

## Métodos utilizados para determinação dos constituintes da fração fibrosa, uma revisão

Anjos, A.N.A.<sup>1</sup>®; Viegas, C.R.<sup>1</sup>; Gomes, R.S.<sup>2</sup> e Almeida, J.C.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes – RJ. Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Produção Animal e Pastagens. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. Brasil.

### PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Métodos alternativos.

Valor nutritivo.

Van Soest.

Fontes de variação.

### RESUMO

A estimativa da composição químico-bromatológica dos alimentos envolve uma série de estudos que avaliam principalmente a fração fibrosa, uma vez que apresenta grande variabilidade quando comparada aos demais componentes. O crescente número de publicações sobre as técnicas analíticas disponíveis para a determinação do valor nutritivo dos alimentos acabam generalizando o uso de termos mal definidos. Existem diversas técnicas de avaliação dos componentes da forragem, sendo o sistema de detergente o mais utilizado, embora existam métodos mais modernos. Contudo, a acessibilidade e os custos destes métodos modernos são fatores que limitam o uso dos mesmos em diversos laboratórios. Ademais, alguns destes métodos não são reconhecidos como método oficial de análise. Neste contexto, os objetivos desta revisão foram: evidenciar os conceitos mais importantes na determinação do valor nutritivo dos alimentos; melhorar o uso e as dificuldades de interpretação dos resultados analíticos. Concluiu-se que o uso dos métodos analíticos permite estimar a composição e a disponibilidade das diferentes frações da parede celular. Mas a variabilidade dos constituintes da parede celular exige conhecimento das diferentes metodologias analíticas disponíveis. Os métodos analíticos, tradicionais ou alternativos, ainda são empíricos visto que apresentam resultados distintos para uma mesma análise. Essas variações são geradas na maioria das vezes pelas diferenças entre as etapas dos procedimentos analíticos. Fica claro que o aperfeiçoamento dos métodos analíticos é de suma importância para a estimativa do valor nutritivo dos alimentos.

### Methods used to determination the constituents of the fibrous fraction, a review

### SUMMARY

The estimation of the chemical-bromatological composition of foods involves a series of studies that mainly evaluate the fibrous fraction, since it presents great variability when compared to the other components. The growing number of publications on the analytical techniques available for determining the nutritional value of food end up generalizing the use of poorly defined terms. There are several techniques for evaluating forage components, the detergent system being the most used, although there are more modern methods. However, the accessibility and cost of these modern methods are factors that limit their use in various laboratories. Moreover, some of these methods are not recognized as an official method of analysis. In this context, the objectives of this review were: to highlight the most important concepts in determining the nutritional value of foods; improve the use and difficulties of interpretation of analytical results. It was concluded that the use of analytical methods allows to estimate the composition and availability of different fractions of the cell wall. But variability of cell wall constituents requires knowledge of the different analytical methodologies available. Analytical methods, traditional or alternative, are still empirical as they present different results for the same analysis. These variations are mostly generated by the differences between the steps of the analytical procedures. It is clear that the improvement of analytical methods is extremely important for estimating the nutritional value of foods.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Alternative methods.

Nutritive value.

Source of variation.

Van Soest.

### INFORMATION

Cronología del artículo.

Recibido/Received: 15.09.2018

Aceptado/Accepted: 05.03.2020

On-line: 15.04.2020

Correspondencia a los autores/Contact e-mail:

assiszoot@yahoo.com.br

### INTRODUÇÃO

A estimativa do valor nutritivo dos alimentos para formulação de dietas envolve uma série de estudos que avaliam principalmente a fração fibrosa. Uma vez que esta apresenta grande variabilidade e por esta relacionada diretamente com a disponibilidade de energia e consumo (Jung, 1997; Berchielli et al., 2011).

No Brasil, onde os recursos alimentares são baseados em pastagens, o conhecimento do valor nutritivo dos alimentos é de grande importância, para com-

preensão dos processos fisiológicos, pois são responsáveis pela transformação do alimento até produtos de origem animal (Geron, et al. 2014).

A fibra é um termo nutricional, que pode ser somente determinada durante o processo digestivo e sua definição está vinculada à sua origem e a metodologia analítica utilizada na sua determinação laboratorial (Mertens, 2003; Gomes et al., 2012). Resistente à digestão enzimática, a fibra acaba servindo de substrato para atividade fermentativa (Van Soest et al., 1991; Jung, 1997), por apresentar digestibilidade variável, ocupa

espaço no trato gastrointestinal podendo limitar o consumo dos animais (Jung, 1997; Mertens, 2003; Geron, et al. 2014). Assim, erros cometidos nas análises laboratoriais, para estimativa do valor nutritivo dos alimentos podem comprometer o balanceamento das dietas (Van Soest et al., 1991).

O método analítico tradicional denominado de sistema de detergentes, desenvolvido por Van Soest (1963b), para quantificação de compostos fibrosos insolúveis, sofreu uma série de modificações em determinadas etapas do seu processo ao tentar melhorar seu uso para abranger uma maior variabilidade de alimentos. Estas modificações sugeriram a retirada da decalina utilizada como agente antiespumante; a retirada do sulfito de sódio utilizado para remover as contaminações por proteínas; a exclusão de sulfito de sódio e a inclusão de  $\alpha$ -amilase para remoção de amido (Van Soest & Robertson, 1985); uso da  $\alpha$ -amilase, sulfito de sódio e trietilenoglicol sem a decalina (Van Soest et al., 1991).

Devido às diversas alterações realizadas no método original, em 1980 David Mertens com o intuito de reduzir os erros entre os laboratórios, prescreveu somente um único método analítico para todos os tipos de alimentos (Udén et al., 2005; Segura et al., 2007).

Contudo, mesmo se todos os pesquisadores adotassem rigorosamente o método de referência estabelecido, existem ainda algumas falhas práticas, que podem acabar limitando sua eficiência quanto à comparação dos resultados (Berchielli et al., 2001; Udén et al., 2005). Pois são muitos os fatores que causam variações nos resultados entre os laboratórios, como por exemplo, adaptação dos métodos para aumentar a produção ou até mesmo adaptação das limitações de equipamentos ou condições laboratoriais. De maneira complementar, é importante salientar que os resultados analíticos obtidos, de forma geral indicam apenas o conteúdo de um alimento e não o valor nutricional que o animal obterá ao comer, digerir e metabolizar o mesmo (Jung, 1997; Mertens, 2003).

Como forma de minimizar estas variações, Mertens (2003) cita que os diferentes métodos precisam apresentar inferência e reprodutibilidade. A inferência diz respeito à forma como o método irá fornecer uma informação correta e promoverá uma descrição adequada do alimento e a reprodutibilidade refere-se à capacidade do método ser reproduzido em duplicata em diversos laboratórios, apresentando resultados semelhantes para a mesma análise utilizando o mesmo alimento, garantindo assim a exatidão e precisão dos resultados.

Neste contexto, mesmo que o método de obtenção dos componentes fibrosos tenha sido padronizado por Mertens (2002) e indicado pela AOAC como método de referência. Existem métodos analíticos mais atuais, que apresentam diferenças entre si. A análise dos componentes fibrosos sem a exclusão de possíveis erros associados a estas diferenças podem comprometer seu uso, dificultando principalmente a comparação dos resultados. Segundo Mertens (2003), a aceitação de um método analítico baseia-se diretamente na sua capacidade de combinar o conceito de fibra e a sua reprodutibilidade entre os laboratórios.

