

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Rafaela Aparecida Teles Lopes

Determinação da fibra em detergente neutro em autoclave utilizando saco
filtrante e cadinho filtrante

Uberlândia-MG

2023

Rafaela Aparecida Teles Lopes

Determinação da fibra em detergente neutro em autoclave utilizando saco
filtrante e cadinho filtrante

Monografia apresentada a coordenação do curso
graduação em Zootecnia da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito parcial a obtenção
do título de Zootecnista.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane da Silva Morgado

Uberlândia-MG

2023

Rafaela Aparecida Teles Lopes

Determinação da fibra em detergente neutro em autoclave utilizando saco
filtrante e cadinho filtrante

Monografia aprovada como requisito
parcial a obtenção do título de Zootecnista
no curso de graduação em Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia.

APROVADA EM 20 DE JUNHO DE 2023

Prof.^a Dra. Eliane da Silva Morgado
(Universidade Federal de Uberlândia-FAMEV)

Prof.^a Dra. Simone Pedro da Silva
(Universidade Federal de Uberlândia-FAMEV)

Prof.^a Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
(Universidade Federal de Uberlândia-FAMEV)

**Uberlândia-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, que me ajudou a superar os obstáculos, iluminando e guiando meus passos ao longo desta caminhada.

Aos meus pais Ivair Candido Lopes e Marcia da Costa Teles Lopes, por serem minha base, me ajudando nos momentos mais difíceis e sempre me incentivando a ser uma pessoa melhor.

À minha irmã Isabella Cristina Teles Lopes por todo apoio e companheirismo durante a faculdade.

Aos meus queridos avós pelas orações, Divina da Costa Teles, José Casemiro Teles e em memória de Maria Aparecida Candido Lopes e Jose Candido Lopes.

Aos meus tios e primos, por todo suporte que me deram para que eu pudesse concluir meus estudos.

Aos meus amigos, pela contribuição valiosa durante essa longa jornada e pelos momentos de muitas risadas.

Aos professores do curso que através dos seus ensinamentos ensinaram-me e ajudaram em todo o processo de formação profissional.

A minha orientadora Profa. Dra. Eliane da Silva Morgado, pela oportunidade, apoio, paciência e todo conhecimento passado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Muitíssimo obrigada.

RESUMO

O método de análise da fibra em detergente neutro (FDN) original demanda tempo para analisar grande quantidade de amostras por necessitar de mão de obra individual. E com a finalidade de resolver essa questão, e tornar a análise mais prática, foram métodos alternativos, dentre os quais está o uso da autoclave em substituição ao equipamento com refluxo do método original e o uso de sacos filtrantes no lugar do cadinho filtrante. Objetiva-se com o presente trabalho, comparar os resultados obtidos da análise da fibra em detergente neutro (FDN) de alimentos volumosos e concentrados pela técnica da autoclave utilizando-se saco filtrante confeccionado com tecido não tecido (TNT), com gramatura de 100 g/m² e o uso do cadinho filtrante. Os alimentos avaliados foram: milho, farelo de soja, feno de tifton, silagem de sorgo, concentrado e uma dieta total, composta por feno de tifton, silagem de sorgo e concentrado para bovinos em recria. A análise da FDN foi feita na autoclave, utilizando duas técnicas (tratamento): uso do cadinho filtrante, e o uso do saco filtrante, com seis repetições por tratamento para cada alimento avaliado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (duas técnicas: saco filtrante e cadinho filtrante) em seis alimentos com seis repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando o teste de F a 5% de probabilidade, através do programa estatístico R 4.4.2. Os valores médios de FDN no alimento concentrado e no feno de tifton em ambos os métodos utilizados, tanto saco filtrante quanto cadinho filtrante não se diferiram estatisticamente ($P > 0,05$). Nas amostras de milho, silagem de sorgo e dieta total, os valores médios da FDN utilizando cadinho filtrante produziu valores superiores ($P < 0,05$) aos obtidos com o uso do saco filtrante. Para a amostra de farelo de soja o valor da FDN com o uso do saco filtrante foi maior ($P < 0,05$) que o valor obtido com o uso do cadinho filtrante. Dependendo do tipo de alimento avaliado o percentual da FDN pelo método da autoclave utilizando cadinho filtrante difere do resultado obtido utilizando o saco filtrante.

