados como refluxo convencional e Fibertec, respectivamente, que são adotados pela AOAC (2002.04) como sistemas oficiais e recomendados por Mertens (2002). No refluxo convencional são utilizados cadinhos filtrantes de placa porosa de 40 a 60 µm e 40-50 mL de capacidade e no Fibertec cadinhos com placa porosa de 40-90 µm e 26-28 mL de capacidade.

O terceiro sistema de análise de aFDN_{mo} consistiu no aparelho Autoclave, conforme as recomendações de Pell e Schofield (1993), descrito com Micro-FDN, com adaptações. As amostras foram acomodadas em frascos do tipo *penicilina* (50 mL) e, após a extração, foram filtradas em filtro de lã de vidro (Pall, Type A/E, 47 mm; Pall Life Science), acomodado em cadinhos filtrantes de placa porosa.

Para as análises descritas como *Bag Filter System* foram utilizados dois sistemas de extração, designados como sistema Ankom[®] (Ankom) e Tecnal[®] (TE-149) para análises de fibra (SES). Em ambos os sistemas foram utilizados sacos filtrantes (F57 ou TNT) e as amostras de todos os alimentos foram processadas em conjunto, tanto durante as etapas de extração como de lavagem das amostras.

Em todos os métodos foi utilizada a solução de detergente neutro (DN), conforme as recomendações oficiais (AOAC 2002.04; MERTENS, 2002). Desta forma, foi utilizada a relação de 990 mL de água, 18,6 g de EDTA dissódico, 4,56 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), 6,81 g de borato de sódio decahidratado (Na₂B₄O₇.10H₂O), 30 g de lauril sulfato de sódio e 10 mL de trietileno glicol. O pH da solução foi mensurado e, quando necessário, ajustado para manter-se dentro da faixa entre 6,95 e 7,05 com HCl ou NaOH, caso a variação não fosse superior a 0,5.

Em adição à solução DN, foram utilizados, para todas as amostras, em todos os aparelhos, solução de trabalho de α-amilase termoestável (refluxo convencional e Fibertec) ou solução bruta de α-amilase termoestável (Ankom, SES e Autoclave), sulfito de sódio anidro e acetona (PA).

4.6. ANÁLISE DE FIBRA PELO MÉTODO AOAC 2002.04

Os sistemas de análise em refluxo convencional e Fibertec são recomendados pela AOAC como sistema oficial para análise de aFDN_{mo} (MERTENS, 2002).

No sistema de refluxo convencional de análise o procedimento consistiu na acomodação das amostras em béqueres individuais sem bico, com capacidade de 600 mL, que foram acomodados no aparelho de refluxo (MA450 Digestor para Fibra, Marconi[®], Piracicaba, SP, Brasil), dotado de unidades de aquecimento, reguladas para que 50 mL de água entrem em ebulição dentro de 4 a 5 minutos. O DN é mantido no sistema com auxílio de um condensador, com circulação contínua de água. Após o término do período de extração (60±5 min), amostra e solução foram filtradas em cadinhos filtrantes com placa porosa (40 – 50 mL; 40 – 60 µm) em unidade de vácuo. Cada unidade de sistema de refluxo tem capacidade para extração de 6 amostras individuais, as quais foram reguladas individualmente.

No sistema Fibertec (Fibertec[™] 1020, FOSS, Suzhou, China) de análise o procedimento difere do anterior no tocante à pesagem das amostras diretamente em cadinhos filtrantes (26 – 28 mL; 40 – 90 µm) previamente tarados e limpos, aos quais foram acoplados à unidade de aquecimento, regulada para que 50 mL de água entrem em ebulição em 10 minutos. O sistema de refluxo ocorre no cadinho e na coluna de vidro. O DN é mantido no sistema com auxílio de condensador com circulação contínua de água à temperatura ambiente. Ao término da extração, o resíduo fibroso foi filtrado diretamente nos mesmos cadinhos filtrantes. O Fibertec tem capacidade para executar seis análises por vez, incluindo as etapas de extração (fervura) e lavagem (1 e 2^a lavagens) executadas na unidade de aquecimento. Em seguida, os cadinhos contendo o resíduo fibroso foram alocados na unidade a frio para término da lavagem. O DN, a água fervente e a solução de trabalho de α -amilase foram adicionados, de forma manual, às amostras no sistema Fibertec.

No início do experimento todos os cadinhos, tanto do refluxo convencional como do Fibertec, foram incinerados em forno Mufla a 500 °C por três horas e, em seguida, testados quanto às suas taxas de filtração, na ausência de vácuo. Cadinhos recomendados para o refluxo convencional deveriam ter uma taxa de filtração de 180±60 segundos para drenar 50 mL de água destilada, já cadinhos do Fibertec deveriam filtrar 25 mL de água dentro de 75±30 segundos. Cadinhos cujas taxas de filtração estiveram fora destes limites de tempo não foram utilizados nas análises de aFDN_{mo}.

De acordo com as recomendações de limpeza dos cadinhos descritas por Mertens (2002), todos eles foram incinerados a 500 °C por 5 horas e colocados na posição inversa em aparelho Sonicador, acrescidos de DN e sonicados por sete minutos, lavados com água destilada fervente e, posteriormente, submetidos à imersão em água destilada à temperatura ambiente, por no mínimo 30 minutos, e então colocados invertidos na unidade de vácuo e lavados com água destilada, mantendo-se alta pressão negativa. Após a lavagem, todos os cadinhos foram secos em estufa ventilada (105 °C/12 horas), colocados em dessecador e pesados (0,0001 g) após 40 minutos (*WI*). O uso do dessecador, para todas as análises, seguiu as recomendações descritas por Undersander *et al.* (1993).

As amostras de cada alimento foram analisadas em duplicatas de forma aleatória, evitando-se a condução de análises repetidas do mesmo alimento na mesma rodada ou mesmo distanciá-las para execução ao final da rodada. Em função das condições de tempo e equipamentos, não foi possível realizar todas as análises de duplicatas em um mesmo dia.

Foi adotada a relação de 100 mL de solução de DN por grama de amostra, $0,5 \pm 0,1$ g de sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3) por amostra e a padronização da α -amilase, como descrita por Mertens (2002). Esta última é referida como solução de trabalho de α -amilase termoestável, diferenciando-a do emprego de solução bruta de α -amilase termoestável. A padronização será detalhada no próximo tópico.

Em ambos os aparelhos foram pesados $0,5 \pm 0,0050$ g de amostra (*Ws*) em béquer (refluxo convencional) ou em cadinhos filtrantes (Fibertec), utilizando-se balança analítica com precisão de 0,0001g. Foram incluídos dois brancos (*B*) para cada 20-30 amostras e mais uma determinação em branco para cada dia de análise ou conjunto de 20-30 análises.

Após o pré-aquecimento das unidades de extração, foi adicionado a cada amostra $0,5 \pm 0,1$ g de sulfito de sódio anidro e 50 mL de DN, no máximo uma hora antes da extração, que foram agitados e transferidos à unidade de aquecimento. Após a fervura (aproximadamente cinco minutos), foram adicionados 2 mL de solução de trabalho de α -amilase termoestável (Termamyl® 2X, Novozymes). Além disso, o conteúdo foi novamente agitado, de forma manual ou com pressão positiva, no caso do Fibertec, e contou-se, a partir deste instante, 60 minutos de extração.

Transcorrido o tempo de extração, as unidades de aquecimento foram desligadas e esperou-se a decantação da amostra no béquer dentro de 30 a 60 segundos. Ao mesmo tempo os cadinhos foram aquecidos com água destilada em ebulição durante 30 a 60 segundos. Os resíduos fibrosos foram transferidos do béquer ao cadinho filtrante acoplado à unidade de vácuo, sempre se mantendo o vácuo desligado até a decantação da amostra. Após a

transferência, preencheu-se o cadinho filtrante com água em ebulição até a metade e fez-se a segunda adição da de 2 mL de solução de trabalho de α -amilase, com tempo de ação de 45 a 60 segundos. Em seguida, o resíduo foi lavado por três vezes com água fervente (em ebulição), cada uma com duração de 3 minutos. Por fim, foram realizadas duas lavagens sequenciais com acetona, por 3 a 5 minutos cada.

O resíduo de FDN foi seco em estufa ventilada a 105 °C por 12 horas, transferidos ao dessecador e pesados (W_f e B_f). Posteriormente, incinerados em forno Mufla a 500 °C por 5 horas, mantidos em estufa não ventilada a 105 °C por no mínimo uma hora e pesados (W_a e B_a) para eliminar a contaminação por matéria mineral.

Para a amostra de farinha de carne e ossos (FCO), em função da dificuldade em filtrar o resíduo após a extração com DN, foram adicionados cerca de 12 e 8 gramas de areia em cadinhos de 50 mL e 26 mL, respectivamente, como auxiliar de filtragem (*filter aid*). A areia foi copiosamente lavada e incinerada em forno Mufla (500 °C/ 5 horas) antes de ser utilizada na análise.

Amostras de soja grão, composto lácteo e farinha de carne e ossos foram pré-extraídas com acetona antes da análise de aFDN_{mo}. As amostras foram pesadas (0,5g±0,005) diretamente em cadinhos filtrantes de massa conhecida, que foram acoplados à unidade de vácuo e adicionados 40-50 mL de acetona por quatro vezes consecutivas. As amostras permaneceram em solução por 5 minutos, agitadas por três vezes em cada. Após a drenagem e completa evaporação da acetona, o conteúdo dos cadinhos foi transferido ao béquer (600 mL, sem bico) com auxílio de DN. O mesmo cadinho foi utilizado para o resíduo após o refluxo com DN. No caso da FCO, a areia foi transferida a um pequeno béquer antes de pré-desengordurar a amostra. Em seguida, transferida novamente ao cadinho filtrante.

Esses procedimentos foram adotados tanto para o aparelho de refluxo convencional como para o Fibertec, respeitando-se as características peculiares de cada aparelho. Foram seguidas todas as recomendações descritas na metodologia oficial (AOAC, 2002.04; MERTENS, 2002), incluindo cuidados como disposição dos cadinhos em dessecador e método de pesagem destes, manipulação de vácuo durante a filtragem, evitando-se excesso de pressão e tempos de cada etapa na execução das análises.

Para o cálculo dos teores de aFDN_{mo}, obtidos conforme metodologia oficial (AOAC, 2002.04), foi utilizada a seguinte equação (MERTENS, 2002):

$$aFDN_{mo} = 1000 \times (W_f - W_a - B_f + B_a) / (W_s \times ASE) \quad (2)$$

4.7. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TRABALHO DE α -AMILASE

A padronização da α -amilase termoestável (Termamyl[®] 2X - KNU-T/g, Novozymes, Araucária, PA, Brasil) foi realizada conforme a metodologia oficial (AOAC 2002.04). Cada partida de α -amilase termoestável foi padronizada e as soluções de trabalho preparadas em balões volumétricos foram estocadas a 4 °C, com validade de 5 dias.

Seis amostras de milho degerminado moído a 1 mm foram pesadas ($0,5g \pm 0,0050$) em béqueres de 600 mL, onde foram adicionados 50 mL de DN, e em seguida, colocados em aquecimento no aparelho de refluxo convencional com as unidades previamente aquecidas, em intervalos de 1 minuto. Após a fervura foi adicionado a cada béquer uma das seis doses em progressão geométrica do extrato bruto de α -amilase termoestável (Termamyl[®] 2X Novozymes). Após 10 minutos de refluxo, foi adicionado a cada frasco a segunda dose de amilase e, em seguida, agitados e rinsados com DN, em intervalos de 1 minuto, mantendo-se a mesma dose equivalente por béquer. Após tempo de reação de 60 segundos, o conteúdo foi filtrado em dupla camada de gaze em béquer de vidro de 100 mL. Foram utilizados dois brancos com doses intermediárias de amilase e 40 mL de DN, que não foram aquecidos em refluxo.

