

Comparação dos métodos convencional e *Filter Bag Technique* da Ankom[®] (FBT) para determinação de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido

João Ricardo Bortolassi, Geraldo Tadeu dos Santos*, Claudete Regina Alcalde, Geane Dias Gonçalves, Maximiliane Alavarse Zambom e Antônio Claudio Furlan

Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil.
*Author for correspondence. e-mail: gtsantos@uem.br

RESUMO. Foram analisadas fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método convencional e pela *Filter Bag Technique* da Ankom[®] (FBT), reutilizando os filtros F57 por até seis vezes. Para tanto, fez-se uso dos alimentos: milho moído, farelo de trigo, farelo de soja, farelo de canola, feno de tifton 85, feno de aveia, milheto e silagem de milho. O método FBT mostrou-se eficaz para a determinação de FDN e FDA para a maioria dos alimentos. A reutilização dos filtros F57 na FBT é recomendada de acordo com o tipo de alimento a ser testado. Para alimentos como a silagem de milho e o farelo de canola, a reutilização dos filtros poderá ser feita até seis vezes, já para outros alimentos, recomenda-se menor número de reutilizações. A análise da FDN para o milho, na FBT, não é recomendada.

Palavras-chave: α -amilase, *filter bag technique*, fibras, filtros F57.

ABSTRACT. Comparison of conventional and Ankom's filter bag technique (FBT) methodologies for determining neutral detergent fiber and acid detergent fiber.

Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) concentrations were analyzed by conventional and ANKOM's filter bag technique methodologies using F57 filter bags for up to six determinations. The feed samples used were: corn grist, wheat middlings, soybean meal, canola meal, tifton 85 hay, rat hay, millet and corn silage. FBT method was effective for NDF and ADF determination for the majority of feed samples. F57 filters reutilization in FBT is recommended in accordance with the tested feed type. For corn silage and canola meal, F57 filters are recommended to be reutilized up to six times, but for other feeds a lower number of reutilizations is recommended. NDF analysis of corn using FBT is not recommended.

Key words: α amylase, fibers, filter bag technique, F57 filters.

O conceito de fibra bruta (FB) foi estabelecido há mais de um século pelo método de Weende (AOAC, 1975), sendo utilizado como um padrão. O tratamento sucessivo em soluções ácida e alcalina fracas fornece um resíduo isento em quase sua totalidade de conteúdo celular, particularmente em proteína e em gordura, conforme Giger e Pochet (1987), citados por Ferreira (1994). Igualmente, é solubilizada a maior parte da hemicelulose, cerca de 80%, e uma quantidade variável de lignina, entre 50% e 90% (Mascarenhas Ferreira *et al.*, 1983).

Na tentativa de solucionar os erros das avaliações de fibra, foram desenvolvidas outras técnicas mais precisas e melhor adaptadas para as forragens,

principal fonte de fibras para os animais ruminantes. As técnicas desenvolvidas por Van Soest (1963, 1967) e por Van Soest e Wine (1967, 1968), também conhecidas como sistema detergente, onde se obtém a fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), foram oficialmente aceitas pela AOAC (1980) por oferecerem uma boa estimativa tanto dos componentes totais da parede celular como das frações mais indigestíveis desta. Isso permite uma grande quantidade de alternativas sequenciais de análises, com o objetivo de fracionar alguns componentes minoritários importantes da parede celular, além de estimar os macrocomponentes isoladamente por diferenças

matemáticas entre os resultados das análises efetuadas (Ferreira, 1994).

A rapidez e o baixo custo das determinações fez com que as metodologias propostas fossem extensamente aceitas. Ao longo dos anos, comprovou-se que as técnicas originais não eram muito eficazes para algumas categorias de alimentos, particularmente os cereais ricos em amido e subprodutos agroindustriais ricos em pectinas, taninos, complexos taninos-proteína e produtos da reação de Maillard; havendo, então, a necessidade de sofrer algumas alterações em uma ou outra etapa analítica de acordo com o tipo de amostra (Van Soest et al., 1991).

Atualmente, o método de determinação de fibra mais utilizado é o sistema detergente. No entanto, há vários modos de avaliação de FDN e de FDA, podendo-se citar o método convencional (Van Soest, 1963), modificado por Jeraci et al. (1988) e, também, pode-se observar o método da *Filter Bag Technique* da Ankom® (FBT), segundo Ankom® (2000).