Palavras-chave: FDN; tecido não tecido; parede celular; método alternativo.

ABSTRACT

The original neutral detergent fiber (NDF) analysis method takes time to analyze a large number of samples because it requires individual labor. And with the purpose of resolving this issue, and making the analysis more practical, alternative methods were used, among which is the use of the autoclave in replacement of the equipment with reflux of the original method and the use of filtering bags in place of the filtering crucible. The objective of this work is to compare the results obtained from the analysis of neutral detergent fiber (NDF) of forage and concentrate foods by the autoclave technique using a filter bag made of non-woven fabric (TNT), with a weight of 100 g /m² and the use of the filter crucible. The evaluated feeds were: corn, soybean meal, tifton hay, sorghum silage, concentrate and a total diet composed of tifton hay, sorghum silage and concentrate for growing cattle. The NDF analysis was performed in the autoclave, using two techniques (treatment): use of the filtering crucible, and the use of the filtering bag, with six repetitions per treatment for each evaluated food. The experimental design used was completely randomized with two treatments (two techniques: filtering bag and filtering crucible) in six feeds with six replications each. The results were submitted to analysis of variance and means compared using the F test at 5% probability, through the statistical program R 4.4.2. The mean values of NDF in concentrate feed and tifton hay in both methods used, both filter bag and filter crucible did not differ statistically ($P>0.05$). In the samples of corn, sorghum silage and total diet, the mean NDF values using a filter crucible produced higher values ($P<0.05$) than those obtained using a filter bag. For the soybean meal sample, the NDF value with the use of the filter bag was higher ($P<0.05$) than the value obtained with the use of the filter crucible. Depending on the type of food evaluated, the NDF percentage by the autoclave method using a filtering crucible differs from the result obtained using the filtering bag.

Keywords: FDN; non-woven fabric; cell wall; alternative method.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	A parede celular dos vegetais	9
2.2	Métodos de determinação da fibra dos alimentos.....	11
2.3	Métodos alternativos de determinação da fibra em detergente neutro	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÃO	19
	REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

A fibra dos alimentos possui grande importância na alimentação animal, principalmente de animais herbívoros, e é responsável por manter a saúde do trato digestivo, pelo bom funcionamento dos intestinos, estimulando os movimentos peristálticos (SILVA;QUEIROZ, 2002), e segundo Alves et al. (2016), a fibra na alimentação de ruminantes também estimula a mastigação, a ruminação, mantendo o bom equilíbrio da flora microbiana, servindo como substrato para os micro-organismos, e assim mantém a estabilidade do ambiente ruminal.

O termo fibra pode ser definido como a fração do alimento que não é digerida pelas enzimas digestiva dos animais, que apresenta lenta e incompleta fermentação por micro-organismos, constituindo a fração menos digestível dos alimentos, que ocupa espaço no trato gastrointestinal dos animais, e é composta por substâncias presentes na parede celular dos vegetais (WEISS, 1993; VAN SOEST, 1994; COSTA, 2015).

Existem vários métodos de determinação da fibra dos alimentos, e o que melhor estima o teor de fibra dos alimentos é análise da fibra em detergente neutro (FDN) (MERTENS, 2002), que é a análise mais utilizada na alimentação animal para quantificar o teor de fibra dos alimentos. O método da FDN foi desenvolvido por Van Soest e Wine (1967), que desenvolveram um detergente neutro específico capaz de solubilizar o conteúdo celular, isolando-o dos principais constituintes da parede celular dos vegetais, obtendo-se ao final da análise um resíduo insolúvel em detergente neutro composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, podendo também conter alguma contaminação de cinzas e proteínas que serão determinados através do método de fibra em detergente neutro corrigido pra cinzas e proteína (FDNcp) (DETMANN et al. 2021).