Os béqueres (100 mL) contendo os resíduos, com exceção dos brancos, foram alocados em banho de gelo (0 °C) por 5 minutos e, em seguida, em banho a 20 °C, por 5 minutos. Em cada béquer, arranjado em ordem crescente de dose da enzima, sob um fundo branco, foi adicionado 0,5 mL de solução de iodo de Burke (20 g de KI e 1g I/L) e agitados em seguida. Após 90 segundos de reação, os béqueres foram visualizados por cima e tomou-se uma decisão, sempre realizada por dois analistas, sobre a cor da solução. A dose adequada de enzima foi escolhida quando a cor da solução foi amarelo palha.

A dose da enzima bruta imediatamente antes do amarelo palha (âmbar – V1) e a dose amarelo palha foram novamente utilizadas, com doses em progressão geométrica entre essas doses ($V1 \times 0,25$), repetindo-se o mesmo processo de padronização. A dose de escolha foi aquela cuja coloração da solução, após a adição de solução iodada de Burke, foi amarelo palha. O volume foi ajustado para o preparo de 100 mL de solução de trabalho de α -amilase, considerando-se que a concentração de α -amilase deveria ser a mesma do teste. Após a padronização fez-se a identificação do frasco da enzima, com a indicação de dose e data da padronização. A cada novo frasco da enzima fez-se a padronização.

4.8. ANÁLISE DE FIBRA EM SISTEMA AUTOCLAVE OU MICRO-FDN MODIFICADO

As análises de aFDN_{mo} no aparelho autoclave foram parcialmente conduzidas na Clínica Fitossanitária da UENF, com emprego de autoclave de esterilização da marca Phoenix (Phoenix Luferco, Araraquara-SP, Brasil).

Foram seguidas as recomendações de Pell e Schofield (1993) que apresentaram este método de análises como Micro-FDN. O método original descrito por Pell e Schofield (1993) foi empregado neste estudo com algumas adaptações tais como adição de 100 µL α-amilase termoestável por 100 mg de amostra e 166 mg de sulfito de sódio anidro por 100 mg de amostra, que seguiram as mesmas proporções do sistema Ankom (ANÔNIMO, 2015) e, ainda, o uso de cadinhos filtrantes para acomodação do filtro de lã de vidro.

As amostras de cada alimento foram pesadas (100 mg - *Ws*) e acondicionadas em frascos do tipo *penicilina* com capacidade de 50 mL. Os frascos foram identificados e, imediatamente antes da extração, foram adicionados 20 mL de DN com pH 7,0 e 0,166 g de sulfito de sódio e 50 µL de amilase bruta da Ankom[®] (sem padronização e diluição). Os frascos foram agitados, vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio e dispostos na autoclave previamente aquecida.

A autoclave foi regulada em 0,2 kgf.cm⁻² com o intuito de manter a temperatura em 105 °C durante os 60 minutos de extração (Pell and Schofield, 1993), contados a partir do momento de fervura. Foram executadas duas rodadas por analista contendo todas as amostras e brancos. Foram utilizados dois brancos (*B*) por rodada.

Após a extração, os frascos foram abertos e o conteúdo fibroso filtrado em cadinhos filtrantes que acomodaram os filtros de lã de vidro com diâmetro de poro de 1µm (Pall Type A/E, 47 mm; Pall Life Science, Nova York, EUA) recomendados por Pell e Schofield (1993). Os filtros foram previamente acondicionados em cadinhos (26 – 28 mL; 40 – 90 µm) de tara conhecida e pesados em dessecador após secagem em estufa (105 °C/12 horas). Para acomodar os filtros nos cadinhos foi necessário umedecê-los e utilizar um bastão de borracha. Em função do limitado tamanho do filtro de lã de vidro houve a necessidade de utilizar uma estrutura que viabilizasse as lavagens e sua manipulação. O mesmo procedimento oficial de lavagem (AOAC. 2002.04) foi utilizado para os cadinhos filtrantes.

Após a transferência quantitativa do resíduo fibroso para o conjunto cadinho filtro, procedeu-se uma lavagem com água destilada fervente e adição de 50 µL de α-amilase

termoestável bruta da Ankom, a qual foi deixada reagir por 60 segundos. O conteúdo foi drenado com auxílio de vácuo e foram realizadas três lavagens consecutivas com água destilada fervente, mantendo-se o resíduo em imersão por três minutos. Em seguida, o resíduo fibroso foi lavado com etanol (três minutos) e com acetona (três minutos), respectivamente. Os cadinhos foram secos em estufa ventilada (105 °C/12 horas), transferidos ao dessecador e pesados (W_f ou B_f), na mesma ordem em que foram dispostos no dessecador. Para a eliminação da matéria mineral, os cadinhos foram incinerados em forno Mufla (500 °C/5 horas), como recomendado por Mertens (2002), mantidos em estufa não ventilada (105 °C/1 hora) e pesados (W_a e B_a) após terem atingido a temperatura ambiente em dessecador.

As amostras de soja integral em grão, composto lácteo e farinha de carne e ossos foram pré-desengorduradas com acetona, diretamente em cadinhos com filtro, com acetona, seguindo a mesma metodologia proposta por Mertens (2002), que consistiu em quatro lavagens consecutivas com 20-30 mL de acetona, mantendo-se a amostra em solução por cinco minutos, com agitações periódicas da amostra a cada um minuto. Após completa evaporação da acetona, as amostras foram transferidas dos filtros para os fracos *penicilina* com auxílio de funil de vidro e DN.

$$aFDNmo = 1000 \times (W_f - W_a - B_f + B_a) / (W_s \times ASE) \quad (3)$$

4.9. ANÁLISE DE FIBRA PELO SISTEMA ANKOM

As análises de aFDNmo em aparelho analisador de fibras da Ankom²²⁰ (Ankom® Technology, Macedon, NY) seguiram a metodologia proposta pela Ankom (ANÔNIMO, 2015), disponível em: <https://www.ankom.com/sites/default/files/documents-files/Method_13_NDF_Method_A2000_RevE_4_10_15.pdf>.

As análises foram parcialmente executadas no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG. Em função de terem sido executadas em outro laboratório distante e da logística para que três analistas executassem as análises foram conduzidas quatro repetições por alimento para este aparelho, a fim de evitar quaisquer problemas relacionados à perda de repetições.

Alíquotas de $0,5 \pm 0,0050$ g de cada alimento foram pesadas (W_s) e acondicionadas em sacos Ankom (F57 - $25 \mu\text{m}$ de porosidade), previamente pesados (W_t) e identificados com caneta adequada. A tara dos sacos foi obtida sem a pré-secagem dos mesmos, como recomendado pela Ankom (ANÔNIMO, 2015). Os sacos foram selados por calor, preservando as amostras dentro dos sacos.

As amostras de soja em grão, composto lácteo e farinha de carne e ossos foram pré-desengorduradas antes da extração, que consistiu em colocar os sacos contendo as amostras em um béquer com acetona e agitá-los por 10 vezes durante um período de 10 minutos. Em seguida, o processo foi repetido. As amostras foram extraídas com DN após a completa evaporação da acetona.

Cada rodada de extração consistiu em 20 amostras e quatro brancos, de forma que em cada rodada estivessem presentes todos os alimentos à serem analisados. Foram executadas quatro rodadas por analista.

Sacos contendo as amostras foram alocados no aparelho e, em seguida, foram adicionados 2000 mL de DN, 20 gramas de sulfito de sódio anidro ($0,83$ g/amostra) e 4 mL de α -amilase termoestável Ankom (atividade $17,400$ Liquefon Units.mL⁻¹ – FAA, Ankom Technology, Macedon, NY). O tempo total de extração foi de 75 minutos, sendo os primeiros 15 minutos para que a DN atingisse a temperatura de 100 °C. O sensor de temperatura do aparelho manteve-se em 105 °C e a pressão e agitação não foram mensuradas.

Após a extração, a solução detergente neutro foi drenada e foram conduzidas duas lavagens sequencias com água destilada fervente com agitação automática e com o aparelho aberto e adição de 4 mL de α -amilase bruta por lavagem, as quais duraram 5 minutos cada. Por fim, foi feita uma terceira lavagem sem adição de α -amilase bruta. Os sacos foram suavemente pressionados para remover o excesso de líquido, inseridos em béquer de 250 mL, para duas lavagens sequenciais com acetona, com duração de 5 minutos cada.

Os sacos foram previamente secos em estufa ventilada (65 °C/ 45 min) e secos em estufa ventilada (105 °C/4 horas), resfriados em sacos dessecantes (*MoistureStop weigh pouch*, Ankom Technology, Macedon, NY) e imediatamente pesados (W_f). Foram acondicionados cerca de quatro a cinco sacos por saco dessecante. Dessecadores não são recomendados pelo fabricante Ankom (ANÔNIMO, 2015).

Para eliminação da contaminação por matéria mineral, os sacos foram colocados em cadinhos de porcelana com tampa, previamente pesados (W_b e W_{tp}) e incinerados (500 °C/5 horas), dispostos em estufa (105 °C/1 hora) e pesados (W_a e W_{ba}).

Os teores de aFDNmo foram calculados da seguinte forma:

$$aFDNmo = 1000 \times (W_f - ((W_t \times C_1) - (W_a - W_{tp}) - (W_{ba} - W_b)) / W_s) \times ASE \quad (4)$$

Em que C_1 corresponde à média da massa dos brancos antes e após a extração e, W_{ba} e W_b correspondem às correções para queima dos sacos em branco.

4.10. ANÁLISE DE FIBRA NO SISTEMA DE EXTRAÇÃO EM SACOS FILTRANTES (SES)

As análises de aFDNmo obtidas em *System Bag Filter*, em aparelho não pressurizado, especificado como Determinador de Fibra (TE-149, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), foram conduzidas utilizando-se as mesmas recomendações utilizadas para o sistema pressurizado, devido à ausência de recomendação metodológica do fabricante. Este sistema é referido neste trabalho como SES (Sistema de Extração em Sacos).

Foram realizadas duas rodadas por analista, sendo que cada rodada consistiu em analisar uma replicata das 20 amostras, quatro brancos e seis replicatas de uma forragem para preencher a capacidade do aparelho, mantendo a mesma relação entre DN e amostra, compondo uma rodada com 30 análises.

Alíquotas de $0,50 \pm 0,0050$ g de cada amostra foram pesadas (W_s) e acondicionadas em sacos de TNT (100g.m^{-2} ; 5 por 5 cm), previamente lavados com detergente neutro, secos e pesados (W_t), após secagem em estufa ventilada ($105 \text{ }^\circ\text{C}/6$ horas) e terem atingido temperatura ambiente em saco dessecante Ankom (*MoistureStop weigh pouch*, Ankom Technology, Macedon, NY). Os sacos identificados contendo as amostras foram selados por calor, encapsulando a amostra.

Foram utilizados 3000 mL de DN (100 mL/0,5 gramas de amostra), 5 mL de α -amilase termoestável bruta da Ankom e 25 g de sulfito de sódio anidro (0,83 g/amostra) por rodada. A quantidade de DN utilizada foi a quantidade mínima que permitisse a completa cobertura de todas as amostras no interior do aparelho.

O tempo total de extração foi de 75 minutos, sendo os primeiros 15 minutos para que a DN atingisse a temperatura de 100 °C. Após a extração, a DN foi drenada e foram conduzidas duas lavagens sequenciais com água destilada fervente (3000 mL) e adição de 5 mL de α -amilase termoestável (Ankom[®]) em cada lavagem, que tiveram duração de 5 minutos cada, sob agitação vertical.

Em sequência, foi realizada uma terceira lavagem (3000 mL) apenas com água destilada, por cinco minutos, com agitação vertical. Os sacos foram suavemente prensados para remover o excesso de água residual e colocados em béquer contendo acetona e deixados imersos por 10 minutos, com agitações periódicas a cada minuto. O processo de lavagem com acetona foi repetido por uma vez. Após a evaporação da acetona, os sacos foram dispostos em estufa ventilada (55 °C/45 min), e estufa de ventilação forçada (105 °C/8 horas), colocados em sacos dessecantes e pesados em seguida (W_f).