Os métodos mais atuais apresentam um fator limitante para muitos laboratórios, e refere-se ao seu acesso e custo dos equipamentos, dificultando seu uso como método de análise de rotina. É importante evidenciar também que muitos destes métodos não são reconhecidos oficialmente, fazendo com que o sistema de detergente proposto por Van Soest (1963b) mesmo com suas modificações seja o mais utilizado, mesmo não determinando exatamente a composição dos componentes da parede celular.

Neste contexto, mais pesquisas devem ser realizadas com o intuito de eliminar os possíveis erros das análises, com o intuito de melhorar os métodos laboratoriais, e conseqüentemente obter resultados que apresentem precisão (Jung, 1997) e exatidão conforme a citação de Mertens (2003).

## DEFINIÇÃO E CONSTITUINTES DA FIBRA

Fibra é um termo nutricional, que pode ser somente determinada durante o processo digestivo e sua definição está diretamente vinculada à sua fonte e metodologia analítica empregada na sua determinação laboratorial (Mertens, 2003).

Os métodos laboratoriais utilizados químicos, enzimáticos ou gravimétricos, foram desenvolvidos para quantificar uma fração resistente à digestão e não uma substância vegetal reconhecível nas plantas, além da divisão das frações vegetais baseadas em suas estruturas e ligações químicas. Desse modo, sua acurácia e relevância é totalmente depende da metodologia analítica empregada (Mertens, 2003).

Apesar das divergências relacionadas à sua definição, a fibra é oriunda da parede celular dos tecidos vegetais, constituída por um conjunto de frações altamente complexas e heterogêneas (Jung, 2012), que possui uma mistura de polissacarídeos frequentemente associados a outros componentes, tornando-as resistentes à digestão enzimática, mas servindo de substrato para atividade fermentativa (Van Soest et al., 1991; Jung, 1997).

A fibra é classificada conforme seu estágio fisiológico, solubilidade em água e grau de fermentação em: fibra insolúvel e fibra solúvel, a fração insolúvel corresponde às frações insolúveis em solução detergente neutro como celulose e hemicelulose, que associadas à lignina constituem a fibra em detergente neutro; a fração solúvel corresponde às frações solúveis em detergente neutro, porém mais heterogênea que a fração insolúvel, constituída por ácidos orgânicos, açúcares simples, amido e frutanas, mais substâncias pécticas (Hall, 2007; Gern, et al. 2014; Da Silva, et al. 2018).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na parede celular das plantas e sua proporção varia de 20 a 40% na base seca (McDougall et al., 1993; Jung, 2012). Constituída por longas cadeias lineares de D-glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1,4 com alto grau de polimerização e peso molecular. Com estrutura fibrosa de caráter cristalino, sem ramificações e com conformação rígida e inflexível, apresenta alta resistência ao rompimento por diferentes substâncias químicas (Giger-Reverdin, 1995; Jung, 2012). Estas cadeias lineares encontram-se

ligadas entre si por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, sendo denominadas microfibrilas de celulose. Que se encontram compactadas e são responsáveis pela resistência mecânica dos tecidos que compõem, importante na avaliação de plantas forrageiras. Pois esta associação pode influenciar na sensibilidade da molécula de celulose à hidrólise enzimática microbiana (Giger-Reverdin, 1995; Macedo Júnior et al., 2007).

A hemicelulose está associada à celulose na parede celular, nos espaços intramoleculares das microfibrilas de celulose, atuam como uma massa pela forma como se conectam com os demais componentes estruturais. As hemiceluloses podem ser tanto polímeros lineares como ramificados, constituída de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização inferior ao da celulose (Giger-Reverdin, 1995). Plantas em estágio de maturidade mais avançado, encontram-se mais associadas à lignina por ligações covalentes do que a outros polissacarídeos, tornando-se indisponíveis à solubilização. Estas apresentam grande variação entre os tipos de hemiceluloses e espécies vegetais, constituindo cerca de 10 a 25% da base seca das plantas forrageiras (Giger-Reverdin, 1995). As hemiceluloses são divididas em quatro subgrupos, também denominados de glicanas que estão ligadas as microfibrilas que compõe a celulose através de pontes de hidrogênio, apresentando diferença estrutural (Macedo Júnior et al., 2007).

As pectinas estão presentes em grande quantidade nas paredes celulares e tecidos intracelulares de tecidos jovens sob a forma de protopectinas, contribuindo para rigidez, transporte e retenção de água. Constituídas por ácidos galacturônicos que apresentam ligações covalentes do tipo  $\alpha$ -1,4, intercalado com unidades de ramnosa, arabinose e galactase com ramificações de cadeias de unidades de pentose e hexose, diferindo-se entre si quanto ao grau de esterificação e número de metoxilações. Estas substâncias dividem-se em: ácidos pécnicos sem metoxilações; ácidos pectínicos com metoxilações que podem ser ou não solúveis em água; e as pectinas um subgrupo de ácidos solúveis em água (Grenet & Besle, 1991; Müller & Prado, 2004).

As ligninas são polímeros complexos de estrutura pouco conhecida e ligadas quimicamente à celulose e a hemicelulose (Geron et al., 2014). Constituída por polímeros condensados, de diferentes álcoois fenilpropanóides cujos precursores são os ácidos p-cumárico, ferúlico e sinápico, que irão condensar-se através de um processo oxidativo formando macromoléculas reticuladas, as

ligninas (Grenet & Besle, 1991; Jung, 1997; Jung 2012). A lignina é extremamente resistente à degradação química, fornece rigidez à parede celular, suporte estrutural e resistência física aos tecidos vegetais. Apresenta estrutura condensada, através de ligações covalentes carbono-carbono e ligações do tipo éter ou éster. Devido a estas ligações, se torna extremamente resistente à ação hidrolítica de ácidos e bases, além disso, sua composição, estrutura e quantidade são variáveis no tecido vegetal (Grenet & Besle, 1991; Jung, 1997; Jung, 2012). Segundo Van Soest (1967b), esta resistência retarda o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para sua quantificação.

À constituição da fibra é bastante variável e depende de diversos fatores. Principalmente fatores associados à espécie vegetal, entre variedades, dentro da mesma espécie e entre órgãos ou tecidos, dependendo da fase de desenvolvimento e/ou maturidade do tecido vegetal (Jung, 1997; Knudsen, 2001; Segura et al., 2007).

Devido a esta variação, muitas propostas analíticas são encontradas na literatura para determinação das frações fibrosas, e, elas dividem-se em dois grupos: os gravimétricos e o enzimático-gravimétrico (**Tabela I**).

#### DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO FIBROSA, ALTERAÇÕES METODOLÓGICAS E LIMITAÇÕES DE USO

Segundo Van Soest (1964), Einhoff em 1809 foi o primeiro pesquisador a tentar separar a fração fibrosa dos alimentos, através da maceração de material fibroso em água, filtração e pesagem do resíduo. Em 1859, o método conhecido como sistema de análise proximal ou método de Weende para determinação da fibra bruta, foi padronizado na Estação Experimental de Weende (Van Soest & Robertson, 1985). Método este que consiste em duas extrações consecutivas e o alimento é tratado com duas soluções, uma ácida e outra alcalina; na primeira extração com o uso de uma solução ácida diluída ocorre remoção de amido, açúcares simples, parte da pectina e da hemicelulose; e na segunda extração com o uso de uma solução alcalina diluída ocorre remoção de proteínas, pectinas, parte da lignina e hemicelulose remanescentes. O resíduo final é lavado com água quente e álcool, seco em estufa, pesado, por fim incinerado e determinado a cinza. A fibra bruta é determinada por subtração da cinza ao resíduo final (Jung, 1997; Knudsen, 2001).