O método da FDN utiliza uma solução detergente neutro, onde cada reagente exerce uma função. Embora a pectina faça parte da parede celular dos vegetais, esta é facilmente extraída e também rápida e quase completamente digerida. A FDN isola, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina com alguma contaminação por proteína e pectina. A contaminação por proteína parece contrabalançar a perda de pectina imediatamente solúvel, fazendo da FDN uma estimativa aceitável da parede celular dos tecidos vegetais (Mertens, 1992).

O método da FDN, desde que foi desenvolvido, vem sofrendo algumas modificações, devendo-se tomar muito cuidado ao se compararem valores. As dificuldades na filtragem e os altos valores de FDN nas amostras de alimentos concentrados e forragens contendo amido (silagem de milho) indicam que o detergente neutro não é eficiente na solubilização dos amidos. Por isso, amilases têm sido utilizadas nas determinações da FDN (Van Soest et al., 1991).

O método da FDA utiliza ácido sulfúrico 1N para solubilizar os açúcares, amidos, hemiceluloses e algumas pectinas, e o detergente cetil-trimetilamônio brometo (CTAB) para remover proteínas. Para Ferreira (1994), a FDA contém uma fração lignocelulósica, algumas hemiceluloses, parte das pectinas, complexos taninos-proteína, taninos condensados, complexos da reação de Maillard e sílica.

Mertens (1992) comenta que as diferenças nas proporções e nas configurações intermoleculares dos componentes da fibra faz com que a FB, a FDN e a FDA não apresentem propriedades nutricionais

constantes. Ferreira (1994) discorre das muitas dificuldades de se estabelecerem sistemas padronizados e eficientes de análise química, os quais devem permitir quantificar rigorosamente os componentes insolúveis e solúveis da parede celular vegetal, com a menor interferência possível dos resíduos indesejáveis. Esses resíduos se somam na estimação, fazendo com que muitos investigadores, ao longo dos anos, procurassem estabelecer diferentes técnicas em função da fração que se quer determinar e do tipo de amostra analisada.

O objetivo do trabalho foi comparar o método convencional com a *Filter Bag Technique* da Ankom® (FBT), para determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), reutilizando os filtros F57 empregados na FBT.

Material e métodos

Os alimentos foram coletados na Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal/UEM-DZO.

Os alimentos analisados foram: milho moído, farelo de trigo, farelo de soja, farelo de canola, feno de Tifton 85, feno de aveia, milheto pé inteiro e silagem de milho. Apenas o milheto pé inteiro e a silagem de milho sofreram pré-secagem devido ao elevado teor de água: 78,12% e 69,09%, respectivamente. Em seguida, todos os alimentos foram moídos utilizando-se peneira com crivos de 1mm e armazenados em frascos com tampa rosqueável.

Seguindo-se as metodologias descritas por Silva (1990), foram realizadas análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), energia bruta (EB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA). O teor de matéria orgânica (MO) foi obtido por diferença entre os teores de MS e MM. Também foi determinado o teor de amido dos alimentos, pelo método Poore (1989) enzimático modificado (Pereira e Rossi, 1995), fazendo-se uso do Kit Enzicolor® para leitura de glicose.

Foram analisadas, para todos os alimentos, FDN e FDA pelo método convencional (Van Soest, 1963), modificado por Jeraci et al. (1988) e pela FBT através do aparelho *Fiber Analyzer-Ankom*²²⁰ (Ankom®, 2000).

A Tabela 1 apresenta a composição química dos alimentos utilizados nas análises, estando os dados expressos com base na matéria seca.

Tabela 1. Teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), amido, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e energia bruta (EB)

Alimentos	MS	MM	MO ¹	PB	EE	Amido	FDN ²	FDA ²	EB
	%								
Milho Moído	88,67	2,17	97,83	9,49	3,62	74,20	10,19	4,69	3938
Farelo Trigo	88,97	6,06	93,24	20,09	2,84	22,22	43,56	14,95	3956
Farelo Soja	88,89	6,76	93,94	50,89	2,36	3,67	14,21	10,56	4167
Farelo Canola	89,73	6,67	93,33	43,51	1,54	4,32	30,66	28,75	4228
Feno Tifton 85	89,93	6,90	93,10	6,87	1,51	2,59	79,92	54,62	3807
Feno Aveia	88,56	9,18	90,82	10,64	1,14	1,69	74,06	57,46	3631
Milheto pé inteiro	21,88	5,82	94,18	9,41	1,57	4,23	73,69	53,32	3914
Silagem Milho	30,91	3,39	96,61	6,34	2,11	18,15	57,93	42,47	4077