Os sacos contendo o resíduo fibroso foram acondicionados em cadinhos de porcelana com tampa, previamente pesados (W_{tp} e W_b), incinerados (500 °C/5 horas), dispostos em dessecador e pesados (W_a e W_{ba}), para correção da contaminação por cinzas.

$$aFDNmo = 1000 \times (W_f - ((W_t \times C_1) - (W_a - W_{tp}) - (W_{ba} - W_b))) / W_s \quad (5)$$

$$\times ASE$$

Em que C_1 corresponde à média da massa dos brancos antes e após a extração e, W_{ba} e W_b correspondem às correções para queima dos sacos em branco.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.11.1. Métodos estatísticos e critérios de avaliação de modelos

Os dados da composição química dos alimentos para as variáveis Matéria Seca (MS), Matéria Seca em Laboratório (ASE), Matéria Mineral (MM), Proteína Bruta (PB), Gordura Bruta (GB), Fibra em Detergente Ácido (FDA), Lignina (Lig) e Carboidratos Não Fibrosos (CNF) foram analisados estatisticamente utilizando o programa de modelos lineares mistos

generalizados (PROC GLIMMIX) do SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA), avaliando-se as seguintes distribuições densidade de probabilidade: Normal, Gama, Beta, t-Central, LogNormal e Inversa de Gauss, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij} \quad (6)$$

Em que Y_{ij} corresponde a informação do i -ésimo alimento na j -ésima determinação; μ média geral; α_i o efeito de alimento i e e_{ij} o erro residual aleatório.

A melhor função de verossimilhança ajustada aos dados foi determinada pelo critério de informação de Akaike (AKAIKE, 1974; BURNHAM; ANDERSON, 2004) corrigido para pequenas amostras (SUGIURA, 1978) e pelas grandezas por ele geradas, de acordo com as recomendações de Vieira *et al.* (2012). Foram construídos intervalos de confiança ao nível de 99% de significância para as variáveis analisadas.

4.11.2. Análise Estatística dos Resultados Analíticos da Determinação da Fibra

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado e os diferentes métodos de extração de aFDN_{mo} foram avaliados considerando-se o esquema fatorial $5 \times 20 \times 3$, em que cinco sistemas de extração foram comparados empregando-se 20 alimentos, analisados por três diferentes analistas. Os efeitos de método de extração e de alimento foram considerados fixos, enquanto o efeito de analista considerado aleatório, conforme o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + O_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha O_{ik} + \beta O_{jk} + \alpha\beta O_{ijk} + e_{ijkl} \quad (7)$$

No qual Y_{ijkl} corresponde ao l -ésimo resultado analítico referente ao i -ésimo alimento, obtido segundo o j -ésimo sistema de extração, operado pelo k -ésimo analista; μ média geral; α_i efeito do tipo de alimento ($i=1,2,3...20$); β_j efeito do sistema de extração ($j=1,2,3,4,5$); O_k efeito de analista ($k=1,2,3$), $\alpha\beta_{ij}$ efeito da interação entre alimento i e método j ; αO_{ik} efeito da interação

entre alimento i e analista k ; βO_{jk} efeito da interação entre método j e analista k , $\alpha\beta O_{ijk}$ efeito da interação tripla entre alimento i , método j e analista k e e_{ijkl} efeito do erro aleatório.

A transformação da variável dependente foi realizada utilizando-se o método de BOX COX (PROC TRANSREG) do SAS (BOX; COX, 1964) e o valor do parâmetro λ que maximizou a função de verossimilhança foi zero, portanto, a melhor transformação foi a aplicação de logaritmos aos valores observados.

O modelo estatístico descrito pela Equação 6 foi ajustado à variável transformada por meio do procedimento de modelos mistos (PROC MIXED) do SAS, empregando-se o método de estimação de máxima verossimilhança restrita (REML) e o melhor preditor linear não viesado (BLUP, *best linear unbiased prediction*), adotando-se a seguinte função básica previsível:

$$\mu_{ijkl} = E[Y_{ijkl}|O_k, \alpha O_{ik}, \beta O_{jk}, \alpha\beta O_{ijk}]; \forall i, j \quad (8)$$

Os BLUP foram estabelecidos considerando a Ampla Inferência (*Broad Inference*), que se baseia exclusivamente sobre os efeitos fixos (alimento e método) e aleatórios (analista), e a Inferência Restrita (*Narrow Inference*), que versa na inferência baseada sobre a combinação linear de efeitos fixos e aleatórios ou funções previsíveis (alimento, método e analista), dadas pela seguinte função:

$$\mu_{ijk} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_k n_{ijk} \mu_{ijk} \quad (9)$$

Os preditores de inferência restrita (*Narrow Inference*) foram obtidos de acordo com a seguinte equação, a partir do desdobramento da Equação 9, para combinação linear de efeitos fixos e aleatórios.

$$\begin{aligned} \mu_{ijk} = \frac{1}{n_{ij}} & (n_{ij} \times \mu + n_{ij} \times \alpha_i + n_{ij} \times \beta_j + n_{ij} \times \alpha\beta_{ij} + n_{ij1} \times O_1 + n_{ij2} \\ & \times O_2 + n_{ij3} \times O_3 + n_{ij1} \times \alpha O_{i1} + n_{ij2} \times \alpha O_{i2} + n_{ij3} \times \alpha O_{i3} \\ & + n_{ij1} \times \beta O_{j1} + n_{ij2} \times \beta O_{j2} + n_{ij3} \times \beta O_{j3} + n_{ij1} \times \alpha\beta O_{ij1} \\ & + n_{ij2} \times \alpha\beta O_{ij2} + n_{ij3} \times \alpha\beta O_{ij3}) \end{aligned} \quad (10)$$

No qual n_{ij} corresponde ao número total de observações do alimento i determinadas no sistema de extração j , n_{ij1} corresponde ao número total de observações do alimento i determinadas no sistema de extração j pelo analista 1, n_{ij2} corresponde ao número total de observações do alimento i determinadas no sistema de extração j pelo analista 2, e n_{ij3} corresponde ao número total de observações do alimento i determinadas no sistema de extração j pelo analista 3.

As funções estimáveis de ampla inferência (*Broad Inference*) foram determinadas por meio da seguinte equação, obtida a partir do desdobramento da Equação 9.

$$\mu_{ijk} = \frac{1}{n_{ij.}} (n_{ij.} \times \mu + n_{ij.} \times \alpha_i + n_{ij.} \times \beta_j + n_{ij.} \times \alpha\beta_{ij} + n_{ij1} \times O_1 + n_{ij2} \times O_2 + n_{ij3} \times O_3) \quad (11)$$

Os intervalos de confiança foram comparados por meio do Teste de Comparações Múltiplas do PROC MIXED, do SAS, com auxílio do procedimento SIMULATE, adotando-se $\alpha=0,05$ (LITTELL *et al.*, 2006).

O mesmo modelo foi ajustado ao método de mínimos quadrados para se ter uma estimativa dos componentes de mínimos quadrados de acordo com o método de estimação tipo III, do SAS, a fim de obter uma visualização das estimativas obtidas com abordagem tradicionalmente feita para estimação dos componentes de variância, para avaliar a significância de efeitos fixos e aleatórios.

5. RESULTADOS

A seleção da distribuição de probabilidade de melhor qualidade de ajuste baseou-se sobre as informações de Akaike corrigido ($AICc_r$), os valores de delta (Δ_r) e a razão de evidência (ER_r) por ele gerados, demonstrados na Tabela 1. A distribuição de probabilidade de melhor ajuste foi a Normal para todas as variáveis de composição química analisadas, que apresentaram valores $0 \leq \Delta_r \leq 2$ e baixos valores de ER_r .

A escolha dos alimentos fundamentou-se nos princípios de representatividade na dieta dos animais e amplitude em composição química. Desta forma, podem ser observados alimentos volumosos e concentrados, *in natura* e fermentados ou processados por calor, que apresentaram teores mínimos, intermediários e altos para os nutrientes MS, MM, MO, PB, GB e CNF (Tabela 2), e também de aFDN_{mo} (Tabelas 5 e 6). Alimentos cujos teores de GB foram superiores a 50 g.kg⁻¹ como soja grão, composto lácteo e farinha de carne e ossos (Tabela 2), foram pré-desengordurados imediatamente antes da análise de fibra em todos os métodos de análise.

O composto lácteo apresentou valor de fibra próximo à zero, como era esperado. Por outro lado, a FCO apresentou 218,0 (184,3; 257,2) g.kg⁻¹ de aFDN_{mo}, obtido pelo método oficial em aparelho de refluxo convencional, dada a natureza da porção proteica, insolúvel em detergente neutro.

A análise de variância por meio do método de mínimos quadrados (Tipo III), com 95% de significância, mostrada na Tabela 3, apresentou resultado significativo para a quantidade de aFDN_{mo} entre alimentos, entre os métodos de determinação para um mesmo alimento e para a interação alimento*método¹, dentre os efeitos fixos. Os efeitos dos componentes de variância das interações alimento*analista, método*analista e alimento*método*analista também foram significativos. Não houve efeito significativo do componente de variância de analistas (Tabela 3).

A análise de variância, obtida por meio do método da máxima verossimilhança restrita (REML) permitiu inferir que o componente de variância não foi significativo entre os analistas, que não difere de zero ao nível de 99% de significância, no entanto, com alta variabilidade dada pela amplitude do intervalo de confiança (Tabela 4). Apesar disso, houve efeito do componente

¹ O sinal de asterisco (*) foi utilizado para denotação dos efeitos das interações entre fatores fixos e aleatórios, definidos pelo modelo estatístico.

de variância para as interações entre alimento*analista ($P=0,0046$) e também para a tripla interação alimento*método*analista ($P<0,001$) – Tabela 4. Para a interação método*analista não houve efeito significativo do componente de variância. Dentre os efeitos fixos foram constatadas diferenças significativas para o tipo de alimento ($P<0,001$), para o método de determinação ($P=0,003$) e para a interação entre alimento*método ($P<0,001$).

Os valores de BLUP obtidos para aFDN_{mo}, em todos os métodos e em todos os alimentos, não apresentaram diferenças significativas entre aqueles obtidos na inferência restrita, isto é, considerando o efeito das interações aleatórias (Equação 10) e aqueles obtidos por ampla inferência ou sem efeito destas interações (Equação 11), tendo em vista que os intervalos de confiança, com 95% de significância, se justapõem entre os dois procedimentos (Tabela 5).

Não houve diferença quanto às quantidades de aFDN_{mo} determinadas para todos os alimentos utilizados neste estudo entre os aparelhos de refluxo convencional e Fibertec, ambos recomendados como sistemas de extração pelo método oficial AOAC (Tabelas 5 e 6). O sistema Ankom não apresentou diferenças significativas para nenhum dos alimentos analisados em relação às estimativas obtidas por metodologia oficial, em sistema Fibertec ou refluxo convencional dada a comparação dos intervalos de confiança (95%), Tabelas 5 e 6.

Os sistemas analíticos SES e Autoclave não diferiram ($P>0,05$) dos métodos de referência quanto às quantidades de fibra determinadas para os alimentos cana-de-açúcar, capim elefante, casca de soja, farelo de algodão, farelo de glúten de milho, farelo de trigo, feno de alfafa, feno de azevém, feno de tifton, palha de milho, resíduo de cervejaria, serragem, silagem de milho e polpa cítrica pela análise dos intervalos de confiança obtidos pelo BLUP, na Tabela 5, ou pelo teste de comparações múltiplas demonstrado na Tabela 6.

O sistema analítico SES determinou valores de fibra maiores e diferentes do sistema Ankom, obtidos como preditores de inferência ampla ou restrita para a farinha de carne e ossos que podem ser observados pelos intervalos de confiança que não se justapõem (Tabela 5). O mesmo comportamento não foi observado pela análise dos intervalos de confiança pelo teste de comparações múltiplas, em que todos os métodos não diferem ($P>0,05$) quanto à quantidade de aFDN_{mo} obtida para a farinha de carne e ossos (Tabela 6). O sistema analítico SES apresentou maior quantidade de fibra insolúvel para o composto lácteo ($P<0,001$) em relação aos demais métodos (Tabela 6).