Posteriormente o método de Wennde foi contestado, uma vez que após análise dos resíduos, foi verifica-

**Tabela I.** Métodos gravimétricos e o enzimático-gravimétrico (Gravimetric and enzymatic-gravimetric methods).

Métodos	Análises	Autores
	Fibra bruta	Weende (1859)
Gravimétrico	Fibra em detergente neutro e Fibra em detergente ácido	Van Soest (1963)
	Fibra em detergente ácido	Goering & Van Soest (1970)
	Fibra detergente neutro	Van Soest & Wine (1967)
	Fibra em detergente neutro enzimático (FDNe)	Van Soest & Robertson (1985)
Enzimático-gravimétrico	Matéria orgânica fibrosa tratada com amilase e livre de amido ("aFDNm")	Merntes (2002)

do que a fibra bruta é constituída de celulose acrescida de pequenas quantidades de lignina e hemicelulose. Fazendo com que o método se tornasse limitado, devido à solubilização da lignina, um componente indigestível (Van Soest, 1964) e também da hemicelulose (Van Soest, 1967b) um carboidrato fibroso. Segundo Van Soest (1967b) a quantidade de lignina solubilizada neste método, é removida na segunda extração pela solução alcalina junto com a hemicelulose, fazendo com que estas frações se tornem parte da fração do extrativo não nitrogenado. E que a digestibilidade do extrativo não nitrogenado se torne inferior ao da fibra bruta devido à presença da lignina, principalmente (Van Soest, 1967b; Jung, 1997; Mertens, 2003).

Devido à problemática supracitada, Van Soest (1963a) desenvolveu a técnica conhecida como sistema de detergentes, com intuito de isolar a fração fibrosa e desenvolver um método mais efetivo para substituir o método da fibra bruta. Este foi inicialmente desenvolvido para isolar a fibra dietética insolúvel e os constituintes da parede celular das plantas tais como: celulose, hemicelulose e lignina (Van Soest & Wine 1967a; Van Soest & Robertson, 1985; Segura et al., 2007; Geron, et al. 2014).

Ainda nos anos 60, nos EUA a organização americana AOAC (Association of Official Analytical Chemists) oficializou o método de Weende para determinação da fibra bruta, mesmo com as limitações supracitadas. Em 1963 a AOAC reconheceu o método conhecido como Método de Detergente Ácido para determinação de fibra e lignina desenvolvida por Van Soest, já que não era difícil sua padronização entre os laboratórios de análises químicas (Jung, 1997; Udén et al., 2005; Segura et al., 2007). Rapidamente este método substituiu o método de Weende, visto que foi caracterizado como um método mais simples e que resultava em valores similares aos encontrados pelo método de Weende.

No entanto, segundo Mertens (2003) a metodologia de detergente ácido é utilizada para minimizar as perdas de lignina, assim não se encaixa na definição nutricional de fibra dietética. Porque as hemiceluloses em detergente ácido são retiradas e a pectina que é um carboidrato rapidamente fermentável não é removida, tornando-se um método inadequado para estimativa da fração fibrosa. Possivelmente a precipitação da pectina neste método pode ser o motivo pela qual, alguns alimentos com alta quantidade de pectina apresentam resultados de fibra em detergente ácido superior à fibra em detergente neutro.

Em 1967a, Van Soest & Wine desenvolveram o método do Detergente Neutro, onde os resultados encontrados de fibra bruta foram superiores aos obtidos até 1967, por permitir maior isolamento das frações da parede celular a metodologia de fibra em detergente ácido tornou-se menos interessante para determinação da fibra.

Segundo Van Soeste (1967b) a metodologia de fibra em detergente ácido foi desenvolvida como um passo analítico preparatório para determinação da lignina e nunca foi utilizada para medir a fibra nos alimentos. Além de auxiliar na estimativa da lignina, a metodologia de detergente ácido possibilita a determinação de

celuloses, nitrogênio insolúvel em detergente ácido e cinzas insolúveis em ácido e sílica (Udén et al., 2005). A fibra em detergente ácido é determinada por refluxo, a quente, de uma amostra em solução contendo ácido sulfúrico (Van Soest, 1967b; MertenS, 2002).

A determinação dos teores de Fibra em Detergente Neutro baseia-se na solubilização da parede celular dos alimentos e através da filtração separa-se a parede celular do conteúdo celular. Contudo, parte da pectina acaba sendo solubilizada e quantificada como conteúdo celular, mesmo assim tornou-se rotina frequente nos laboratórios de análises química de alimentos (Berchielli et al., 2001).

A Fibra em Detergente Neutro é caracterizada como fração que ocupa espaço no trato gastrointestinal e possui digestibilidade inconstante (Mertens, 2002) podendo afetar o consumo, apresentando a necessidade de reduzir o tamanho de suas partículas através da mastigação para facilitar os processos digestivos (Mertens, 2003). Já o conteúdo solúvel em detergente neutro, é altamente digestível e totalmente fermentável no rúmen (Van Soest, 1964; 1967b), ocupando pouco espaço no trato (Jung, 1997; Mertens, 2003). Caracterizando-se como uma fração padrão por permitir a separação de suas frações durante a ingestão e digestibilidade.

O sistema proposto por Van Soest utilizou o conceito desenvolvido por Lucas de entidades nutricionais ideais, na qual a finalidade era identificar a uniformidade das frações químicas que constituía os alimentos, digestibilidade verdadeira e perda endógena constante. Os mesmos autores citaram que se o alimento fosse analisado por este conceito, o seu valor nutricional poderia ser derivado da soma do produto de cada entidade nutricional (Macedo Júnior et al., 2007).

No entanto, Van Soeste (1967b) demonstrou, que a parede celular dos alimentos não se comporta de maneira uniforme como o conceito proposto, o que impossibilita o uso de uma única fração pra prever a digestibilidade da matéria seca. Mesmo a fibra em detergente neutro, não se apresentando uniforme conforme o conceito recomendado, o conteúdo solúvel em detergente neutro pode ser considerado uma entidade nutricional ideal e uniforme por apresentar-se quase que completamente disponível (98%) (Macedo Júnior et al., 2007). Ademais, neste sistema de detergente o alimento é dividido em fração solúvel, a qual é rapidamente e completamente disponível, e fração insolúvel, que é lenta e completamente indisponível.

No método original de determinação da fibra em detergente neutro é utilizado soluções com diversos reagentes, no qual cada um possui uma função específica. Deste modo, utiliza-se uma solução detergente neutro constituída de tetraborato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), hidrogenofosfato de sódio, lauril sulfato de sódio e trietilenoglicol. Em que as soluções tampão a base de borato e fosfato são utilizadas para manter o pH próximo de 7,0 para evitar a solubilização da hemicelulose e lignina; o sulfato de láurico de sódio e o sulfito de sódio para remover as proteínas; o ácido EDTA por ser quelante, auxilia na solubilização das proteínas e pectinas e o trietilenoglicol para solubilização dos amidos. Entretanto, o

método recupera celulose, hemicelulose e lignina, com alguma contaminação por proteínas, pectinas e amido. Associado a lavagem do resíduo fibroso com água quente para remoção da matéria não fibrosa, seguido do uso de acetona para remoção completa de lipídios e pigmentos na maioria das amostras (Van Soest, 1967; Mertens, 2002; 2003).