O método original descrito por Van Soest e Wine (1967), utiliza um aparelho com refluxo, cadinho filtrante e um sistema a vácuo. Esta metodologia, demanda tempo e mão-de-obra para execução das análises, e com a finalidade de otimizar o tempo, foram desenvolvidos métodos alternativos que utilizam a autoclave no lugar do aparelho com refluxo, cadinho filtrante e sistema a vácuo como os descritos por Pell e Schofield, (1993) e Detmann et al. (2021). Além disso, foram criados métodos que substituem o uso do cadinho filtrante pelo saco filtrante utilizando a autoclave como o descrito na literatura por Deschamps (1999), que utilizou o tecido de nylon com porosidade de 45 μm e por Senger et al. (2008) que utilizou o tecido de poliéster com porosidade de 50 μm para a confecção dos sacos filtrantes.

O uso de diferentes tipos de tecidos para a confecção dos sacos para análise da FDN foram avaliados por Valente et al. (2011), que usaram o aparelho analisador de fibras (Ankom²²⁰) e os tecidos avaliados foram o náilon com porosidade de 50 μm , o tecido não tecido TNT, com gramatura de 100 g/m^2 , e o sacos de tecido F57 da Ankom[®], assim eles verificaram que os tecidos F57 produzido pela fabricante Ankom[®] e TNT com gramatura de 100 g/m^2 , produzem resultados próximos gerando estimativas acuradas dos teores da FDN, e o tecido de náilon com porosidade de 50 μm , promove perda de partículas pela porosidade do saco, o que compromete a exatidão dos resultados da análise da FDN.

Dessa forma, objetiva-se com o presente trabalho comparar os resultados obtidos da análise da fibra em detergente neutro (FDN) de alimentos volumosos e concentrados pela técnica da autoclave utilizando cadinho filtrante e saco filtrante confeccionado de tecido não tecido (TNT) com gramatura de 100 g/m^2 .

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A parede celular dos vegetais

No grupo dos organismos em nível celular, a célula vegetal é classificada como eucarioto. Grupo este que além de incluir as plantas pluricelulares, inclui também os animais, fungos, protozoários e organismos como leveduras e algas verdes. O que difere os eucariotos dos procariotos é que neles situam-se as organelas e principalmente o núcleo que contém o genoma. Além disso, nela tem a presença de uma membrana plasmática, citoplasma (com organelas e proteínas filamentosas), e um DNA nuclear (ZAHA et al., 2014).

A célula vegetal possui particularidades como a presença de uma parede celular mecanicamente forte, composta por uma rede de microfibrilas de celulose, incluída em uma matriz de polissacarídeos, proteínas e outros polímeros produzidos pela célula (TAIZ et al., 2017), e pela presença de vacúolos, plastídios e substâncias ergásticas (RODRIGUES et al., 2015). Podendo variar no tamanho e na forma, no qual esta última está relacionada com a função que a célula desempenha (RODRIGUES et al., 2015).

No que diz respeito a estrutura, a parede celular forma-se externamente à membrana plasmática. Em que as primeiras camadas são chamadas de parede primária (PM), que é depositada durante a formação e o crescimento da célula e nela ocorre um arranjo entrelaçado das microfibrilas de celulose. Internamente a parede primária, acontece a deposição de camadas

adicionais, que constituem a parede secundária (PS) que é inserida um pouco antes ou logo depois do momento em que a célula cessa seu aumento na superfície (GLÓRIA; GUERREIRO, 2012)

Segundo Glória e Guerreiro (2012), a parede celular é uma estrutura permeável à água e a várias substâncias, que durante as etapas do crescimento e desenvolvimento vegetal, passa por modificações. Por um período ela foi considerada inerte, morta, no qual sua única função era conter o protoplasto, conferindo forma, proteção e rigidez a célula. Atualmente sabe-se que a parede celular é um compartimento metabólico complexo e dinâmico de extrema importância para a célula vegetal, desempenhando funções como prevenir a ruptura da membrana plasmática pela entrada de água na célula, controlar a taxa de crescimento e o transporte intercelular, armazenar compostos de reserva e enzimas que regulam processos bioquímicos e fisiológicos das plantas e realizar defesa.