A quantidade de fibra para o farelo de soja foi maior e significativa para o SES em relação ao método oficial em sistema Fibertec ($P=0,039$) e para o sistema de extração da Ankom ($P<0,001$). Contudo, não diferiu daquele determinado por método oficial em refluxo

convencional ($P=0,273$) e também para a Autoclave ($P=0,974$), pelo teste de comparações múltiplas. Pelos intervalos de confiança ajustados pelos BLUP, o SES também difere do método oficial em refluxo convencional (Tabela 5). Os sistemas analíticos da Autoclave e da Ankom não diferiram dos métodos oficiais para este mesmo alimento (Tabela 6).

O método SES determinou maior valor de fibra para o milho, diferindo da metodologia oficial e também do método Ankom ($P<0,001$), contudo não diferiu do teor determinado em Autoclave ($P=0,327$), Tabela 6. Embora sem diferenças em relação ao método oficial pelo teste de comparações múltiplas ($P=0,723$), os intervalos de confiança construídos para o milho em Autoclave não apresentam sobreposição em relação àqueles do método oficial em refluxo convencional (95%). O método Autoclave apresentou maior quantidade de fibra em relação ao Ankom ($P<0,001$).

Para o sorgo, de forma similar ao milho, os métodos SES e Autoclave, que não apresentaram diferenças entre si ($P=0,999$), superestimam os valores de aFDN_{mo} em relação àqueles obtidos por metodologia oficial em aparelhos Fibertec ($P<0,001$) e refluxo ($P<0,001$) e também pelo Ankom ($P<0,001$), tanto pelos intervalos analisados utilizando-se o teste de comparações múltiplas como pelos intervalos de confiança obtidos com os preditores (BLUP).

Para a soja *in natura* o teor de aFDN_{mo} obtido por SES foi superior àqueles determinados pelo método oficial, em aparelho Fibertec ($P<0,001$) ou refluxo convencional ($P<0,001$), e também em relação ao método Ankom ($P<0,001$). Entretanto, o SES apresentou resultado semelhante ao obtido por Autoclave ($P=0,066$), que não diferiu dos métodos oficiais, em Fibertec ($P=0,980$) ou refluxo convencional ($P=0,999$) e também em relação ao Ankom ($P=0,999$) pelos intervalos de confiança analisados pelo teste de comparações múltiplas (Tabela 6). Considerando os intervalos obtidos pelos BLUP, o SES apresentou valores de aFDN_{mo} diferentes para todos os demais métodos, inclusive para o Autoclave.

Tabela 1: Critérios de informação de Akaike e grandezas matemáticas associadas.

Variável	Distribuição de Probabilidade	$AICc_r$	Δ_r	w_r	ER	θ_r
MS	Normal	-552,0	0,1	0,161	1	21
	Gama	-552,1	0,0	0,170	1	21
	Beta	-552,1	0,0	0,171	1	21
	t-Central	-552,0	0,1	0,161	1	21
	Inversa de Gauss	-552,0	0,0	0,167	1	21
	LogNormal	-552,1	0,0	0,170	1	21
ASE	Normal	-1090,5	0,0	0,167	1	21
	Gama	-1090,5	0,0	0,167	1	21
	Beta	-1090,5	0,0	0,166	1	21
	t-Central	-1090,5	0,0	0,167	1	21
	Inversa de Gauss	-1090,5	0,0	0,167	1	21
	LogNormal	-1090,5	0,0	0,167	1	21
MM	Normal	-482,0	0,0	0,244	1	21
	Gama	-482,0	0,0	0,242	1	21
	Beta	-481,9	0,0	0,240	1	21
	t-Central	-455,4	26,5	0,000	5×10^6	21
	Inversa de Gauss	-478,3	3,64	0,040	6	21
	LogNormal	-481,9	0,1	0,234	1	21
MO	Normal	-529,9	0,0	0,169	1	21
	Gama	-529,9	0,0	0,166	1	21
	Beta	-529,8	0,0	0,166	1	21
	t-Central	-529,9	0,0	0,169	1	21
	Inversa de Gauss	-529,8	0,0	0,165	1	21
	LogNormal	-529,9	0,0	0,166	1	21
PB	Normal	-344,7	0,0	0,200	1	21
	Gama	-344,7	0,0	0,201	1	21
	Beta	-344,7	0,0	0,200	1	21
	t-Central	-332,8	12,0	0,001	397	21
	Inversa de Gauss	-344,7	0,0	0,200	1	21
	LogNormal	-344,7	0,0	0,199	1	21
GB	Normal	-457,0	0	0,236	1	21
	Gama	-457,0	0,0	0,234	1	21
	Beta	-457,0	0,0	0,233	1	21
	t-Central	-457,0	0,0	0,236	1	21
	Inversa de Gauss	-383,8	73,2	0,000	$7,7 \times 10^{15}$	21
	LogNormal	-454,3	2,7	0,060	4	21
FDA	Normal	-360,1	0,0	0,203	1	21
	Gama	-360,1	0,0	0,203	1	21
	Beta	-360,0	0,0	0,200	1	21
	t-Central	-360,1	0,0	0,203	1	21
	Inversa de Gauss	-360,0	0,1	0,191	1	21
	LogNormal	-321,6	38,5	0,000	$2,2 \times 10^8$	21
Lignina	Normal	-470,0	0,0	0,377	1	21
	Gama	-470,0	0,0	0,377	1	21
	Beta	-469,2	0,8	0,247	2	21
	t-Central	-451,9	18,2	0,000	$8,8 \times 10^3$	21
	Inversa de Gauss	-408,9	61,1	0,000	$1,8 \times 10^{13}$	21
	LogNormal	-375,7	94,3	0,000	$3,0 \times 10^{20}$	21
CNF	Normal	-326,2	0,0	0,178	1,0	20
	Gama	-326,2	0,0	0,180	1,0	20
	Beta	-326,2	0,0	0,179	1,0	20
	t-Central	-326,2	0,0	0,178	1,0	20
	Inversa de Gauss	-325,7	0,4	0,144	1,3	20
	LogNormal	-325,7	0,5	0,141	1,3	20

$AICc_r$, Critério de informação de Akaike corrigido para pequenas amostras. Δ_r , diferença entre $AICc_r$ e o mínimo de $AICc_r$ no conjunto de distribuições testadas; w_r , probabilidade de verossimilhança; ER_r , razão de evidência; θ_r , número de parâmetros da distribuição.

Tabela 2: Médias e Intervalos de Confiança (IC99%: $\bar{X} \pm (LS - LI)/2$) da composição química dos alimentos.

Alimento	MS	ASE	MM	MO	PB	GB	FDA	Lig	CNF
Cana-de-açúcar	254,1±0,90	918,2±1,10	38,7±3,68	879.5±3.80	39,2±13,84	13,1±2,41	293,2±9,85	42,3±4,22	412,5±8,45
Capim Elefante	155,3±0,90	901,9±1,10	102,2±3,68	799.7±3.80	149,0±19,55	17,7±2,41	373,1±9,85	34,0±4,23	77,3±11,99
Casquinha de Soja	885,7±0,85	885,7±1,05	47,7±3,68	838.0±3.80	134,1±13,85	15,5±2,41	506,9±9,80	23,9±4,22	118,5±8,50
Composto Lácteo	953,8±0,90	953,8±1,05	66,6±3,68	887.2±3.80	194,6±13,85	144,5±3,40	3,5±9,84	3,2±4,22	591,2±12,00
Farelo de Algodão	894,0±0,85	894,0±1,05	67,7±3,68	826.3±3.85	517,7±11,30	5,6±2,41	224,0±9,80	74,0±4,22	106,8±8,46
Farelo Glúten de Milho	897,3±0,90	897,3±1,05	51,0±3,68	846.3±3.80	255,5±13,85	29,3±2,41	126,2±9,80	10,7±4,22	200,0±8,50
Farelo de Soja	879,5±0,90	879,5±1,05	67,8±3,68	811.7±3.80	552,0±13,80	13,7±2,41	92,6±9,82	5,9±4,22	224,0±8,45
Farelo de Trigo	864,6±0,90	864,6±1,05	53,4±3,68	811.2±3.80	209,2±13,85	36,7±2,41	122,5±9,85	37,3±4,23	289,7±8,50
F. de Carne e Ossos	926,3±0,90	953,0±1,05	382,8±3,65	570.2±3.80	538,6±13,85	113,4±2,40	11,4±9,84	10,1±4,22	n.a. †
Feno de Alfafa (28 d)	883,2±0,90	883,2±1,05	102,0±3,68	781.2±3.80	225,7±13,85	14,9±2,41	399,1±9,85	92,8±3,45	148,9±8,45
Feno de Azevém	900,0±0,90	900,0±1,05	65,2±3,01	834.7±3.80	106,3±13,86	7,7±2,40	466,8±9,85	59,8±4,22	34,1±8,48
Feno Tifton 85 (45 d)	888,8±0,90	888,8±1,10	65,9±3,68	822.8±3.80	111,1±13,83	9,6±2,41	393,0±9,80	52,4±3,45	23,2±8,48
Milho	874,1±0,90	874,1±1,10	10,8±3,00	863.3±3.80	86.37±13.83	42,4±2,41	29,3±9,84	3,8±4,22	761,3±8,45
Palha de Milho	898,8±0,90	898,8±1,05	21,5±3,68	877.3±3.80	22,2±13,84	3,1±2,41	464,7±9,85	40,9±4,23	50,7±8,48
Polpa Cítrica	896,9±0,90	896,9±1,10	62,2±3,01	834.7±3.85	66,2±13,84	18,6±2,41	192,8±9,80	17,6±3,45	659,3±8,50
Resíduo Cervejaria	224,5±0,90	923,7±1,05	34,6±3,68	889.2±3.80	375,6±11,30	32,7±2,41	212,2±9,85	74,8±4,22	109,6±8,45
Serragem	914,1±0,90	914,1±1,10	3,5±3,68	910.6±3.80	27,9±13,84	0,7±2,40	795,2±9,85	271,8±4,20	86,9±8,48
Silagem de Milho	306,1±0,90	894,5±1,10	63,3±3,68	831.2±3.80	99,6±13,84	19,1±2,41	277,4±9,80	32,6±4,23	328,5±8,50
Soja Grão	907,5±0,90	907,5±1,05	49,8±3,68	857.6±3.80	446,7±13,80	229,5±2,40	81,7±9,84	4,1±4,22	120,3±8,45
Sorgo	886,4±0,9	886,4±1,05	10,8±3,68	875.7±3.80	88,4±13,85	11,2±2,40	43,2±9,84	5,2±4,22	797,3±8,45

MS=Matéria Seca em g.kg⁻¹ da Matéria Natural; ASE=Matéria Seca em Laboratório (g.kg⁻¹ da MS); PB=Proteína Bruta (g.kg⁻¹ da MS); GB=Gordura Bruta (g.kg⁻¹ da MS); MO=Matéria Orgânica (g.kg⁻¹ da MS); FDA=Fibra em Detergente Ácido (g.kg⁻¹ da MS); Lig=Lignina em Ácido Sulfúrico (g.kg⁻¹ da MS), CNF=Carboidratos Não Fibrosos (CNF=1000-PB-GB-MM-aFDNmo, em g.kg⁻¹ da MS). Os valores foram apresentados como: \bar{X} média; LS como limite superior e LI limite inferior do Intervalo de Confiança com 99% de significância.

n.a. † - não aplicável.

Tabela 3: Estimativas dos componentes de variância (Var) para efeitos aleatórios e funções quadráticas (Q) para os efeitos fixos, obtidos por meio do procedimento de estimação Tipo III, considerando-se os métodos dos mínimos quadrados para as variâncias.