Gradativamente, o método original desenvolvido por Van Soest & Wine sofreu diversas modificações em uma ou outra etapa analítica com o intuito de abranger uma série de alimentos. Principalmente os ricos em amido e pectinas, taninos e produtos da reação de Maillard (VAN SOEST et al., 1991; Geron, et al. 2014). Segundo Van Soest et al. (1991) e Mertens (2002), os elevados valores de fibra em detergente neutro obtidos em alimentos concentrados e forragens, poderiam estar associados às dificuldades práticas na etapa de filtração, sugerindo que o detergente neutro não era eficiente na solubilização principalmente do amido (Hall, 2007). Assim, em 1982 Mongeau & Brassard recomendaram uma alteração do método original, através da inclusão de  $\alpha$ -amilase, com intuito de eliminar o amido. Fazendo com que o mesmo fosse gelatinizado e hidrolisado com amiloglucosidase, por isso, as amilases têm sido utilizadas até o presente momento na determinação da fibra em detergente neutro (Van Soest et al., 1991; Hall, 2003; Valente et al., 2011b).

No método tradicional de Van Soest & Wine o éter monoetilenoglicol era utilizado para a solubilização do amido, contudo foi substituído pelo trietilenoglicol (Van Soest et al., 1991). A decalina, agente antiespumante foi retirada, pois ocasionava aumento nos teores de fibra em detergente neutro por remover a lignina. O sulfito de sódio era utilizado para remoção das contaminações por proteínas, por não removê-las totalmente e degradar a lignina foi retirado da metodologia. Van Soest & Robertson (1985) alteraram o método original através da exclusão de sulfito de sódio, e inclusão de  $\alpha$ -amilase para remoção de amido; o método de Van Soest et al. (1991) mantiveram a  $\alpha$ -amilase e recomendaram o uso alternativo de sulfito de sódio, sem a decalina e com o uso do trietilenoglicol. O método de Mertens (2002) recomenda o uso do sulfito de sódio e da  $\alpha$ -amilase, além do uso de sistema de refluxo com condensadores para extração do conteúdo celular, filtração e retenção do resíduo insolúvel em cadinhos filtrantes.

David Mertens, em 1980 começou a padronizar a análise de fibra em detergente neutro entre os laboratórios dos EUA, concluindo que a única forma de reduzir os erros entre os mesmos seria através da análise de todos os tipos de alimentos a partir de um único método analítico (Udén et al., 2005; Segura, et al., 2007). Desse modo, foi recomendado que todos os alimentos deveriam ser analisados com o uso de  $\alpha$ -amilase, sulfito de sódio e corrigidos para cinzas. Ademais, foi determinado também que o material residual como a matéria orgânica fibrosa tratada com amilase e livre de amido ("aFDNmo") fosse definida como entidade nutricional (Mertens, 2002; 2003; Udén et al., 2005; Segura, et al., 2007).

A correção para cinzas permite eliminar erros provenientes da lavagem inadequada dos resíduos, e permiti estimativa dos carboidratos não fibrosos, por diferença (Mertens, 2002). Permitindo, excluir os constituintes de parede celular como polissacarídeos e pectina, que apresentam rápida fermentação e digestão, assemelhando-se ao conteúdo celular. Mertens (2002), ainda recomenda que as aFDNmo, além de ser conduzida com soluções padronizadas de  $\alpha$ -amilase, tenha o branco, para correção de possíveis erros relacionados principalmente a pesagem da amostra (Da Silva et al., 2018).

O método de Mertens (2002) foi adotado como método oficial pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002), mesmo com falhas técnicas, como dificuldades na filtração e remoção do amido, contaminações por proteínas, levando a inclusão de uma digestão enzimática com o recurso da  $\alpha$ -amilase. Este foi desenvolvido para todos os tipos de alimentos, desde plantas forrageiras, grãos, oleaginosas e subprodutos da agroindústria de origem animal. Contudo, apresenta modificações metodológicas quando comparada com o original e inclui a adição de sulfito de sódio para remoção das contaminações por proteínas e  $\alpha$ -amilase para remover contaminações por amido durante a etapa de extração com detergente neutro. Porém, o uso da  $\alpha$ -amilase requer a padronização industrial a cada nova análise.

Os métodos desenvolvidos e recomendados por Van Soest et al. (1991) e por Mertens (2002) são distintos. Van Soest et al. (1991) citam que a utilização de sulfito de sódio produz reações indesejáveis, que prejudicariam as proteínas da parede celular e poderiam solubilizar parte da lignina. Já Mertens (2002), cita que o sulfito de sódio não solubiliza a lignina e seu emprego é importante para remoção das contaminações por proteína.

Gomes et al. (2012), ao avaliar os efeitos do uso de sulfito de sódio em solução de detergente neutro na estimativa de compostos fibrosos em gramíneas e leguminosas tropicais. Observaram que o teor de FDN diminuiu quando foi utilizado sulfito de sódio, com maior redução nas leguminosas. Ademais, o sulfito de sódio reduziu o teor de FDA em ambas forrageiras. O teor de lignina foi reduzido pelo sulfito de sódio nas leguminosas, mas nenhum efeito foi observado nas gramíneas. A diminuição do teor de fibras nas leguminosas pode ser explicada pela solubilização da lignina. Contudo, a diminuição das fibras nas gramíneas não pode ser explicada somente pela diminuição da proteína contaminante e solubilização da lignina, provavelmente ocorreram perdas de outros compostos fibrosos.

Em síntese, os métodos analíticos são desenvolvidos com base em um método padrão. No caso do método da fibra bruta não existe um método padrão específico, somente um método referência recomendado pela AOAC, e o mesmo foi desenvolvido e melhorado gradativamente com base em um método empírico. Portanto, o método de determinação das frações fibrosas ainda se mantém empírico, e todas as etapas analíticas detalhadas por Mertens (2002) assim como qualquer modificação do método pode afetar o

que se mede como fibra (Gomes et al., 2012; Da Silva et al., 2018). Desta forma, os resultados provenientes do sistema detergente dependem rigorosamente das recomendações descritas nos protocolos.

Por fim, pode-se dizer que, mesmo que todos os pesquisadores adotem rigorosamente os protocolos, existem algumas limitações práticas, que podem acabar limitando a sua eficiência quanto à comparação dos resultados obtidos (Berchielli et al., 2001; Udén et al., 2005).

Neste contexto, a revista *Animal Feed Science e Technology* recomenda o uso do artigo de Mertens (2002) como referência principal para a análise da fibra em detergente neutro. Já para a análise de fibra em detergente ácido, recomenda-se o uso do manual AOAC com o número de identificação do procedimento especificado; e para análise de lignina e celulose é recomendado à quantificação sequencial a partir da oxidação da fibra detergente ácido em solução de permanganato de potássio, e através da queima do resíduo em mufla, respectivamente (Jung, 1997; Udén et al., 2005; Segura et al., 2007).

Dos três métodos utilizados para quantificar a fibra (Fibra em detergente neutro, Fibra em detergente ácido e Fibra buta), somente a fibra em detergente neutro consegue estimar os três maiores componentes indigestíveis ou incompletamente digestíveis das plantas: hemicelulose, celulose e lignina.

Mesmo seguindo as recomendações da Revista *Animal Feed Science e Technology*, o sistema detergente apresenta limitações práticas, relacionadas ao excesso de trabalho na realização das etapas de refluxo e filtração de cada amostra avaliada, o que acaba limitando sua eficiência no uso de recursos humanos, financeiros e até mesmo de infraestrutura dentro do laboratório (Berchielli et al., 2001; Udén et al., 2005). Assim, a escolha do método analítico a ser empregado, irá depender de alguns critérios, como o objetivo do pesquisador ou do laboratório, visto que cada método apresenta pontos positivos e negativos (**Tabela II**).