A parede celular vegetal é composta por moléculas de celulose, hemiceluloses, substâncias pécnicas, lipídicas, proteínas e lignina. A celulose é um polissacarídeo composto unicamente de moléculas de glicose, que estão ligadas através de pontes de hidrogênio formando as microfibrilas de celulose (RODRIGUES et al., 2015), estrutura filamentosa que se reúne em feixes maiores, constituindo o arcabouço da parede celular. Nas microfibrilas, as moléculas de celulose arranjam-se ordenadamente o que lhes confere propriedades cristalinas como grande resistência mecânica e dupla refração (birrefringência), tornando-a brilhante quando ela é colocada entre filtros de luz polarizada cruzados (MENEZES et al., 2005).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formadas por hexoses, pentoses, oxihexoses, ácidos urônicos e estão associadas as fibras de celulose (D' ALMEIDA et al., 2013). As substâncias pécnicas estão presentes na lamela média ligando-se as células e são formadas por ácidos galacturônicos que se subdividem em três grupos: protopectina, pectina e ácido pécnico (RODRIGUES et al., 2015). As substâncias lipídicas como suberina, cutina e ceras, tornam a parede celular impermeável à água. Já os componentes proteicos como a extensina, que promove a rigidez da parede celular, e a alfa expansina que atua na expansão irreversível da parede quebrando as pontes de hidrogênio entre as hemiceluloses e as microfibrilas de celulose, ou na desestabilização das interações dos glicanos-glicanos (GLÓRIA; GUERREIRO, 2012).

A lignina é um polímero aromático composto por unidades de 4-fenilpropano, formada por uma estrutura macromolecular heterogênea e pode conter três tipos de unidades aromáticas: unidades p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), que não tem nenhum grupo metoxil (H)

ou tem um (G) ou dois (S) grupos metoxil nas posições C3 e C5 da unidade aromática (LINO, 2015).

2.2 Métodos de determinação da fibra dos alimentos

O termo fibra pode ser definido como a fração do alimento que ocupa espaço no trato gastrointestinal dos animais, que possui porções lentamente digestível e/ou indigestível (VAN SOEST, 1994), sendo um agregado de compostos, na qual a sua composição depende da sua fonte e do método analítico utilizado para sua quantificação (MERTENS, 1992).

O método mais antigo descrito na literatura para quantificar o teor de fibra dos alimentos é o método da fibra bruta que foi descrito pelo sistema de Weende, que é representado pelas frações de celulose, hemicelulose e lignina resistentes ao tratamento sucessivo com ácido e base diluídos (SILVA; QUEIROZ, 2002). O uso de soluções de ácido e base fortes, promove a solubilização de parte da lignina e da hemicelulose o que subestima o teor de fibra dos alimentos, tornando-se um método limitado pela falta de precisão dos resultados (VAN SOEST e WINE, 1968), não sendo mais um método adequado para determinar o teor de fibra de alimentos, principalmente de alimentos volumosos que possuem altos teores de componentes da parede celular.

Com a finalidade de desenvolver um método mais preciso para determinar o teor de fibra dos alimentos VAN SOEST (1963), e VAN SOEST e WINE (1967) desenvolveram um sistema de detergente denominado fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN), respectivamente. Esses métodos permitem um melhor fracionamento dos diversos componentes da fração fibrosa (RODRIGUES, 2010, p.94), possibilitando uma maior precisão na estimativa do valor nutritivo das forrageiras (BERCHELLI et al., 2001).