¹ Igual a 100-MM; ² Dados obtidos pelo método convencional

O sistema de análise de fibras (uso de soluções detergente) desenvolvido por Van Soest (1963) possui um inconveniente em relação à FDN: quando o alimento possui elevado teor de amido, torna-se difícil a filtragem tanto em cadinho de placa porosa como nos filtros F57. Desse modo, é necessária a utilização de enzimas capazes de solubilizar o amido. Antes da realização do presente trabalho, foram avaliadas duas enzimas: α -amilase Termamil 120 L¹ e Alpha-Amylase heat stable². Essas duas enzimas foram avaliadas no método convencional, para análise de FDN, onde os alimentos testados não apresentaram diferenças quanto aos teores de FDN. Desse modo, optou-se por utilizar a α -amilase Termamil 120 L devido ao menor custo e à maior disponibilidade desse produto no mercado nacional.

Para a determinação de FDN no método convencional, usou-se 0,5g de amostra. Em um béquer de 600 ml foram adicionados 100 ml de solução detergente neutro e 0,2 ml de enzima α -amilase Termamil 120 L, conforme o método modificado por Jeraci (1988). Após 60min de fervura a 100°C, o conteúdo do béquer foi filtrado em cadinho apropriado para filtragem de FDN (porosidade entre 160 e 250 μ m - n° 0). Em seguida, os cadinhos foram lavados em acetona e secos em estufa a 105°C por oito horas.

Nas determinações de FDA, seguiu-se a mesma marcha empregada para determinação de FDN, apenas substituindo o detergente neutro pelo ácido e não se utilizou a enzima. Para a filtragem da FDA, foi usado cadinho apropriado (porosidade entre 40 e 100 μ m - n° 2).

Para as análises de FDN e de FDA na FBT, foram utilizados 1800ml de solução detergente para cada 24 amostras.

Na determinação de FDN pela FBT, usou-se 0,5g de amostra, a qual foi colocada no filtro F57,

sendo este posteriormente lacrado a quente. Os filtros foram mergulhados em solução de detergente neutro, sendo adicionados 0,2 ml de enzima α -amilase Termamil 120 L para cada amostra, permanecendo em fervura por 60min. Após lavados em acetona, os filtros foram secos, por oito horas, em estufa a 105°C.

Após a análise de FDN ou de FDA no método convencional, os cadinhos foram levados à mufla por 4 horas, em temperatura próxima de 475°C, para queima da matéria orgânica. Em seguida, foram mergulhados em solução sulfocrômica para limpeza do material inorgânico. Após, foram lavados em água fria e testadas sua capacidade de filtração de líquido em bomba de vácuo.

A porosidade dos filtros F57, quando novos, é de aproximadamente 30 μ m. A reutilização dos filtros F57 deu-se mediante processo de "reciclagem". Os filtros, após cada análise de FDN ou de FDA, foram cortados no laço para que o resíduo pudesse sair durante o processo de fervura em sabão neutro (Extran[®] MA 01), durante 30min. Após, foram lavados em água fria e, posteriormente, mergulhados em acetona por 10min, para serem secos em estufa a 105°C por oito horas.

Na FBT, foram realizadas seis reutilizações dos filtros F57 para cada alimento, empregando-se sempre os mesmos filtros correspondentes aos alimentos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (métodos convencional e FBT) e três repetições. O método convencional (considerado como testemunha) foi comparado com o método FBT pelo teste de Dunnett. O efeito da reutilização dos filtros F57 no método FBT foi decomposto em polinômios ortogonais, utilizando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + N_j / M_2 + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = observação do teor de fibra obtido no método i na reutilização j ;

¹ Novonordisc Bio Ind. do Brasil Ltda/ Araucária - PR

² Ankom Technology Corporation/NY - USA

μ = média geral;

M_i = efeito de método i ($i = 1, 2$);

N_j/M_2 = efeito da reutilização j no método 2 ($j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$);

ϵ_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação do teor de fibra Y_{ijk} .

Resultados e discussão

Os resultados de FDN e de FDA para os alimentos estudados estão apresentados na Tabela 2. Não foram observados diferenças ($p > 0,05$), pelo teste de Dunnett, entre os tratamentos para as análises de FDN para a silagem de milho, farelo de canola e farelo de trigo. No entanto, os valores encontrados em ambos os métodos apresentam pequena discordância com aqueles encontrados pelo NRC (1989) para a silagem de milho e farelo de trigo.