O método convencional e padronizado por Mertens (2002) sugere o uso de aparelho de refluxo com condensadores e com extração realizada em béqueres, e o resíduo final retido em cadinhos filtrantes individuais. Além deste, existem as metodologias que são conduzidas em ambientes totalmente pressurizados como o sistema Ankom®, que se baseia na digestão de amostras acondicionadas em saquinhos filtrantes submetidos à extração com detergente neutro. Diferente do método tradicional, esse sistema é menos trabalhoso e permite a análise de um grande número de amostras por dia, onde etapas como lavagem e filtração manuais são eliminadas. Porém, um dos entraves do uso deste sistema refere-se ao alto custo dos saquinhos utilizados, que são obtidos na própria empresa fabricante do equipamento (F57 - Ankom®) (Berchielli et al., 2001; Valente et al., 2011b).

Deste modo, com o intuito de reduzir os custos das análises referente ao uso dos saquinhos da Ankom®, muitas pesquisas já foram conduzidas com o uso de saquinhos elaborados com tecidos semelhantes como

o náilon e o tecido-não-tecido (TNT). Com objetivo de avaliar a eficiência do uso de saquinhos de náilon, F57 (Ankom®) e TNT na análise de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) de amostras com tamanho de partículas de 1 mm, Casali et al. (2009), observaram que os teores FDNi encontrado com F57 e TNT foram superiores aos obtidos com saquinhos de náilon, devido a perda de partículas. Valente et al. (2011b), com o mesmo objetivo, porém alimentos distintos, citaram que o uso dos saquinhos F57 e TNT resultou em estimativas precisas do conteúdo de FDN, diferente do saquinho de náilon também devido à perdas de partículas fibrosas subestimando o resultado.

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que os saquinhos de TNT se torna uma alternativa de substituição do F57 na redução dos custos das análises. Lanes et al. (2016) cita que possivelmente essa perda de partícula se deve dilatação da malha do saco de náilon no decorrer da etapa de refluxo.

Berchielli et al. (2001), seguiram a padronização do método convencional de Van Soest ao compararem os valores de fibra em detergente neutro (FDN) e de fibra em detergente ácido (FDA) de diferentes alimentos a partir do equipamento Ankom® com uso de quatro tipos de saquinhos, concluíram que os diferentes tipos de saquinhos não influenciaram os teores de FDN, com exceção das fezes bovina obtendo-se resultados de FDN inferiores. Não foi observada diferença entre os valores de FDN e FDA, nos resultados encontrados pelo equipamento Ankom® e método convencional, exceto para polpa cítrica, onde a FDA pelo Ankom® foi inferior ao obtido pelo método convencional.

Ferreira & Mertens (2007), também seguiram as recomendações descritas pela Ankom® e compararam os resultados com o método de Mertens (2002). Ao avaliarem a determinação de FDN sem a presença de sulfito, FDN com uso de  $\alpha$ -amilase e aFDN (com a presença de sulfito e de  $\alpha$ -amilase) utilizando dois métodos de extração e de refluxo com cadinhos filtrantes (Mertens, 2002) e Ankom®, em 33 amostras de silagem de milho. Concluíram que a ausência da  $\alpha$ -amilase no método Ankom® superestima os teores de FDN, possivelmente devido à gelatinização do amido dificultando a filtração dos resíduos. Não foi observada diferenças para as concentrações de aFDN nos dois métodos de extração, e a menor concentração de resíduo fibroso para FDN pode ser atribuída a uma menor contaminação protéica do resíduo fibroso.

Com o objetivo de comparar os valores do teor de fibra em detergente ácido (FDA) de 12 alimentos utilizando diferentes procedimentos analíticos: dois deles utilizando a técnica da Ankom®, um com tratamento direto da amostra em detergente ácido (D-ADF) e outro tratamento sequencial com solução de detergente neutro e ácido (D-ANDF); sendo o terceiro procedimento o métodos convencional de Goering e Van Soest (1970) (VS). Danelón et al. (2013), observaram que os resultados encontrados diferiram entre si para todos os procedimentos (24,58, 27,83 e 28,01%). O teor de FDA encontrado no procedimento com tratamento direto da amostra foi superior ao procedimento sequencial, com exceção do milho. Possivelmente de-

**Tabela II.** Resumo do uso e limitações dos principais métodos analíticos utilizados na determinação das frações fibrosas de plantas forrageiras. Adaptado: SEGURA et al., 2007 (Summary of the use and limitations of the main analytical methods used in the determination of fibrous fractions of forage plants. Adapted : SEGURA et al., 2007).

Métodos	Frações medidas	Limitações	Descrições
Fibra Bruta	Parte da parede celular que sobrevive à digestão sob solução ácida e alcalina.  A celulose e a lignina são recuperadas em grande proporção.	Solubilização da lignina e hemicelulose.  Superestima o valor de fibra bruta.	Consiste em duas extrações consecutivas: na primeira o alimento é submetido à solução ácida e a segunda sob uma solução alcalina. O resíduo é lavado com água quente e álcool, seco, pesado, por fim incinerado e determinado a cinza.  A fibra bruta determinada por subtração da massa da cinza à massa do resíduo final.
Fibra em detergente neutro (FDN)	Fração do alimento que não é completamente digerida, com recuperação quase completa da parede celular.	Recuperação parcial de pectinas.  Remoção de proteína e amido.	Van Soest (1967): semelhante ao método de Weende, só que é utilizado extrações químicas com uma solução de detergente neutro sob-refluxo.  Mertens (2002): semelhante ao método de Van Soest, com a inclusão de uma digestão enzimática através da $\alpha$ -amilase.
Fibra detergente ácida (FDA)	Porção de parede celular.	Parte da lignina é solubilizada.  Precipitação da pectina.	Van Soest (1967): semelhante ao método detergente neutro, só que é utilizado extrações químicas com solução de detergente ácido sob-refluxo.  Método de análise aprovado pela AOAC (2002).
FDN - FDA	Hemicelulose	Limitações dos métodos FDN e FDA.	FDN - FDA
Lignina	Lignina	Solubilização da lignina na metodologia de FDA.	Quantificação sequencial a partir da oxidação da fibra detergente ácido em solução de permanganato de potássio, e através da queima do resíduo em mufla.
FDA - Lignina	Celulose	Limitações dos métodos FDA e Lignina.	Metodologia de FDA.  Quantificação sequencial a partir da oxidação da fibra detergente ácido em solução de permanganato de potássio, e através da queima do resíduo em mufla.

vido à remoção de frações do alimento pelo detergente neutro, como por exemplo, substâncias pécicas.

Da Silva et al. (2018), ao comparar métodos alternativos para análise de FDN com o método oficial recomendado pela AOAC em sistema de refluxo e cadinhos filtrantes, utilizando 20 alimentos manipulados por três analistas. Sendo os métodos alternativos: refluxo em béqueres com bicos, sistema Ankom®, sistema Tecnal® e Micro-FDN (Autoclave). Quanto a variabilidade dentro do laboratório para a  $aNDF_{om}$  observaram que o efeito do componente método-alimento-analista, foi sem efeito significativo para o componente de variância do analista. Com interação significativa entre método-alimento para  $aNDF_{om}$ . Portanto, o efeito dos métodos dentro do alimento e vice-versa revelaram contrastes significativos entre métodos alternativos e de referência para  $aNDF_{om}$ . Os métodos de refluxo e cadinhos filtrantes não apresentaram diferenças, independente do alimento analisado. Contrastes significativos demonstraram a falta de qualidade dos métodos alternativos usados para medir a fibra insolúvel em comparação com os métodos de referência. Barbosa et al. (2015), citam que que o método da autoclave pode ser substituído pelo método convencional, pois gera resultados precisos.