A solução de detergente neutro, solubiliza a bicamada lipídica da membrana celular dos alimentos, e por filtração separa-se o resíduo fibroso, composto pelos componentes da parede celular que são insolúvel em detergente neutro, principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas porções de proteína danificada pelo calor e proteína ligada a parede celular e minerais insolúveis, sendo solubilizado na solução de detergente neutro as substâncias que são fáceis de serem digeridas, como a pectina e os componentes do conteúdo celular da planta como proteínas, açúcares e lipídeos (LOURENÇO, 2010; SILVA; QUEIROZ, 2002).

A solução de detergente ácido promove a solubilização do conteúdo celular e da hemicelulose, um componente da parede celular dos vegetais, e por filtração é possível quantificar o resíduo insolúvel em detergente ácido, composto quase em sua totalidade por celulose e lignina, além de alguma contaminação por proteínas danificadas pelo calor, proteínas da parede celular e minerais insolúveis, denominado fibra em detergente ácido (FDA), que é a porção menos digerível da parede celular (SILVA; QUEIROZ, 2002). No entanto, essa análise por solubilizar a hemicelulose, não possui valor nutricional quanto a fibra, e é utilizada como um passo preparatório para quantificar a concentração de lignina dos alimentos (DETMANN et al., 2021).

2.3 Métodos alternativos de determinação da fibra em detergente neutro

O método original proposto por Van Soest para a determinação de fibra em detergente neutro, utiliza como um equipamento com refluxo de fibra e como materiais béquer de forma alta, cadinho filtrante de vidro e porosidade grossa, e um sistema a vácuo. Neste método, as amostras são pesadas no béquer, adicionado à solução de detergente neutro na proporção de 1g de amostra /100 mL de solução, e acoplado o béquer no equipamento com refluxo, ajustando a temperatura para fervura da solução durante 60 minutos e imediatamente após esse período é feito a filtração sob vácuo em cadinho filtrante, e em seguida é realizada lavagem com água quente destilada, e por fim com acetona. Posteriormente, o cadinho com o resíduo insolúvel em detergente neutro é colocado em estufa à 105°C, por um tempo mínimo de 8h e no máximo uma noite, após esse período, os cadinhos serão levados ao dessecador para esfriar e então pesados em balança analítica (SILVA; QUEIROZ, 2002).

A análise original de FDN foi desenvolvida para ser aplicada em forragens, e ao utilizá-la em alimentos ricos em amido, observou-se uma superestimativa na determinação de FDN (SILVA; QUEIROZ, 2002). Para resolver esse problema, Van Soest et al. (1991) propuseram o uso de alfa-amilase, estável ao calor, que remove o amido, evitando a interferência deste componente no resultado final.

A utilização de equipamento com refluxo e cadinhos filtrantes na análise da fibra é demorada, pois a quantidade de análise realizada em um rodada depende da capacidade do equipamento, que geralmente é de seis provas. Outro limitante é o uso de cadinho filtrante, que em que se utiliza um para cada amostra avaliada, assim, há a necessidade de mão de obra individual para cada amostra, o que torna um fator limitante da eficiência deste método, e por

ser um método cansativo pode induzir ao erro (BERCHIELLI, et al., 2001; LOURENÇO, 2010; SILVA; QUEIROZ, 2002).

Esses fatores levaram ao desenvolvimento de alterações do método original com a finalidade de otimizar a mão-de-obra com as análises individuais, a demora na execução das etapas da análise e a diminuição dos resíduos químicos gerados no método original, através da substituição do equipamento com refluxo por outros equipamentos como o analisador de fibras da Ankom[®] e também com o uso da autoclave, denominados de métodos alternativos. Ambos os métodos de determinação de fibra em detergente neutro (FDN), seja ele original ou alternativo seguem uma rotina de uma análise gravimétrica, que utiliza uma sequência de métodos de longa aplicação, para estabelecer o teor de um constituinte de uma amostra, podendo realizar a pesagem direta do elemento puro ou utilizar um de seu derivado do qual se conhece a composição (LOURENÇO, 2010).