Fonte	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Quadrado Médio Esperado	Erro	GL Erro	F-valor	Pr>F
Alimento	19	472,28	24,8568	$\text{Var}(\text{Residual})+2,2824 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$ $+ 11,412 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{A})+ \text{Q} (\text{AL}, \text{AL}\times\text{M})$	$0,9989 \text{ MS}(\text{AL}\times\text{A}) + 0,0011 \text{ MS}(\text{Residual})$	38,01	445,28	<0,0001
Método	4	4,99	1,2471	$\text{Var}(\text{Residual}) + 2,3811 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$ $+47,622 \text{ Var}(\text{M}\times\text{A})+\text{Q} (\text{M}, \text{AL}\times\text{M})$	$0,9995 \text{ MS}(\text{M}\times\text{A}) + 0,0005 \text{ MS}(\text{Residual})$	8,00	11,78	0,002
Alimento e Método	76	12,07	0,1588	$\text{Var}(\text{Residual})+ 2,3891 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$ $+ \text{Q}(\text{AL}\times\text{M})$	$0,9966 \text{ MS}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A}) + 0,0034 \text{ MS}(\text{Residual})$	152,5	7,36	<0,0001
Analista	2	0,82	0,4102	$\text{Var}(\text{Residual})+2,2806 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$ $+ 45,613 \text{ Var}(\text{M}\times\text{A}) + 11,403 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{A})$ $+ 228,06 \text{ Var}(\text{A})$	$0,9982 \text{ MS}(\text{AL}\times\text{A}) + 0,9573 \text{ MS}(\text{M}\times\text{A}) -$ $0,9513 \text{ MS}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A}) - 0,0041 \text{ MS}(\text{Residual})$	13,61	3	0,0831
Alimento e Analista	38	2,12	0,0559	$\text{Var}(\text{Residual})+2,2849 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$ $+ 11,424 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{A})$	$0,9531 \text{ MS}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A}) + 0,0469 \text{ MS}(\text{Residual})$	159,12	2,65	<0,0001
Método e Analista	8	0,85	0,1060	$\text{Var}(\text{Residual})+2,3823 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$ $+ 47,646 \text{ Var}(\text{M}\times\text{A})$	$0,9937 \text{ MS}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A}) + 0,0063 \text{ MS}(\text{Residual})$	152,91	4,92	<0,0001
Alimento, Método e Analista	152	3,29	0,0216	$\text{Var}(\text{Residual})+2,3973 \text{ Var}(\text{AL}\times\text{M}\times\text{A})$	$\text{MS}(\text{Residual})$	441	2,12	<0,0001
Residual	441	4,50	0,0102	$\text{Var}(\text{Residual})$				

Pr>F teste para significância da variância;

Var variância; AL alimento; M método; A corresponde ao analista; Q função quadrática; MS quadrado médio; GL grau de liberdade.

Tabela 4: Estimativas dos componentes de variância para os efeitos de analista e suas interações e respectivos Intervalos de Confiança com nível de significância de 99%, obtidos pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML).

Parâmetro	Estimativa	SE	Pr > Z	IC	
				LI	LS
Analista	0,001183	0,001793	0,2547	0,000138	131,23
Alimento*Analista	0,002748	0,001056	0,0046	0,001215	0,00969
Método*Analista	0,001845	0,001155	0,0550	0,000556	0,02154
Alimento*Método*Analista	0,004529	0,001112	<0,0001	0,002596	0,00943
Residual	0,01038	0,000711	<0,0001	0,008756	0,01247

Em que: SE erro padrão; IC corresponde ao intervalo de confiança com $\alpha=0,01$; LI o Limites Inferior e LS o Limite Superior.

Tabela 5: Médias, Erro Padrão (SE) e Intervalos de Confiança (IC95%: Limite Inferior; Limite Superior) para os teores de aFDN_{mo}, em g.kg⁻¹ da MS, obtidos em cada método de análise, considerando-se a presença (restrita) ou ausência (ampla) dos efeitos de interações.

Alimento	Método									
	Fibertec		Refluxo Convencional		Autoclave		Ankom		SES	
	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)
Cana-de-açúcar										
Restrita	500,4 (1,08)	427,6; 585,0	495,1 (1,08)	422,3; 580,0	487,6 (1,08)	417,4; 569,2	465,1 (1,07)	401,0; 538,9	495,7 (1,08)	423,6; 579,6
Ampla	500,6 (1,07)	432,3; 579,2	496,5 (1,07)	428,7; 574,4	488,2 (1,07)	422,7; 563,3	464,7 (1,07)	406,2; 531,3	492,5 (1,07)	425,3; 569,9
Capim Elefante										
Restrita	641,5 (1,08)	548,9; 749,0	651,6 (1,08)	556,7; 762,3	645,5 (1,08)	552,4; 753,6	637,8 (1,07)	550,9; 737,9	652,7 (1,08)	558,6; 762,1
Ampla	652,1 (1,07)	563,9; 753,5	655,7 (1,07)	567,1; 757,7	647,9 (1,07)	560,3; 748,7	639,4 (1,07)	559,8; 729,9	649,3 (1,07)	561,5; 750,4
Casca de Soja										
Restrita	690,7 (1,08)	591,3; 806,2	682,5 (1,08)	583,2; 798,2	723,7 (1,08)	619,6; 844,6	667,6 (1,07)	576,8; 772,2	672,4 (1,08)	575,6; 785,0
Ampla	691,5 (1,07)	598,2; 798,9	684,1 (1,07)	591,8; 790,5	724,6 (1,07)	627,0; 837,0	668,0 (1,07)	585,0; 762,4	669,4 (1,07)	579,0; 773,5
C. Lácteo										
Restrita	7,6 (1,08)	3,8; 12,0	4,5 (1,08)	1,0; 8,6	4,6 (1,08)	1,1; 8,6	-0,4 (1,07)	-2,9; 2,6	36,1 (1,08)	28,3; 45,2
Ampla	7,6 (1,07)	4,0; 11,6	4,6 (1,07)	1,4; 8,3	4,7 (1,07)	1,4; 8,4	-0,3 (1,07)	-2,7; 2,4	35,7 (1,07)	28,4; 44,2
F. de Algodão										
Restrita	279,4 (1,08)	238,8; 326,3	293,7 (1,08)	249,9; 344,6	300,5 (1,08)	256,4; 351,7	272,8 (1,07)	234,1; 317,3	334,7 (1,08)	285,1; 392,4
Ampla	279,8 (1,07)	241,9; 323,2	294,4 (1,07)	253,9; 340,9	300,9 (1,07)	259,6; 348,4	273,0 (1,07)	237,6; 313,2	332,6 (1,07)	286,4; 385,9
F. G. de milho										
Restrita	467,5 (1,08)	399,3; 546,7	464,3 (1,08)	396,7; 543,0	449,2 (1,08)	384,3; 524,6	442,4 (1,07)	381,4; 512,8	481,2 (1,08)	411,1; 562,7
Ampla	467,8 (1,07)	403,8; 541,4	464,1 (1,07)	401,8; 535,6	448,6 (1,07)	388,3; 517,9	444,5 (1,07)	388,4; 508,2	475,2 (1,07)	410,2; 549,9
Farelo de Soja										
Restrita	136,5 (1,08)	115,2; 161,0	140,1 (1,08)	117,5; 166,5	157,8 (1,08)	132,9; 186,7	116,9 (1,07)	98,8; 137,7	212,6 (1,08)	180,1; 250,4
Ampla	134,3 (1,07)	114,8; 156,7	142,5 (1,07)	121,1; 167,0	158,8 (1,07)	135,3; 185,8	114,9 (1,07)	98,6; 133,4	206,8 (1,07)	177,1; 241,1

Tabela 5: Continuação

Alimento	Método									
	Fibertec		Refluxo Convencional		Autoclave		Ankom		SES	
	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)
Farelo de Trigo										
Restrita	403,9 (1,08)	347,4; 469,0	410,0 (1,08)	350,2; 479,5	405,2 (1,08)	348,0; 471,3	392,4 (1,07)	339,0; 453,8	426,0 (1,08)	364,6; 497,1
Ampla	405,7 (1,07)	350,9; 468,7	411,0 (1,07)	354,5; 476,1	407,0 (1,07)	352,1; 470,1	392,2 (1,07)	342,5; 448,8	423,4 (1,07)	365,2; 490,3
F. Carne e Ossos										
Restrita	254,0 (1,08)	216,3; 297,7	218,0 (1,08)	184,3; 257,2	203,2 (1,08)	172,0; 239,5	191,7 (1,08)	163,5; 224,2	271,1 (1,08)	228,8; 320,5
Ampla	254,8 (1,07)	219,4; 295,4	218,5 (1,07)	187,2; 254,5	204,1 (1,07)	174,7; 237,9	191,8 (1,07)	166,0; 221,2	269,6 (1,08)	230,1; 315,4
Feno de Alfafa										
Restrita	510,1 (1,08)	436,0; 596,3	487,9 (1,08)	416,1; 571,6	520,9 (1,08)	445,3; 609,0	489,8 (1,07)	422,5; 567,3	532,5 (1,08)	455,2; 622,3
Ampla	516,0 (1,07)	445,7; 597,0	508,6 (1,07)	439,2; 588,4	518,6 (1,07)	448,0; 599,9	494,4 (1,07)	432,4; 565,0	523,2 (1,07)	452,0; 605,2
Feno de Azevém										
Restrita	776,7 (1,08)	667,1; 903,8	782,1 (1,08)	670,5; 911,7	776,6 (1,08)	667,0; 903,7	767,0 (1,07)	665,1; 884,2	776,8 (1,08)	670,3; 899,7
Ampla	778,8 (1,07)	674,0; 899,4	786,7 (1,07)	680,8; 908,4	778,8 (1,07)	674,0; 899,4	767,7 (1,07)	672,6; 875,8	773,2 (1,07)	669,2; 893,0
Feno de Tifton 85										
Restrita	763,8 (1,08)	654,2; 891,2	781,1 (1,08)	671,0; 908,7	767,8 (1,08)	657,6; 895,9	765,6 (1,07)	661,9; 885,1	767,3 (1,08)	657,1; 895,3
Ampla	773,1 (1,07)	669,1; 892,9	790,2 (1,07)	687,7; 907,5	782,1 (1,07)	676,9; 903,1	760,6 (1,07)	666,4; 867,7	767,6 (1,07)	664,3; 886,5
Milho										
Restrita	105,8 (1,08)	89,0; 125,2	97,9 (1,08)	81,8; 116,5	146,2 (1,08)	123,3; 172,7	81,0 (1,07)	67,9; 96,2	212,2 (1,08)	180,3; 249,3
Ampla	107,0 (1,07)	90,4; 126,2	99,0 (1,07)	83,7; 116,6	148,6 (1,07)	126,5; 174,0	81,7 (1,07)	69,3; 95,8	213,8 (1,07)	183,1; 249,1
Palha de Milho										
Restrita	906,6 (1,08)	777,0; 1057,3	903,5 (1,08)	772,9; 1055,7	890,9 (1,08)	763,4; 1039,0	886,0 (1,07)	766,3; 1023,9	899,3 (1,08)	770,7; 1048,8
Ampla	902,5 (1,07)	781,5; 1041,8	902,5 (1,07)	781,5; 1041,8	893,6 (1,07)	773,8; 1031,5	883,2 (1,07)	774,1; 1007,1	882,2 (1,07)	763,8; 1018,4