Em experimento com o objetivo de comparar os resultados obtidos pela análise de FDN e FDA não sequencial e sequencial através do método convencional proposto por Van Soest et al. (1991) e alternativo com uso do autoclave com diferentes saquinhos (Ankom®, TNT e cadinhos filtrantes). Lourenço et al.

(2017), observaram que a precisão das análises dos teores de FDN e FDA não apresentaram diferença quanto à análise não sequencial e sequencial, em todos os alimentos e métodos utilizados, com exceção da determinação de FDA na silagem de milho, possivelmente devido ao elevado teor de amido que foi gelatinizado dentro do filtro durante o processo de fervura. Assim, a precisão analítica dos métodos alternativos bem como sua utilização, quando comparado ao método convencional, depende do alimento analisado.

Ao comparar o uso de equipamentos alternativos como o digestor de fibra e o autoclave com saquinhos de nylon (50  $\mu$ m) e de TNT (100g/m<sup>2</sup>) na determinação da FDN e da FDA ao método convencional, Farias et al. (2015), concluíram que o teor de FDN obtido com tecido de TNT nos dois equipamentos não diferiram dos encontrados pelo método convencional. Contudo, o uso do tecido nylon nos dois equipamentos foi semelhante, indicando ser uma possível alternativa ao método convencional. Não houve diferença entre os métodos alternativos de análise da FDN. Os teores da FDA diferiram entre os equipamentos e tecidos avaliados. No entanto, os valores obtidos com o tecido nylon no equipamento digestor foi semelhante ao método convencional, podendo ser uma alternativa prática para análises da FDA. O teor da FDN e o teor da FDA obtido no equipamento digestor de fibra, com o tecido nylon, foi semelhante ao método convencional.

Neste contexto, as modificações realizadas no método convencional de Van Soeste e Van Soeste & Wine,

são distintas entre si e apresentam vantagens e desvantagens. No Brasil, a grande maioria dos artigos publicados utiliza a metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002), que possui como base a metodologia recomendada pela AOAC. Lanes et al. (2016), avaliaram os teores de FDN e FDA em amostras de alimentos e fezes bovina. Através do método convencional, seguindo as recomendações de Silva & Queiroz (2002), e do automatizado com saquinho de TNT (Tecnal® - 149). Concluíram que o método automatizado não diferiu do método convencional quanto à concentração de FDN em forragem tropical, fezes e amostras de silagem de milho. Não sendo eficiente para as amostras com elevado teor de amido, mesmo utilizando  $\alpha$ -amilase.

Geron et al. (2014), avaliaram o teor de FDN e FDA de quatro capins através de três métodos: o convencional, o da Ankom® e o adaptado pela EMBRAPA. Os autores observaram que os teores de FDN e FDA dos capins obtido pelos diferentes procedimentos não diferiram entre si. Recomendando o procedimento adaptado pela EMBRAPA, uma vez que este não diferiu em relação à metodologia convencional e da Ankom®, além de apresentar menor gasto com reagentes e conseqüentemente menor custo. Vale ressaltar que os autores utilizaram as recomendações de Silva & Queiroz (2002).

As pesquisas apresentadas visam à obtenção de métodos alternativos de análise que apresentem precisão e exatidão, sejam mais econômicas e que reduzam o tempo de trabalho quando comparado com o método convencional que possui uma série de etapas laboriosas. Dessa forma, o sistema de detergente neutro continuará sendo empírico e sua acurácia, reprodutibilidade e inferência de seus resultados dependem da condução rigorosa de toda as etapas analíticas, para então produzir resultados comparáveis e aceitáveis quanto à quantidade de fibra segundo a sua definição.

#### PROBLEMAS ANÁLITOS E IMPLICAÇÕES DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DOS COMPONENTES DA PARADE CELULAR

Segundo Jaurena et al. (2012), esta se tornando cada vez mais comum o aparecimento de erros de interpretação de resultados de análise química dos alimentos. Assim, é importante salientar mais uma vez que existe a necessidade de padronização das terminologias utilizadas nos métodos analíticos (Udén et al., 2005).

Mertens (2003) cita que antes de discutir qualquer variação analítica existente, é importante salientar alguns pontos críticos, como por exemplo: todos os resultados analíticos são apenas percussores do valor nutricional real de uma grande quantidade de alimento; a variabilidade pode ser natural e inevitável; a variação pode ser dividida em precisão e exatidão; a reprodutibilidade e inferência estatística são necessárias para detectar diferenças e fornecer intervalos de confiança adequado para os resultados. No entanto, é importante salientar que atualmente um dos maiores problemas relacionados à variação analítica é a seleção dentre as várias possibilidades existentes do melhor método a

ser utilizado para determinação da composição químico-bromatológica do alimento (Hall, 2007).

Os resultados provenientes da avaliação dos alimentos estão vulneráveis a qualquer variação, no entanto, a variação intrínseca e extrínseca da qualidade do alimento utilizado na formulação de dietas faz com que ocorra uma maior variabilidade dos resultados analíticos. As fontes de variações intrínsecas referem-se às características próprias do alimento que os diferem dos demais e estão relacionadas às propriedades físicas, químicas e nutricionais. Já as variações extrínsecas são aquelas estranhas à natureza do alimento e estão associadas, por exemplo, à amostragem, aos procedimentos analíticos e a qualidade dos reagentes utilizados (Jaurena et al., 2012).

Neste cenário, é importante considerar o primeiro ponto crítico citado por Mertens (2003), de que todos os resultados obtidos são apenas preditores do valor nutricional real de uma grande quantidade de alimento. Provavelmente, o principal problema consiste no fato de executar com precisão uma amostragem representativa do material a ser analisado. Associado a amostragem, vale ressaltar que a amostra enviada ao laboratório será moída, para se obter partículas com tamanho de 1mm e somente uma parcela desta (1g) será analisada (Mertens, 2002). Porém, mesmo que mais de um laboratório analise uma parcela da amostra principal, é possível que os resultados encontrados sejam diferentes. Já que as parcelas não são as mesmas, o segundo ponto crítico supracitado pode ser estabelecido, onde a variação é normal e inevitável. Devido à pequena quantidade de amostra analisada, é provável que o resultado encontrado seja somente uma estimativa adequada da composição média do todo, desde que a amostragem inicial e a análise sejam realizadas de forma correta. Assim, a amostragem do material a ser analisado é provavelmente a fonte de variação mais importante de erro dos métodos analíticos (Undersander et al., 1993).

Valente et al. (2011a), com o objeto de avaliar a influência do tamanho da partícula (1 e 2 mm) sobre os teores da FDN utilizando saquinhos de náilon, F57 (Ankom®) e TNT. Concluíram que a moagem deve ser feita utilizando-se peneiras de porosidade 1mm para que haja correta extração do conteúdo celular pelo detergente neutro e ação eficiente da enzima  $\alpha$ -amilase termoestável, já que o uso de partículas com 2 mm conduziu à uma superestimação dos teores da FDN. Quanto ao material utilizado para o acondicionamento da amostra, os resultados demonstraram que os tecidos F57 e TNT proporcionaram estimativas acuradas dos teores da FDN. Por sua vez, a exatidão dos resultados obtidos com tecido de náilon foi comprometida, devido à perda de partícula. Com base nos resultados era esperado que as amostras moídas a 2 mm iriam superestimar os teores de FDN, porque a área de superfície da amostra era tanto quanto maior para penetração do detergente neutro quando comparado com as amostras de 1 mm. O contrario também é valido, amostras moídas com tamanho de partículas menores que 1 mm podem ser lavadas e perdidas na etapa de filtração. Além do que, as partículas com tamanho de 2 mm podem tampar a membrana do filtro, dificultando a etapa de filtração.