Com o intuito de otimizar a análise da fibra foram desenvolvidos procedimentos que substituem o cadinho filtrante por sacos filtrantes, compostos por fibra sintética insolúvel nos meios ácido e neutro e denominados F57 (Ankom[®]) (CASALI et al., 2009), e realizou-se também a substituição do equipamento com refluxo, pelo analisador de fibra que é um sistema fechado que possibilita a análise e filtração de um grande número de amostras analisadas simultaneamente, sendo este processo denominado de sistema Ankom[®]. Com isso elimina-se a mão-de-obra individual para cada amostra analisada. O princípio de funcionamento deste sistema, é baseado na análise e filtragem das amostras de alimentos contidos em sacos filtrantes, em ambiente fechado sob aquecimento e agitação, por aproximadamente 60 minutos. Depois de retirar a solução, faz-se o enxágue com água destilada quente, escorrendo-o e posteriormente faz-se a imersão deste saco filtrante em acetona, colocando-os na estufa de ar forçado 65°C por 24h. Após os sacos filtrantes atingirem a temperatura ambiente, é feita a pesagem. Ao comparar a análise da FDN realizada pelo equipamento da Ankom[®] e pelo método original, nota-se que os teores de FDN para os alimentos são semelhantes em ambos os métodos (BERCHIELLI et al., 2001).

No entanto, o sistema Ankom[®] possui limitações, em relação ao alto custo do equipamento e dos sacos filtrantes utilizados, que são obtidos na própria empresa fabricante do equipamento e necessitam de importação (BERCHIELLI et al., 2001). Para resolver o problema do custo com os sacos filtrantes da Ankom[®], pesquisas foram desenvolvidas com a finalidade de encontrar um tecido alternativo ao utilizado pela Ankom[®]. Dessa forma Valente et al. (2011), testaram diferentes sacos filtrantes confeccionados com os seguintes tecidos: náilon (50 µm),

F57 (Ankom[®]) e tecido não-tecido (TNT) com gramatura de 100 g/m², esses autores realizaram a análise da FDN e verificaram que a utilização dos sacos de TNT e o uso dos sacos filtrantes F57 (Ankom[®]) proporcionaram resultados satisfatórios para análise da FDN, e que os sacos confeccionados com tecido náilon (50 µm) permite a perda de partículas comprometendo a análise. Segundo Casali et al. (2009), o arranjo da malha do tecido TNT (100 g/m²), é semelhante à do F57 (Ankom[®]), e apresenta comportamento similar em termos analíticos com o tecido F57 (Ankom[®]), sendo uma opção que pode ser utilizada e de menor custo.

Outro método alternativo é o uso de autoclaves, proposto por pesquisadores como Pell e Schofield (1993) Detmann et al. (2021), que substituíram o equipamento com refluxo utilizado no método original pela autoclave na análise da fibra utilizando cadinho filtrante e bomba a vácuo. A aplicação deste método permite ganhos através da redução de custos, mão-de-obra e tempo de análise, sendo uma técnica que permite realizar a análise simultânea de um maior número de amostras que o método original, além de possuir baixo custo de aquisição do equipamento.

Segundo Lourenço et al. (2010), o uso da autoclave é diverso, pois permite fazer a análise utilizando tanto cadinho filtrante como saco filtrante. Deschamps (1999) e Senger et al., (2008) realizaram a análise da FDN em autoclave utilizando saco filtrante de náilon, no entanto, segundo Valente et al. (2010), o uso de saco de náilon (50 µm) promove a perda de partícula não sendo recomendado o seu uso, o tecido de TNT com gramatura de 100 g/m², seria o mais indicado na substituição ao F57 da Ankom[®]. Resultados na literatura divergem quanto aos resultados utilizando cadinho filtrante e saco filtrante para a análise da FDN, pois segundo Lourenço (2010), que comparou o método original com o método alternativo da autoclave utilizando cadinho filtrante, saco filtrante F57 da Ankom[®] e saco de TNT, verificou que dependendo do tipo de alimento volumoso o resultado da FDN pela autoclave usando sacos filtrantes difere do método original.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Avaliou-se os teores da fibra em detergente neutro (FDN) nos seguintes alimentos: milho, farelo de soja, feno de tifton, silagem de sorgo, concentrado e uma dieta total, composta por feno de tifton, silagem de sorgo e concentrado para bovinos em recria.