Tabela 5: Continuação

Alimento	Método									
	Fibertec		Refluxo Convencional		Autoclave		Ankom		SES	
	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)	Média (SE)	IC (LI; LS)
Polpa Cítrica										
Restrita	196,1 (1,08)	165,9; 231,2	194,2 (1,08)	164,3; 229,0	203,4 (1,08)	172,1; 239,7	192,9 (1,07)	164,8; 225,3	227,8 (1,08)	193,2; 268,2
Ampla	195,4 (1,07)	167,1; 227,9	193,8 (1,07)	166,3; 225,4	212,7 (1,07)	182,1; 247,8	195,0 (1,07)	169,0; 224,5	219,2 (1,07)	187,8; 255,3
Res. Cervejaria										
Restrita	452,1 (1,08)	387,2; 527,5	448,7 (1,08)	382,4; 525,9	474,6 (1,08)	405,4; 555,1	459,7 (1,07)	396,4; 532,7	497,6 (1,08)	425,2; 581,8
Ampla	451,4 (1,07)	390,8; 521,1	452,3 (1,07)	390,3; 523,6	476,4 (1,07)	411,3; 551,3	458,5 (1,07)	400,7; 524,2	493,4 (1,07)	426,0; 570,9
Serragem										
Restrita	882,9 (1,08)	758,8; 1026,8	879,4 (1,08)	752,2; 1027,5	883,2 (1,08)	756,9; 1030,2	846,8 (1,07)	732,3; 978,7	859,4 (1,08)	736,5; 1002,5
Ampla	880,0 (1,07)	764,1; 1013,0	880,9 (1,07)	762,7; 1016,9	882,7 (1,07)	764,3; 1019,0	845,1 (1,07)	740,7; 963,9	852,7 (1,07)	738,2; 984,4
Silagem de Milho										
Restrita	468,5 (1,08)	401,2; 546,4	487,0 (1,08)	415,3; 570,5	469,6 (1,08)	402,3; 547,8	454,2 (1,07)	391,6; 526,4	467,5 (1,08)	399,3; 546,8
Ampla	469,2 (1,07)	406,2; 541,5	489,5 (1,07)	422,7; 566,5	470,8 (1,07)	407,6; 543,3	453,4 (1,07)	396,3; 518,4	465,6 (1,07)	401,9; 538,9
Soja Grão										
Restrita	124,2 (1,08)	104,0; 147,7	154,8 (1,08)	130,4; 183,2	158,9 (1,08)	133,9; 188,0	140,9 (1,08)	119,3; 165,8	252,9 (1,08)	214,8; 297,3
Ampla	123,3 (1,07)	104,5; 144,9	153,7 (1,07)	131,3; 179,4	161,2 (1,07)	137,4; 188,6	138,3 (1,07)	119,0; 160,3	245,0 (1,07)	210,2; 285,0
Sorgo										
Restrita	101,7 (1,08)	85,2; 120,7	93,2 (1,08)	77,5; 111,5	203,2 (1,08)	173,5; 237,5	81,1 (1,07)	68,0; 96,1	257,7 (1,08)	220,6; 300,6
Ampla	100,0 (1,07)	84,6; 117,8	92,4 (1,07)	77,6; 109,3	201,0 (1,07)	173,1; 233,0	80,6 (1,07)	68,5; 94,4	249,9 (1,07)	214,5; 290,7

Em que: SE erro padrão; IC (LI; LS) corresponde ao Intervalo de Confiança, sendo LI o Limite Inferior e LS o Limite Superior.

Os dados foram analisados por meio do PROC MIXED considerando o modelo estatístico da Equação 6 e as Equações 10 e 11, para as inferências restrita e ampla, respectivamente.

Tabela 6: Teores de matéria orgânica fibrosa em detergente neutro tratada com amilase (aFDNmo), em g.kg⁻¹ da Matéria Seca, obtidos em cinco diferentes sistemas de extração.

Alimento	aFDNmo				
	Método de Análise				
	Fibertec (AOAC)	Refluxo (AOAC)	Autoclave Pell e Schofield	Ankom (Ankom)	SES
Cana-de-açúcar	500,6	496,5	488,8	464,7	492,5
Capim Elefante (1,70 m)	652,1	655,7	647,9	639,4	649,3
Casquinha de Soja	691,5	684,1	724,6	668,0	669,4
Composto Lácteo	7,5 a	4,6 a	4,7 a	-0,3 a	35,7 b
Farelo de Algodão	280,2	294,8	301,0	273,0	332,6
Farelo de Glúten de Milho	467,8	464,7	449,1	444,5	475,2
Farelo de Soja	134,5 b	142,5 ab	158,7 ab	114,9 b	206,8 a
Farelo de Trigo	405,1	411,0	407,2	392,2	423,4
Farinha Carne e Ossos	255,1	218,5	204,0	191,9	269,5
Feno de Alfafa (28 d)	516,0	508,6	518,6	494,4	523,2
Feno de Azevém	778,8	786,7	778,8	767,7	773,2
Feno de Tifton 85 (45 d)	773,1	791,2	782,0	760,6	767,6
Milho	107,0 bc	99,2 bc	148,6 ab	81,8 c	213,8 a
Palha de Milho	902,5	902,5	893,6	883,2	882,2
Polpa Cítrica	195,4	194,0	212,7	195,0	219,2
Resíduo cervejaria	452,0	452,3	476,4	458,5	493,4
Serragem	880,9	880,8	882,7	845,1	852,7
Silagem de Milho	469,8	489,5	470,9	453,4	465,6
Soja Grão	123,3 b	153,9 b	161,2 ab	138,4 b	244,9 a
Sorgo	100,2 b	92,4 b	201,3 a	80,6 b	249,9 a

Médias seguidas por letras diferentes em uma mesma linha diferem entre si pelo Teste de Comparações Múltiplas de Médias, com auxílio do procedimento SIMULATE, adotando-se $\alpha=0,05$.

6. DISCUSSÃO

Diferenças na composição química dos alimentos eram esperadas tendo em vista que objetivou-se compor o banco de amostras com amplitude dos teores de nutrientes, o que permitiria analisar não todas, mas algumas das possíveis interações da concentração de um determinado nutriente sobre a análise de aFDN_{mo} (MERTENS, 2002; 2003) nos diferentes métodos de extração. Interações importantes correspondem àquelas em que os alimentos contêm alto teor de proteína, especialmente no caso de alimentos processados por calor, ou nos alimentos com alto teor de gordura bruta ou alto conteúdo de CNF, especialmente amido (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985; MERTENS, 2002). O amido, em grande quantidade, como nos alimentos milho e sorgo, é de difícil solubilização durante a extração, o que pode superestimar a quantidade de fibra em relação ao valor de convergência se o método oficial (AOAC 2002.04) não é seguido exatamente, ou no caso de métodos alternativos para estes alimentos.

Para a polpa cítrica foram determinadas quantidades semelhantes de aFDN_{mo} ($194,2 \pm 32,35 \text{ g.kg}^{-1}$ da MS) e FDA ($192,8 \pm 9,80 \text{ g.kg}^{-1}$ da MS). Este tipo de resultado é relativamente comum quando não são conduzidas análises de forma sequencial para a fibra em detergente ácido, pois grande parte da pectina solubilizada pelo detergente neutro é insolúvel em detergente ácido, sendo assim contabilizada como FDA (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985; MERTENS, 2003). O NRC (2001) apresenta valores igualmente próximos de FDN (tratada com amilase e sulfito de sódio) e FDA, de 242,0 e 222,0 g.kg^{-1} da MS, respectivamente.

A análise de fibra para a FCO no método oficial foi possível devido ao emprego de auxiliar de filtragem, no caso, areia. Sem a adoção deste recurso a filtragem do material é praticamente inexequível. Essa observação foi constatada no estudo de familiarização conduzido por Mertens (2002) que incluiu no método oficial a utilização de *filter aid* para este tipo de alimento. A quantidade de aFDN_{mo} determinada para a FCO em aparelho de refluxo convencional foi de 218,0 ($184,3; 257,2$) g.kg^{-1} da MS, valor superior à quantidade de aFDN_{mo} de 195,0 g.kg^{-1} da MS determinada no estudo colaborativo (MERTENS, 2002). Esta quantidade de fibra é decorrente da proteína insolúvel em detergente neutro. A escolha deste tipo de alimento deve-se apenas ao fato deste ser um alimento extremamente difícil de analisar (MERTENS, 2002).

Considerando o efeito significativo do componente de variância da tripla interação de analista*método*alimento é possível inferir que a execução do analista interfere de forma direta

para resultado analítico da aFDN_{mo}. A estimativa do componente de variância da tripla interação correspondeu a 22% da variação observada para os resultados.

Da mesma forma, as interações entre alimento*analista (REML e Tipo III) e método*analista (Tipo III) permitem inferir que o analista influencia o resultado analítico de acordo com o tipo de alimento analisado ou de acordo com o tipo de método empregado. Alimentos com alto teor de gordura, alto teor de amido ou mesmo para aquele que demanda a utilização de areia como auxiliar de filtração (*filter aid*), como a FCO, podem ter contribuído para estes resultados. Estes alimentos exigem mais etapas e cuidados na análise, e as modificações do método original, padronizadas por Mertens (2002), foram justamente para melhorar a aplicabilidade e reprodutibilidade do método para este tipo de alimento. Neste ponto, quando os métodos exigem mais etapas, a precisão é mais dificilmente alcançada. Contudo, não seria possível prescrever um único método de fibra insolúvel em detergente neutro para todos os tipos de alimentos se não fossem acomodadas estas modificações (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985).

No caso específico de amostras que precisam ser pré-desengorduradas, esta etapa é minuciosa, principalmente quando é empregado o *filter aid* (auxiliar de filtração). A pré-extração de amostras com alto teor de lipídeos por métodos que causam aquecimento não são recomendados, pois podem danificá-las devido à possível alteração dos conteúdos de lignina, proteínas insolúveis e hemicelulose (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985). Mertens (2002) relatou a ausência de efeito significativo para amostras pré-desengorduradas em relação às duplicatas analisadas *in natura*. Todavia, recomendou a pré-extração como forma de melhorar a reprodutibilidade da análise, com redução do desvio padrão relativo para este tipo de alimento. De forma similar, nos estudos conduzidos pelo autor, foram observados efeitos de interação alimento*laboratório para alimentos com alto teor de gordura (MERTENS, 2002).

É possível inferir que houve pelo menos uma determinação em um método de análise, influenciada de forma direta pelo analista por meio do resultado significativo para o componente de variância da interação método*analista (Tipo III). Métodos empíricos oferecem maiores dificuldades em atingir um valor exato (MERTENS, 2002). Sob esta visão, o método de fibra exige uma série de etapas, detalhadas neste trabalho, recomendadas como forma de melhorar as etapas de lavagens e filtrações, modificadas inúmeras vezes ao longo dos anos. É justamente nestes passos que o analista deve concentrar maior atenção, pois foram desenvolvidos com base nas dificuldades do método original para alimentos concentrados. Uma delas, por exemplo, é o fato de manter o cadinho aquecido durante a filtração do resíduo, que implica em melhor filtração e solubilização para alimentos com alta concentração de amido.

Os erros sistemáticos em análises químicas podem ser de três tipos: instrumentais, metodológicos ou pessoais (SKOOG *et al.*, 2006). Os erros inerentes aos métodos podem usualmente ser detectados através da comparação com resultados obtidos com aqueles de métodos independentes e referenciais (SKOOG *et al.*, 2006), no presente caso, com o método AOAC 2002.04, ou pela análise de um material de referência, que para a FDN não é possível (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985; MERTENS, 2003). Como amostras de referência de fibra dietética podem ser utilizadas amostras “do laboratório” (MERTENS, 2002). Para a confecção destas amostras é importante que sejam obtidas em maior quantidade e que sejam cuidadosamente armazenadas para evitar a variação da composição química resultante de processo de deterioração.

Erros sistemáticos inerentes aos analistas são reduzidos por meio de treinamento e familiarização aos métodos. No caso específico da fibra, analistas devem seguir rigorosamente o método, dada sua natureza empírica, elaborado segundo a sua definição nutricional (HORWITZ *et al.*, 1990; MERTENS, 2002).