Mesmo com a ocorrência de possíveis erros associados às etapas de preparação da amostra a ser analisada, Mertens (2003) e Hall (2007), citam que a variação pode ser dividida em precisão e exatidão, associado à reprodutibilidade e inferência estatística para detectar diferenças e fornecer intervalos de confiança adequado para os resultados. A precisão refere-se à ausência de variação entre os resultados de uma mesma análise e mesmo alimento entre laboratórios. Já a exatidão está relacionada com o resultado, no qual o mesmo deve ser autêntico ou verdadeiro (mais próximo do real).

Para se encontrar resultados precisos é importante que os laboratórios realizem suas análises em duplicatas, para obter um resultado médio mais próximo do valor real. Segundo Undersander et al. (1993), existem valores de desvio padrão, que ao realizar as análises em duplicatas devem ser aceitos, contudo se os valores encontrados forem superiores ou inferiores ao valor real, será necessário realizar novas análises laboratoriais.

Contudo, existe um fator importante que pode afetar a variação da análise e refere-se à heterogeneidade das plantas forrageiras e da sua fibra, assim como a heterogeneidade dos demais alimentos utilizados na formulação de dieta de animais ruminantes e não-ruminantes. Os constituintes das plantas forrageiras como folha e caule, por exemplo, possuem composição distinta independente do seu estágio fisiológico e um resultado verdadeiro da composição químico-bromatológica para comparação dos resultados irá depender de uma amostra e uma parcela representativa do todo. Por este motivo as análises realizadas em duplicatas ou até mesmo triplicatas permitem a obtenção de informações adicionais, para detectar possíveis diferenças através do cálculo da média e do desvio padrão da amostra.

Mertens (2003) cita que reprodutibilidade é a capacidade do método ser reproduzido em duplicatas em diversos laboratórios, com resultados semelhantes para a mesma análise utilizando o mesmo alimento, garantindo a exatidão e precisão. Já a inferência diz respeito à forma como o método irá fornecer uma informação correta e promoverá uma descrição adequada do alimento. Segundo Jaurena et al. (2012), a variação proveniente dos laboratórios apresentam duas causas específicas: a variabilidade intralaboratorial, que refere-se a variação existente dentro do mesmo laboratório; e a variabilidade interlaboratorial, que refere-se as variações observadas entre diferentes laboratórios.

Provavelmente, esta variabilidade pode estar relacionada a pequenos erros de rotina, diferença entre equipamentos e reagentes utilizados, falta de calibração dos equipamentos ou até mesmo diferenças observadas nas parcelas que são retiradas da amostra principal enviada para análise que não é completamente homogênea. Todavia, existe a adaptação das metodologias para aumentar a eficiência laboratorial e economizar tempo. Mas parte desta variabilidade pode ser reduzida através do uso rigoroso dos protocolos, treinamento dos analistas e familiarização dos mesmos com a metodologia utilizada.

Vale ressaltar ainda que, atualmente, esta variabilidade é facilmente observada através de análise estática, onde os erros relacionados aos métodos analíticos são facilmente detectáveis pela comparação dos resultados encontrados aos provenientes do método de referência.

Mertens (2002; 2003) cita que para que um método seja considerado ideal, a variação interlaboratorial tem que ser igual a zero e a variação intralaboratorial tem que ser igual à variação entre as análises provenientes das duplicatas ou triplicatas. Estes resultados são verificados através de estudos colaborativos voluntários realizados pela AOAC e A National Forage Testing (NFTA), com o intuito de quantificar as variações analíticas e estabelecer reprodutibilidade aceitável, através da geração de resultados analíticos reproduzíveis e comparáveis para análise de rotina. O mesmo envolve cerca de 8 ou mais laboratórios, que analisam cerca de 5 amostras em duplicata através da metodologia de rotina utilizada nos mesmos. Os resultados são então submetidos a três análises estatística e averiguado pela organização responsável pelo estudo colaborativo.

Hristov et al. (2010), em estudo colaborativo para avaliar a variabilidade em análises da aFDN, encontraram alta variação nos procedimentos analíticos utilizados entre os laboratórios, possivelmente devido a falta de rigorosidade em seguir todas as etapas do protocolo disponível. Os mesmos avaliaram a variabilidade para análise aFDN entre 14 laboratórios participantes, através do uso do sistema tradicional em refluxo e da Ankom®. Concluíram que os resultados da aFDN não diferiram entre si para os 14 laboratórios participantes, porém foi observado diferença entre os laboratórios dentro da mesma técnica e alta incidência de outliers para o método Ankom®. E enfatizaram a necessidade dos laboratórios seguirem exatamente o protocolo do método oficial, sendo recomendado que os laboratórios realizassem controles de qualidade de equipamentos e procedimentos utilizados.

Diante deste contexto, é importante salientar que todos os métodos analíticos disponíveis para determinação dos constituintes da parede celular são empíricos (Mertens, 2003). A fibra é definida pelo método de análise e sua fonte, assim qualquer modificação no método analítico pode determinar um novo valor de fibra que não é comparável com aquele proveniente do método convencional (Hall, 2007). Assim, os resultados provenientes das análises laboratoriais apresentam alguma indeterminação, proveniente de erros associados aos pontos críticos citados por Mertens (2003). Que podem ser minimizados, melhorando-se os aspectos relacionados às metodologias e equipamentos utilizados e treinamento pessoal, além da exatidão no uso dos protocolos para que os resultados apresentem reprodutibilidade e repetibilidade.

Associado a estas melhorias, é importante a realização de mais pesquisas, que apresentem o intuito de desenvolver novos métodos analíticos que forneçam resultados confiáveis e rotina laboratorial mais rigorosa.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso dos métodos analíticos permite estimar a composição e a disponibilidade das diferentes frações da parede celular, mas a incorreta interpretação dos resultados e a variabilidade dos constituintes da parede celular exige conhecimento das diferentes metodologias analíticas.

Contudo, os métodos analíticos, tradicionais ou alternativos, ainda são empíricos. Visto que um ponto negativo quanto ao grande número de metodologias analíticas, que apresentam resultados distintos para uma mesma análise, é a análise e a comparação dos

resultados, já que se baseiam na própria variabilidade dos seus dados para inferir o quanto melhor ou maior é o seu resultado quando comparado a um valor referencial ou padrão intra ou interlaboratorial. Neste contexto, esse valor referencial ou padrão é proveniente do método tradicional, que acaba se tornando “ruim” quando existe uma variação de resultados muito grande entre os métodos analíticos. Que podem ser minimizadas, pela melhoria dos procedimentos metodológicos, equipamentos usados e treinamento pessoal. Além da exatidão no uso dos protocolos para que os resultados apresentem reprodutibilidade e repetibilidade.

As metodologias analíticas alternativas que apresentam acurácia, reprodutibilidade e repetibilidade quando comparado ao método tradicional de Van Soest, Van Soest & Wine ou ao método referencial de Mertens parecem ser viáveis na determinação dos constituintes das frações fibrosas.

Assim o aperfeiçoamento dos métodos analíticos é de suma importância para estimativa do valor nutritivo dos alimentos. Pois, as limitações dos métodos analíticos, parecem estar relacionadas à incapacidade de solubilizar de forma adequada as frações solúveis e parte das frações insolúveis, que acabam sendo parcialmente solubilizadas.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado.