As análises da FDN foram feitas pelo método da autoclave, utilizando duas técnicas (tratamento): uso do cadinho filtrante, e o uso do saco filtrante, com seis repetições por tratamento.

As amostras de ração total e silagem de sorgo foram pré-secadas em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de 60° C por 72 horas. Após a secagem, essas amostras juntamente com as amostras de feno de tifton, farelo de soja, milho e concentrado passaram pelo processo de moagem, em um moinho com peneira com furos de 1mm de diâmetro, para a realização das análises da matéria seca e da FDN das amostras.

Para a solução de FDN, utilizou-se os seguintes reagentes: Acetona (CH₃)₂CO, Ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA), Alfa-amilase estável ao calor, Borato de sódio hidratado (Na₂B₄O₇.10H₂O), Fosfato ácido de sódio anidro (N₂Na₂HPO₄), Hidróxido de sódio (NaOH), Sulfato láurico sódio (CH₃ (CH₂)₁₀(CH₂OSO₃Na), Sulfito de sódio anidro (Na₂SO₃) e Trietilen glicol (C₆H₁₄O₄) (SILVA; QUEIROZ, 2002).

Técnica 1: usa da autoclave e saco filtrante: para esta análise utilizou-se o saco filtrante, confeccionado com o tecido não tecido (TNT) com gramatura de 100 g/m², sendo 5 cm de comprimento por 5 cm de largura, o que corresponde a uma área de 25 cm². Para isso, os moldes foram cortados em formas retangulares do tecido de TNT com dimensões de 10 cm de comprimento e 5 cm de largura, e depois foram lavados com solução de detergente neutro comercial preparada conforme a recomendação feita por Detmann et al. (2021), onde para um litro de água destilada fervente foi adicionado 20 mL de detergente neutro comum. Os moldes foram mergulhados nessa solução fervente e deixados de molho por 24 horas, para a retirada da goma que vem com o tecido. Em seguida os moldes foram lavados até a retirada completa do detergente, lavados com água destilada e colocados em formas de alumínio forradas com papel toalha, sequencialmente foram levados para estufa ventilada a 60°C por 24 horas, para secar. Após a secagem, os moldes foram selados nas laterais com o auxílio de uma seladora, resultando em um saco com dimensão de 5 x 5 cm, posteriormente eles foram identificados e levados para estufa a 105°C por 2 horas. Em seguida retirou-os, colocando-os em um dessecador para esfriar, por 40 minutos, posteriormente, pesou-os em uma balança analítica, na qual foi registrado os pesos dos sacos vazios.

A quantidade de amostra que cada saco recebeu, obedeceu a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (DETMANN et al., 2012). E então os moldes dos sacos filtrantes foram selados na parte superior fechando-os. A análise de FDN foi feita em seis amostras de alimentos, com seis repetições por alimento, totalizando 36 sacos. Estes foram

acondicionados em um saco maior de um tecido mais fino, o tule, contendo um contrapeso em seu interior para evitar a flutuação das amostras no béquer (DESCHAMPS, 1999). Esse conjunto foi acondicionado em um béquer, com capacidade de 2.000 mL, adicionando-se quantidade de solução de detergente neutro, suficiente para que todos os sacos filtrantes ficassem mergulhados na solução, procurando manter a relação de 50 ml de detergente por 0,5 grama de amostra e 0,5 ml de alfa amilase (LNF) termoestável por grama de amostra (DETMANN et al., 2012). Em seguida selou-se e a boca do béquer com papel alumínio (DESCHAMPS, 1999; SENGER et al., 2008), foi levado para a autoclave, com temperatura de operação ajustada para 105°C durante por 60 minutos (DETMANN et al., 2012; PELL; SCHOFIELD, 1993). Após transcorrido o tempo de análise, desligou-se a autoclave e aguardou-se a saída da pressão para permitir a abertura e retirada das amostras, e os sacos foram lavados com água destilada quente, por várias vezes, até ser observado que a água de lavagem não apresentava mais cor, e em seguida foram lavados com acetona durante 5 minutos, e levados para estufa ventilada a 60°C por 24 horas e sequencialmente, por 2 horas em estufa não ventilada a 105°C, posteriormente foram acondicionados em dessecador para esfriar, realizando em seguida a pesagem e anotação dos pesos (DETMANN et al., 2012).