A grande variabilidade das análises de fibra deve-se ao fato de que os analistas ou laboratórios frequentemente adaptam a metodologia para aumentar a eficiência da análise e economizar tempo (MERTENS, 1992). Estas modificações foram relatadas por Hristov *et al.* (2010), que avaliaram a variabilidade nas análises de aFDN por meio de um *ringtest*, nos Estados Unidos, constatando maior variabilidade para alimentos de baixa fibra. Os laboratórios participantes foram interrogados quanto ao tipo de moagem, massa de amostra, DN, quantidade e tempo de adição de α -amilase e também de sulfito de sódio, métodos de pesagem e secagem, entre outros procedimentos empregados nas análises, o que permitiu evidenciar alta variação nos procedimentos analíticos entre os laboratórios, e por fim, enfatizaram a necessidade de que os laboratórios devem seguir exatamente o método oficial.

Neste sentido, uma das indicações para utilização da Espectroscopia de Reflectância do Infravermelho Proximal (NIRS), uma ferramenta prática e rápida, é que após criterioso processo de calibração, seu uso poderia resultar em maior precisão entre laboratórios (repetibilidade) nas avaliações de composição química, em função da sua natureza preditiva baseada sobre a estrutura molecular do alimento, diminuindo a dependência de métodos empíricos para análises de rotina, sujeitos às condições laboratoriais de execução, tais como reagentes, analistas, laboratório, entre outros. Contudo, o uso do NIRS apresenta a dependência de calibração com base em amostras representativas da população de interesse. A calibração consiste em estabelecer uma relação matemática entre a informação de absorção espectral obtida com NIRS e o resultado analítico determinado por meio do método laboratorial referencial para um

conjunto de amostras representativas da população de interesse (Prof. Marcelo Teixeira – comunicação pessoal).

O efeito significativo para interação entre alimento*método observado neste estudo é pertinente às análises de alimentos com baixos teores de aFDN_{mo} como para o composto lácteo, milho, farelo de soja, soja e sorgo. Os valores de aFDN_{mo} obtidos para estes alimentos no sistema de extração em sacos (SES) foram superiores àqueles determinados em aparelhos do método oficial, assim como no método de Micro-FDN que superestimou a concentração de fibra do sorgo grão.

Os aparelhos de refluxo convencional e Fibertec não apresentaram diferenças entre os teores de aFDN_{mo} determinados para nenhum dos alimentos utilizados neste estudo, da mesma forma que os resultados obtidos no estudo colaborativo realizado por Mertens (2002), que recomendou o Fibertec como aparelho alternativo na análise de fibra. O mesmo resultado foi constatado por Hiraoka *et al.* (2012), no Japão, mas estes autores empregaram uma adaptação do método AOAC 2002.04, que consistiu em utilizar a segunda adição da solução de trabalho de α -amilase imediatamente após o refluxo, isto é, antes da primeira lavagem.

Entretanto, convenientemente, o sistema convencional de refluxo é mais prático para a execução das análises. No Fibertec são necessárias mais lavagens do resíduo e o uso de seringa (60 mL) com agulha longa (10 cm), como sugeriu Mertens (2002), para desalojar os resíduos aderidos aos condensadores e acomodar toda a amostra no cadinho filtrante após o processo de extração. No aparelho de refluxo convencional, o fácil acesso às partículas aderidas ao béquer apresenta-se como vantagem em relação ao refluxo em cadinhos. Ainda, o custo de manutenção deste aparelho, no Brasil, é substancial. No entanto, para análises sequenciais do sistema detergente, este aparelho é mais prático (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985).

O método Ankom de análises, não avaliado no estudo colaborativo de Mertens (2002), não diferiu dos valores de convergência determinados por metodologia oficial (AOAC 2002.04) para os alimentos utilizados neste estudo. As determinações de fibra no método Ankom seguiram a metodologia recomendada pela empresa que idealizou o sistema (ANÔNIMO, 2015).

As quantidades de enzima α -amilase (0,5 mL/amostra), sulfito de sódio (0,83 g/amostra) e detergente neutro (83 mL/amostra) utilizados no sistema Ankom possivelmente não foram limitantes para obter adequada extração de amido ou de contaminantes proteicos e, portanto, determinação de valores de fibra semelhantes àqueles obtidos com o método AOAC 2002.04. Estes resultados diferem de outras publicações que reportaram que o sistema Ankom de análise de fibras não é recomendado para análise do milho, como no estudo de Bartolassi *et al.* (2002)

e também na análise de fezes, forrageiras e concentrados como constatado no estudo de Barbosa *et al.* (2015), que avaliaram o Ankom em comparação ao método oficial AOAC. 2002.04.

Os resultados observados corroboram aqueles constatados por Ferreira e Mertens (2007), que avaliaram o Ankom em relação ao método oficial AOAC 2002.04, em 33 amostras de silagem de milho e não observaram diferenças nas concentrações de aFDN obtidas com esta técnica. Os autores determinaram as diferenças entre seis tratamentos, que consistiram no uso do sulfito (FDN), adoção de α -amilase (RDN – resíduo em detergente neutro) e adição de ambos (aFDN) em dois sistemas de extração, com uso de cadinhos ou sacos filtrantes e no Ankom empregaram as recomendações da Ankom (ANÔNIMO, 2015). A ausência de efeito do Ankom em relação ao método AOAC 2002.04 poderia estar baseada no emprego de reagentes em quantidades recomendadas pelo fabricante do Ankom. Mas para confirmar esta hipótese mais estudos são necessários, comparando com o emprego de reagentes nas mesmas proporções do método oficial (AOAC 2002.04).

Um aspecto que possivelmente tenha contribuído para os resultados obtidos no Ankom refere-se à pesagem das amostras após a extração em sacos dessecantes, tal como é recomendada pela metodologia Ankom (KOMAREK, 1994; ANÔNIMO, 2015), que enfatiza que dessecadores convencionais não são adequados na análise de aFDN. Isso deve-se ao fato de que dessecadores podem não ser eficientes quando se trabalha com um grande número de sacos. Esses sacos dessecantes permitem a expulsão de ar durante o procedimento individual de pesagem.

A ausência de efeito significativo para o Ankom também foi observada no estudo de Hristov *et al.* (2010). Os autores conduziram um *ringtest* com 14 laboratórios, nos Estados Unidos, para avaliar a variabilidade na análise de fibra em detergente neutro (aFDN) entre laboratórios. Os autores verificaram que os resultados de aFDN entre os sistemas convencional em refluxo e Ankom não diferiram ($P=0,62$) para os 14 laboratórios participantes. Entretanto, observaram que houve diferença entre laboratórios dentro da mesma técnica ($P<0,001$) e maior incidência de *outliers* para o método Ankom, que podem resultar em valores extremamente altos ou baixos. Os autores reportaram a maior variabilidade e dificuldade nas análises de aFDN para alimentos concentrados contendo amido.

A principal vantagem do sistema Ankom consiste na redução do tempo de execução de análises em função de ser menos minucioso, dispensar a transferência do resíduo fibroso ao cadinho filtrante e também pelo fato das amostras serem processadas em conjunto, totalizando 24 determinações (23 amostras mais um branco) por rodada. Mas, ainda assim, não se deve negligenciar que aparelhos convencionais de refluxo são recomendados como método

referencial AOAC, e devem ser utilizados como padrão para checar as análises obtidas com outros métodos, bem como na determinação de lignina, por exemplo, pelo método oficial (AOAC. 973.18), que emprega cadinho filtrante (MÖLLER, 2009). Contudo, no método Ankom recomenda-se a utilização de sacos F57, que são importados e descartáveis. Atualmente, o custo desse tipo de saco, sem despesa relativa ao transporte, corresponde à US\$ 1,20 a unidade.

As determinações de aFDN_{mo} para alimentos forrageiros obtidas em autoclave (Micro-FDN) neste estudo corroboram o método original de Pell e Schofield (1993), validado para amostras de forragens, com determinações compatíveis ao método oficial. Para as amostras de subprodutos e concentrados, com exceção do sorgo grão ($P < 0,001$), o método de autoclave modificado pela adoção de amilase e sulfito de sódio não apresentou diferenças para o método oficial AOAC. 2002.04.

O método original da autoclave, de Pell e Schofield (1993), não foi validado pelos autores para alimentos concentrados e, também, não empregava o uso de α -amilase, sulfito de sódio e exclusão das cinzas para nenhuma das amostras de forragem analisadas. O teor de aFDN_{mo} para o sorgo determinado em autoclave diferiu daqueles de convergência observados para o método oficial (AOAC 2002.04), o que pode ser atribuído à contaminação por amido. Para o milho, a soja grão e farelo de soja, o método autoclave, embora sem efeito significativo para o método oficial, não diferiu dos valores de fibra encontrados para o SES, que foram superiores e diferentes do método oficial.

O sorgo possui elevado teor de CNF ($797,30 \pm 8,45$), com alta quantidade de amido (65 a 75%) (ANDRIGUETTO *et al.*, 1985). O amido é frequentemente o componente de difícil solubilização na análise de fibra e o emprego de α -amilase é necessário para auxiliar sua remoção (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985). Elevados teores de aFDN_{mo} têm sido relacionados ao emprego de quantidades insuficientes da enzima, baixas temperaturas do DN durante a extração que resultam na ausência de agitação das partículas ou baixa temperatura da água destilada nas lavagens, que pode comprometer a remoção do detergente neutro e extratos solúveis (MERTENS, 2002). A temperatura de extração (100 °C) e adição de amilase utilizadas no sistema Autoclave não foram limitantes para extração de amido, já que a quantidade da enzima foi superior àquela do método oficial, porém difere em relação à forma como a enzima α -amilase é adicionada à amostra, imediatamente antes do aquecimento do DN. A adição de amilase após o aquecimento da amostra no sistema oficial tem sido recomendada como forma de melhorar a efetividade da enzima na remoção do amido já gelatinizado e também para inativar possíveis enzimas fibrolíticas que podem estar presentes no extrato bruto da enzima α -

amilase (MERTENS, 2002). Entretanto, para o Ankom, em ambiente pressurizado, em que foi utilizada a mesma quantidade, marca e forma de adição da enzima, os valores de aFDNmo observados foram iguais àqueles do método oficial. Outro aspecto que diferencia este método de extração de Micro-FDN dos demais consiste no uso de etanol e acetona ao invés da dupla lavagem com acetona.

O método da Autoclave é realizado em tubos do tipo *penicilina* e são utilizados 100 mg de amostra e 20 mL de DN. O principal problema em reduzir o tamanho da amostra reside na dificuldade de executar uma amostragem representativa. Além disso, frascos menores de extração podem comprometer suficiente agitação de partículas, o que poderia contribuir para maior erro das determinações (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985). No aparelho autoclave existe a limitação de visualizar e manusear as amostras tal como é possível nos aparelhos refluxo convencional ou Fibertec. Nestes aparelhos é possível também controlar a agitação das partículas e retornar partículas suspensas na parede do béquer para a solução. A agitação de partículas em função da ebulição do DN sob refluxo é uma das recomendações do método oficial (MERTENS, 2002). Deste modo, há a possibilidade de que a ausência de agitação de partículas (devido à pressurização) ou partículas que permaneçam suspensas na parede dos frascos possam interferir no processo de extração na Autoclave, causando maiores valores de fibra, o que poderia explicar a maior quantidade do analito para o sorgo, como tem sido observado para alimentos concentrados (Barbosa *et al.*, 2015).

O método Micro-FDN é de fato convenientemente rápido e permite muitas determinações em um único dia (PELL; SCHOFIELD, 1993), além do fato de aparelhos autoclaves serem relativamente comuns em laboratórios (SENGER *et al.*, 2008) e fáceis de manusear. Contudo, o filtro recomendado pelos autores (PELL; SCHOFIELD, 1993) é pequeno (\varnothing 47 mm), o que dificulta as lavagens e mesmo quando acomodado em cadinhos filtrantes o resíduo escapa do filtro sendo depositado diretamente no cadinho. Além disso, este filtro é importado, o que contribui para restringir o seu uso em laboratórios nacionais.