## BIBLIOGRAFIA

- Barbosa, MM, Detmann, E, Rocha, GC, Franco, MO, Valadares Filho, SC 2015, Evaluation of laboratory procedures to quantify the neutral detergent fiber content in forage, concentrate, and ruminant feces. *Journal of AOAC International*, vol. 98, no. 4, pp. 883-889.
- Berchielli, TT, Sader, APO, Tonani, FL, Paziani, SF, & Andrade, P 2001, Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKOM. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 30, no. 5, pp. 1572-1578.
- Berchielli, TT, Pires, AV, & Oliveira, SG, 2006, Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2011. 583 p.
- Casali, AO, Detmann, E, Valadares Filho, SC, Pereira, JC, Cunha, M, Detmann, KSC, & Paulinho, MF 2009, Estimativa de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.38, no. 1, pp.130 - 138.
- Danelón, JL, Guaita, MS, Fay, P, Chifflet, S, Wawrzkiwicz, M, & Fernández, HM 2013, Technical note: comparison of three analytical procedures to estimate the acid detergent fiber concentration in feeds of widespread use in argentina. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, vol. 21, no 2. pp. 131-134.
- Detmann, E, Paulino, MF, Mantovani, HC, Valadares Filho, SC, Sampaio, CB, Souza, MA, Lazarrini, I, & Detmann, KSC 2009, Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using *Michaelis-menten* kinetics. *Livestock science*, vol. 126, pp. 136 - 146.
- Farias, JS, Queiroz, LO, Santos, GRA, Fagundes, JL, & Silva, MA 2015, Avaliação de tecidos e equipamentos alternativos na análise de fibra em detergente neutro e de fibra em detergente ácido. *Boletim Industrial Animal*, vol. 72, no 3. pp. 229 - 33.
- Ferreira, MB, & Mertens, DR 2007, Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 133, pp. 335 - 340.
- Giger-Reverdin, S, 1995, Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. *Animal Feed Science Technology*, vol. 55, pp. 295 - 334.
- Gomes, DI, Detmann, E, Valadares Filho, SC, Mezzomo, R, Souza, NKP, Queiroz, AC, & Detmann, KSC, 2012, Evaluation of sodium sulfite and protein correction in analyses of fibrous compounds in tropical forages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 41, no. 1, pp. 225-231.
- Grenet, E, & Besle, JM, 1991, Microbes and fiber degradation. In: JOUANY, J.P. (Ed.). Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Paris: INRA, 1991. p. 107-129.
- Gomes, DI, Detmann, E, Valente, TNP, Valadares Filho, SC, & Queiroz, AC 2011, Avaliação laboratorial de compostos fibrosos em alimentos e fezes bovinas sob diferentes ambientes físicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol.63, no. 2, pp. 522 - 525.
- Hall, MB 2003, Challenges with nonfiber carbohydrate methods. *Journal of Animal Science*, vol. pp. 3226 - 3232, 2003.
- Hall, MB 2007, Methodological challenges in carbohydrate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.36, suplemento especial, pp.359 - 367.
- Hristov, A, Mertens, D, Zaman, S, Vander Pol, M, & Price, W 2010, Variability in feed and total mixed ration neutral detergent fiber and crude protein analyses among commercial laboratories. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 11, pp. 5348 - 5362.
- Jaurena, G, Wawrzkiwicz, M, & Colombatto, D 2012, Propuesta de terminología para los reportes de laboratorios de nutrición animal. Nota Técnica. *Revista Argentina de Producción Animal*, vol. 32, no. 2, pp. 135 - 147.
- Jung, HG 1997, Jung Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. *The Journal of Nutrition*, vol. 127, pp. 810 - 813.
- JUNG, HJG, 2012, Forage digestibility: the intersection of cell wall lignification and plant tissue anatomy. Department of Agronomy and Plant Genetics, Department of Animal Sciences, University of Minnesota, USA, 2012, p. 162 - 173.
- Knudsen, KEB 2001, The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 90, pp. 3 - 20.
- Lanes, ECM, Lopes, FCF, Campos, NR, Oliveira, JS, & Morenz, MJF 2016, Frische-Neto, R 2016, Comparative efficacy of the conventional and automated methods for determining neutral and acid detergent fiber. *Comunicata Scientiae*, vol. 7, no. 1, pp. 30-37.
- Lourenço, MS, Messana, JD, Sader, APO, Canesin, RC, Malheiros, EB, Castagnino, PS, & Berchielli, T. 2017, Comparison of laboratory methods to assess fiber contents in feedstuffs. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, vol. 30, pp. 21-29.
- Macedo Júnior, GL, Zanine, AM, Borges, I, & Pérez, JRO 2007, Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. *Ciência Animal*, vol.17, no. 1, pp. 7 - 17.
- Mertens, DR 2002, Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, vol. 85, no. 6, pp. 1217 - 1240.
- Mertens, DR 2003, Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *Journal of Animal Science*, vol. 81, pp. 3233 - 3249.
- Mongeau, R.; & Brassard, R 1982, Determination of Neutral Detergent Fiber in Breakfast Cereals: Pentose, Hemicellulose, Cellulose and Lignin Content. *Journal of Food Science*, vol. 47, pp. 550 - 555.
- Müller, M, & Prado, IN 2004, Metabolismo da pectina em animais ruminantes - uma revisão. *Revista Varia Scientia*, vol. 04, no. 8, pp. 45-56.
- McDougall, GL, Morrison, IM, Stewart, D, Weyers, JDB, & Hillman, JR 1993, Plant Fibres: chemistry and processing for industrial use. *Journal of the Science of Food Agriculture*, vol. 62, pp.1 - 20.
- Segura, SF, Echeverri, FR, Patiño LI, AC, & Mejía, GAI 2007, Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, v. 14, p. 72 - 81.
- SILVA, DJ, & QUEIROZ, AC, 2002, Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235 p.

- Da Silva, RST, Fernandades, AM, Gomes, RS, Bendia, LCR, Silva, LC, Viera, RAM, 2018, On the specificity of different methods for neutral detergent fiber and related problems. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 240, pp. 128 - 144.
- Udén, P, Robinson, PH, & Wiseman, J 2005, 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*, vol. 118, pp. 181 - 186.
- Undersander, D, Mertens, DR, & Thiex, N, 1993, Forage analyses procedures. Omaha: National Forage Testing Association, p. 139, 1993.
- Valente, TNP, Detmann, E, Valadares Filho, SC, Queiroz, AC, Sampaio, CB, & Gomes, DI 2011, Avaliação dos teores de fibra em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes bovinas moídas em diferentes tamanhos e em sacos de diferentes tecidos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol 40, no. 5, pp.1148 - 1154a.
- Valente, TNP, Detmann, E, Valadares Filho, SC, Paulino, MF, Figueiras, JF, & Souza, MA 2011, Simulation of variations in the composition of samples in the evaluation of neutral detergent fiber contents by using cellulose standard in filter bags made from different textiles. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.40, no. 7, pp.1596 - 1602b.
- Van Soest, PJ 1963, Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. I. Preparation of Fiber Residues of Low Nitrogen Content. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 46, no 5, pp. 825 - 829a.
- Van Soest, PJ 1963, Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II - a rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 46, no. 5, pp. 829 - 835b.
- Van Soest, PJ 1964, Symposium on Nutrition and Forage and Pastures: New Chemical Procedures for Evaluating Forages. *Journal of Animal Science*, vol.23, no. 3, pp. 838 - 845.
- Van Soest, PJ 1967, Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal of Animal Science*, vol. 26, pp. 119 - 128b.
- Van Soest, PJ, Wine, RN 1967, Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol, 50, no. 1, pp. 50 - 55a.
- Van Soest, PJ, Robertson, JB 1985, Analysis of forages and fibrous foods. AS 613 Manual, Dep. Animal Science, Cornell Univ., Ithaca, NY, 1985.
- Van Soest, PJ, Robertson, JB, & Lewis, B 1991, A Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, vol. 74, no. 10, pp. 3583 - 3597.