Os alimentos que não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os métodos para as análises de FDA foram farelo de soja, farelo de canola, feno de Tifton 85, milho pé inteiro e silagem de milho. Os valores de FDA encontrados pelo NRC (1989) para o feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) e silagem de milho foram de 43%. No entanto, pelo método convencional, foram obtidos os valores de 54,97% e 42,77%, sendo que, pelo método *Filter Bag Technique* (FBT), os valores encontrados foram próximos de 52% e 43%, para o feno de Tifton 85 e silagem de

milho, respectivamente. Dessa forma, a FBT mostrou maior concordância com os resultados do NRC (1989) que o método convencional.

Para as análises de FDN, alguns alimentos apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos a partir de determinado número de reutilização dos filtros, ou seja, o farelo de soja diferiu na sexta reutilização, o feno de aveia a partir da quinta e o feno de Tifton 85 a partir da segunda. Este último alimento, mesmo apresentando diferenças ($p < 0,05$) entre os métodos na sexta reutilização dos filtros, demonstrou que a FBT possui boa proximidade (diferença média de 0,5%) com o valor de FDN proposto pelo NRC (1989).

Para FDN, o milho moído e o milho pé inteiro apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre o método convencional e FBT para todas as reutilizações. O milho moído apresentou esse comportamento devido a seu elevado teor de amido, como pode ser observado na Tabela 1, o qual é gelatinizado dentro do filtro durante o processo de fervura. A ação da enzima α -amilase, quando se utilizou o filtro F57, não foi suficiente para solubilizar o amido, resultando, provavelmente, no entupimento da malha do mesmo e, dessa forma, superestimando o teor de FDN desse alimento. Tal constatação não foi observada na metodologia convencional.

Tabela 2. Teores de Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos avaliados pelos métodos convencional (CONV) e *Filter Bag Technique* da Ankom® (FBT) quando feita a reutilização dos filtros F57 por até seis vezes

	Conv	Métodos						Média	CV ¹	Regressão
		FBT								
		1	2	3	4	5	6			
Milho Moído										
FDN	10,19	36,56*	23,63*	33,28*	32,32*	24,30*	33,67*	27,71	17,86	$p > 0,05$
FDA	4,75	5,03	5,75*	4,57	4,44	4,20*	4,29	4,72	11,04	$\hat{y} = 5,56089005 - 0,2420003X$ ($R^2 = 0,60$)
Farelo de Trigo										
FDN	47,09	43,53	43,56	43,76	43,40	42,26	43,00	43,80	4,70	$\hat{y} = 43,9388149 - 0,1963814X$ ($R^2 = 0,45$)
FDA	14,90	15,41	14,35	13,43	13,77	13,18*	13,52	14,08	4,80	$\hat{y} = 16,59022425 - 1,4031186X + 0,1491666X^2$ ($R^2 = 0,92$)
Farelo de Soja										
FDN	14,12	21,82	18,36	22,06	18,73	16,89	23,48*	19,35	19,38	$p > 0,05$
FDA	10,54	18,40	15,38	9,51	10,35	9,93	11,28	12,20	31,00	$\hat{y} = 24,87110748 - 6,9219447X + 0,7801191X^2$ ($R^2 = 0,93$)
Farelo de Canola										
FDN	31,89	35,40	37,13	39,49	36,64	30,73	35,05	35,19	11,46	$p > 0,05$
FDA	28,67	30,85	32,66	26,37	27,22	25,92	26,14	28,26	8,63	$\hat{y} = 32,4797055 - 1,224573X$ ($R^2 = 0,65$)
Feno de Tifton 85										
FDN	80,05	79,23	78,63*	78,35*	77,86*	78,41*	78,08*	78,66	0,73	$\hat{y} = 79,11733075 - 0,1971745X$ ($R^2 = 0,60$)
FDA	54,97	57,65	55,20	50,12	52,98	49,17	50,36	52,92	5,47	$\hat{y} = 57,750965 - 1,47689X$ ($R^2 = 0,69$)
Feno de Aveia										
FDN	74,01	74,87	75,03	74,92	74,95	75,95*	75,72*	75,06	0,91	$p > 0,05$
FDA	57,52	62,75*	60,50	56,34	59,38	56,14	57,56	58,60	3,54	$\hat{y} = 62,3756375 - 1,028065X$ ($R^2 = 0,55$)
Milho Pé Inteiro										
FDN	74,32	72,51*	71,82*	72,34*	71,64*	72,07*	71,25*	72,28	1,00	$p > 0,05$
FDA	53,44	54,88	51,85	48,52	50,74	48,13	48,90	50,92	4,68	$\hat{y} = 54,3920045 - 1,11207X$ ($R^2 = 0,65$)
Silagem de Milho										
FDN	57,93	58,58	60,05	59,33	58,47	58,77	59,74	58,98	2,90	$p > 0,05$
FDA	42,77	45,89	44,02	41,22	41,38	43,39	41,57	42,89	6,24	$p > 0,05$