Optou-se pelo uso do filtro para assegurar que a metodologia fosse fiel ao método original da Micro-FDN, porém com modificações pertinentes (inclusão de α -amilase e sulfito de sódio e correção para cinzas) para acomodar a análise de alimentos concentrados e permitir a comparação aos resultados obtidos por método oficial. Alternativa seria o uso apenas do cadinho filtrante ao invés do filtro, uma vez que o filtro funcionou apenas como um auxiliar de filtração, o que não pode ser desconsiderado para fazer inferências aos resultados obtidos. Com esse objetivo, Senger *et al.* (2008) avaliaram o método autoclave com uso de sacos filtrantes em substituição ao cadinho/filtro. Dentre as diferentes combinações de tempo e pressão da

autoclave nas análises de aFDN avaliadas em relação ao método convencional AOAC (MERTENS, 2002), os autores concluíram que os teores de aFDN obtidos em autoclave a 110 °C por 40 minutos não diferiram daqueles verificados por método convencional, cujo desvio padrão da regressão foi de 24,1 g de aFDN por kg de matéria seca.

Foram constatados maiores teores de aFDN_{mo} para os alimentos composto lácteo, milho, sorgo, soja e farelo de soja pelo método da *Filter Bag* em aparelho de extração de fibra em sacos não pressurizado – SES em relação àqueles obtido por método oficial, em sistema convencional de refluxo ou Fibertec. Da mesma forma que para os demais métodos alternativos, as quantidades de DN, α -amilase e sulfito de sódio possivelmente não foram limitantes na análise, por terem sido utilizadas quantidades até mesmo superiores àquelas empregadas no método oficial por massa de amostra analisada.

Dadas as mesmas quantidades de reagentes e tempos das operações do que o sistema Ankom, esse resultado elevado de aFDN_{mo} neste aparelho poderia estar relacionado à forma como o detergente neutro entra em ebulição no ambiente não pressurizado e o tipo de saco filtrante empregado para o SES, que é o TNT (tecido não tecido). No sistema Ankom, com a pressurização, o DN atinge a temperatura de 100 °C, mas não entra em ebulição e permanece no sistema. No sistema SES, o DN atinge temperatura elevada e entra em ebulição, mas é mantido no sistema devido ao condensador, com algum indício de evaporação e formação de bolhas de ar. O processo de agitação das amostras é tal como no Ankom, o que não caracteriza uma distinção. Komarek (1994), na idealização do sistema Ankom, reportou que a pressurização é para evitar a formação de bolhas de ar que podem interferir no processo de extração, reduzindo o contato da solução com a amostra. Esta observação foi confirmada por Gomes *et al.* (2011), que avaliaram os dois sistemas, pressurizado (Ankom) e não pressurizado, e constataram valores elevados de FDN no sistema não pressurizado, mas não compararam os resultados com método oficial.

É possível que, em função do provável aprisionamento de bolhas de ar no interior dos sacos, devido à ebulição do DN, as amostras cuja determinação de FDN seja mais problemática, como é o caso dos alimentos concentrados, com alto teor de CNF, proteína e gordura, representados neste estudo pelo sorgo, milho, soja grão, farelo de soja, composto lácteo e farinha de carne e ossos, tenham obtido valores elevados de fibra, o que permite inferir menor sensibilidade deste sistema analítico. O milho é conhecidamente um alimento difícil de analisar para fibra e os métodos alternativos ou que omitem o uso de α -amilase, superestimam o teor de aFDN_{mo}, o que pode ser observado neste estudo pelo alto teor de aFDN_{mo} determinado em SES, que difere significativamente dos métodos oficiais ($P < 0,001$).

Constata-se que quanto menor a quantidade de aFDNmo nos alimentos, maiores são as dificuldades dos métodos alternativos em atingir o mesmo valor de convergência dos métodos oficiais. As modificações do método mais comumente adotadas (GOERING; VAN SOEST, 1970; VAN SOEST *et al.*, 1991; MERTENS, 2002) desde a sua criação foram justamente para permitir a análise destes alimentos cuja extração dos componentes solúveis é dificultada. Não existem valores verdadeiros para a fibra, devido à sua natureza heterogênea, cuja definição norteou o desenvolvimento do método empírico e os valores referenciais ou convergentes são aqueles gerados pela análise de materiais referenciais analisados por vários laboratórios que seguiram exatamente o método prescrito (HORWITZ, 1982; MERTENS, 2002; 2003). Os erros sistemáticos apenas podem ser minimizados com observação rigorosa ao método oficial (MERTENS, 2003) e para efeito de comparação, os valores de consenso ou convergência são aqueles determinados rigorosamente por metodologia oficial AOAC 2002.04, no presente caso, determinados em refluxo e Fibertec.

O avanço científico é gerado pela busca de soluções, no caso específico da fibra, métodos alternativos têm sido idealizados para eliminar etapas minuciosas do método convencional e permitir um maior número de análises por unidade de tempo. Ainda, outro requisito destes métodos é ser acessível. É evidente que os métodos alternativos devem ser empregados com cautela, mesmo diante das possíveis vantagens pertinentes ao menor tempo ou maior eficiência das análises da aFDNmo. Estes aparelhos – que podem ser assim designados quando empregados com a mesma concentração de reagentes do método original (AOAC 2002.04) ou métodos – quando adotados de acordo com metodologia própria, devem continuamente ser idealizados, desenvolvidos e aferidos quanto à quantidade de fibra que determinam. Quando permitirem análises acuradas de fibra em relação ao método oficial podem resultar em ganhos científicos consideráveis ou mesmo em maior adoção de análises padronizadas em empresas particulares. Quando o desempenho destes sistemas for semelhante ao oficial, devem ser utilizados conforme conveniência e preferência do analista. Outro aspecto que tem sido continuamente recomendado na análise de fibra em detergente neutro é que a metodologia empregada deve ser especificada para evitar confusão (NRC, 2001; UDÉN *et al.*, 2005).

7. CONCLUSÕES

Os aparelhos de refluxo convencional e Fibertec determinam valores análogos de matéria orgânica fibrosa em detergente neutro.

O sistema Ankom de análises de fibra, com metodologia própria, pode ser utilizado na análise de fibra insolúvel em detergente neutro por não diferir do método AOAC.2002.04.

O sistema analítico da Micro-FDN com modificações para análises de fibra não foi acurado na análise de fibra insolúvel em detergente neutro para o sorgo grão em relação ao Método Oficial AOAC. 2002.04. Contudo, para alimentos forrageiros, este método pode ser utilizado, devido à ausência de erros sistemáticos, quando comparado ao Método Oficial.

O método de análises de fibra, denominado Sistema de Extração em Sacos (SES), não é recomendado para análise de FDN para alimentos concentrados ou com baixa concentração do analito.

REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716-723, 1974.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. **Nutrição animal: bases e fundamentos**. Nobel, 1985.

ANÔNIMO. Neutral Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I). 2015. Disponível em: <<http://www.ankom.com/neutral-detergent-fiber.aspx>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

AOAC - **Official Methods of Analysis**. 16th ed., 4th revision, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, 1998.

BARBOSA, M. M.; DETMANN, E.; ROCHA, G. C.; FRANCO, M. D. O.; VALADARES FILHO, S. D. C. Evaluation of Laboratory Procedures to Quantify the Neutral Detergent Fiber Content in Forage, Concentrate, and Ruminant Feces. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 883-889, 2015.

BERCHIELLI, T. T.; SADER, A. P. D. O.; TONANI, F. L.; PAZIANI, S. D. F.; ANDRADE, P. D. Avaliação da Determinação da Fibra em Detergente Neutro e da Fibra em Detergente Ácido pelo Sistema ANKOM. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1572-1578, 2001.

BORTOLASSI, J. R.; SANTOS, G. T. D.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; ZAMBOM, M. A.; FURLAN, A. C. Comparação dos métodos convencional e Filter Bag Technique da Ankom® (FBT) para determinação de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 807-811, 2000.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B (Methodological), v. 26, p. 211-252, 1964.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. **Sociological Methods & Research**, v. 33, p. 261-304, 2004.

D'HEER, B. G.; DE BOEVER, J. L.; VANACKER, J. M.; BOUCQUE, C. V. The filter bag versus the conventional filtration technique for the determination of crude fibre and Van Soest cell wall constituents. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 9, p. 513-526, 2000.

FERREIRA, G.; MERTENS, D. R. Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, p. 335-340, 2007.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis**. Agricultural handbook, n. 379. U.S.D.A., Washington, D.C. 1970.

GOMES, D. I.; DETMANN, E.; VALENTE, T. N. P.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C. Avaliação laboratorial de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas sob diferentes ambientes físicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 522-525, 2011.

HIRAOKA, H.; FUKUNAKA, R.; ISHIKURO, E.; ENISHI, O.; GOTO, T. Improvement and validation of the method to determine neutral detergent fiber in feed. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 690-695, 2012.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, A67, 1982.

_____; ALBERT, R.; DEUTSCH, M. J.; THOMPSON, J. N. Precision parameters of methods of analysis required for nutrition labeling. 1. Major nutrients. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 661-680, 1990.

HRISTOV, A.; MERTENS, D.; ZAMAN, S.; VANDER POL, M.; PRICE, W. Variability in feed and total mixed ration neutral detergent fiber and crude protein analyses among commercial laboratories. **Journal of dairy science**, v. 93, p. 5348-5362, 2010.

JUNG, H. J. G. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 810S-813S, 1997.

KOMAREK, A. R. **Fiber analysis system**, Google Patents, 1994.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347-358, 1996.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D.; SCHABENBERGER, O. **SAS® for Mixed Models**. SAS Institute Inc., Cary, USA. 2006.

MERTENS, D. R. Critical conditions in determining detergent fiber. **Proceedings of NFTA Forage Analysis Workshop**. Denver, CO. p C1-C8. 1992.

_____. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations, Informational Conference with Dairy and Forage Industries, United States Dairy Forage **Research Center**, pp. 81-92. 1996.

_____. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

_____. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 3233-3249, 2003.

MÖLLER, J. Gravimetric determination of acid detergent fiber and lignin in feed: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 74-90, 2009.

NRC - **Nutrient requirements of dairy cattle**. National Academy of Sciences, Washington, DC. 2001.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1063-1073, 1993.

RODRIGUES, M. T. **Estimating Available Energy of Mixed Forages by Near Infrared Reflectance Spectroscopy Using Three Predicting Approaches**. Dissertation. University of Wisconsin – Madison. 1998.

SENGER, C. C. D., KOZLOSKI, G. V.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L. M.; MESQUITA, F. R.; ALVES, T. P.; CASTAGNINO, D. S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 169-174, 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; GRASSI, M. T. **Fundamentos de química analítica**. Pioneira Thomson Learning. 2006.

SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's Information Criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics, Theory and Methods** A7, 13-26. 1978.

THIEX, N. J.; ANDERSON, S.; GILDEMEISTER, B. Crude Fat, Hexanes Extraction, in Feed, Cereal Grain, and Forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 899-908, 2003.

_____; MANSON, H.; ANDERSON, S.; PERSSON, J. Á. Determination of Crude Protein in Animal Feed, Forage, Grain, and Oilseeds by Using Block Digestion with a Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 309-317, 2002.

UDÉN, P.; ROBINSON, P. H.; WISEMAN, J. Use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new, or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 118, p. 181-186, 2005.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THIEX, N. **Forage analyses procedures**. National Forage Testing Association, Omaha. 1993.

VAN SOEST, P. J. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. **Journal of Animal Science**, v. 23, p. 838-845, 1964.

_____. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 119-128, 1967.

_____. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell University Press, Ithaca. 476 p. 1994.

_____; ROBERTSON, J. B. **Analysis of forages and fibrous foods**. Cornell University, Ithaca. 1985.

_____; _____; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VIEIRA, R. A. M.; CAMPOS, P. R. S. S.; SILVA, J. F. C.; TEDESCHI, L. O.; TAMY, W. P. Heterogeneity of the digestible insoluble fiber of selected forages in situ. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, p. 154-166, 2012.

_____; FERNANDES, A. M. A Importância de Estudos Quantitativos Associados à Fibra para a Nutrição e a Alimentação de Ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 258-290, 2006.

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