Médias seguidas de asterisco (*) nas linhas diferem da testemunha (método convencional) pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); ¹Coeficiente de Variação

Van Soest *et al.* (1991) comentam que a α -amilase é rapidamente inativada a uma temperatura de 100°C e que sua atividade α 1-6 é destruída pelo EDTA (componente da solução de detergente neutro).

Nas análises de FDA, alguns alimentos apresentaram diferenças ($p < 0,05$) quando comparado o método convencional com as reutilizações dos filtros F57 na FBT. Dessa forma, o farelo de trigo diferiu a partir da quinta, o feno de aveia diferiu apenas na primeira e o milho moído na segunda e quinta reutilizações dos filtros. Ainda que tenham sido encontradas essas diferenças ($p < 0,05$) nas reutilizações dos filtros na FBT, esta apresentou valores de FDN do farelo de trigo mais próximos daqueles encontrados pelo NRC (1989) que o método convencional. Para o feno de aveia, apesar das diferenças ($p < 0,05$) entre os métodos, esses apresentaram valores de FDN muito próximos, com coeficientes de variação abaixo de 1%. Entretanto, apresentaram FDN até 13 unidades percentuais acima da encontrada pelo NRC (1989).

Provavelmente, as diferenças encontradas entre os tratamentos para alguns alimentos foram resultantes de alterações sofridas na estrutura dos filtros F57, por causa de obstrução ou por dilatação da malha dos mesmos.

Alguns alimentos, excluindo o método convencional, apresentaram equação de regressão para as reutilizações dos filtros, conforme demonstrado na Tabela 2.

Para aqueles alimentos que não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos, a FBT apresenta a vantagem de possibilitar a realização das análises mais rapidamente, pois suporta 24 amostras por vez, ocupa pouco espaço físico dentro do laboratório, diminui em até 50% o custo com mão-de-obra, além de estar passando pelo processo de aprovação desde 1996 pela AOAC (Ankom[®], 2000).

O método FBT mostrou-se eficaz para determinação de FDN e de FDA para a maioria dos alimentos. A reutilização dos filtros F57 na FBT é recomendada de acordo com o tipo de alimento a ser testado. Para alimentos como a silagem de milho e o farelo de canola, a reutilização dos filtros poderá ser feita até seis vezes, já para outros alimentos, recomenda-se menor número de reutilizações. A análise de FDN para o milho, na FBT, não é recomendada.

Referências bibliográficas

- Ankom. *Frequently asked questions*. Capturado em 08 ago. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.ankom.com/faqs.html>
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official methods of analysis*. 12th. ed. Washington, 1975.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official methods of analysis*. 13th. ed. Washington, 1980.
- Ferreira, W.M. Os componentes da parede celular na nutrição de não-ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE NÃO-RUMINANTES, 1994, Maringá. *Anais...* Maringá: SBZ, 1994. p. 85-113.
- Jeraci, J.L.; Hernandez, T.; Robertson, J.B. New and improved procedure for neutral-detergent fiber. *J. Anim. Sci.*, 66(1):351, 1988.
- Mascarenhas Ferreira, A., Kersten, J.; Gast, C.H. The study of several modifications of neutral detergent fibre procedure. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 9:19, 1983.
- Mertens, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. *Anais...* Lavras: SBZ, 1992. p. 188-219.
- National Research Council. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6th. rev. ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences. 1989.
- Pereira, J.R.A.; Rossi, P. *Manual prático de avaliação nutricional de alimentos*. Piracicaba: Fealq, 1995.
- Poore, M.H. In: BIENAL CONFERENCE ON RUMEN FUNCTION, 1989, Chicago. *Anais...* Chicago, [s.n.], 1989, p. 20.
- Silva, D.J. Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos). 2.ed. Viçosa : UFV, 1990.
- Van Soest, P.J. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.*, 26:119-128, 1967.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74:3583-3597, 1991.
- Van Soest, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II - a rapid method for determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 46:829-835, 1963.
- Van Soest, P.J.; Wine, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 51:780, 1968.
- Van Soest, P.J.; Wine, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV - Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 50:50, 1967.

Received on May 23, 2000.

Accepted on July 24, 2000.