Técnica 2: uso da autoclave e cadinho filtrante. Pesou-se aproximadamente 0,5 g de amostra em um béquer de vidro de forma alta com capacidade de 100 mL, adicionou-se 50 ml de solução de detergente neutro e 0,5 ml de alfa amilase (LNF) termoestável, e em seguida selou-se a boca do béquer com papel alumínio. Os béqueres foram acondicionados na autoclave a temperatura de 105°C durante 60 minutos. Após transcorrido o tempo de análise, a autoclave foi desligada e aguardando a saída da pressão para permitir a abertura e retirada dos béqueres com as amostras, que foram filtradas em cadinho filtrante utilizando o sistema a vácuo. Os resíduos das amostras foram lavados com água destilada quente para a retirada do detergente, até ser observado que não havia mais a formação de espuma, em seguida, foram lavados com acetona e levados para estufa a 105°C para secar, por um período de 16 horas, posteriormente foram acondicionados em dessecador para esfriar, pesados e anotado os pesos. Realizou-se seis repetições para cada um dos seis alimentos avaliados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (duas técnicas: saco filtrante e cadinho filtrante) em seis alimentos com seis repetições cada. Os dados apresentaram distribuição normal, verificado pelo teste de Cramér-Von Mises, e homogeneidade de variância, verificado pelo teste de Levene. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste F a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico R 4.4.2. (2022).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a avaliação dos teores de fibra em detergente neutro (FDN), pela técnica da autoclave utilizando saco filtrante e cadinho filtrante para os seguintes alimentos: milho, farelo de soja, feno de tifton, silagem de sorgo, concentrado e dieta total, obteve-se os seguintes valores médios descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos percentuais de fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos avaliados pela técnica da autoclave utilizando saquinho filtrante e cadinho filtrante.

Alimento	% FDN		CV(%)	P valor
	Cadinho filtrante	Saquinho filtrante		
Milho	12,51 ± 0,27 a	11,58 ± 0,28 b	2,28	<0,001
Farelo de soja	11,41 ± 0,44 b	18,68 ± 0,74 a	4,04	<0,001
Feno de tifton	80,76 ± 1,23 a	79,67 ± 0,63 a	1,22	0,083
Silagem de sorgo	51,39 ± 0,56 a	49,71 ± 0,50 b	1,05	<0,001
Concentrado	11,38 ± 0,51 a	11,79 ± 0,23 a	3,44	0,104
Dieta	54,58 ± 0,59 a	52,86 ± 0,63 b	1,13	<0,001

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F a 5% de propabilidade.

Os valores médios dos percentuais de fibra em detergente neutro (FDN) para as amostras de feno de tifton e concentrado, determinadas pelo método de cadinho filtrante cujo as médias foram 80,76 e 11,38%, respectivamente, e no saco filtrante de 79,67 e 11,79%, respectivamente, ambas não diferem estatisticamente entre si. Além disso, as amostras apresentaram um coeficiente de variação (CV%) baixo e os dados obtidos pelos dois métodos apresentam homogeneidade (P valor > 0,05). Segundo Senger et al., (2008), a análise de fibra em detergente neutro utilizando sacos filtrantes em forragens e alimentos concentrados, quando realizada em temperaturas de 110°C durante 40 minutos, apresenta resultados precisos ao método convencional de cadinho filtrante. Através dos estudos avaliados por Lourenço et al., (2017), a análise de FDN feita no feno de tifton em autoclave com uso de saco filtrante não se difere do método de cadinho filtrante. Portanto o método do saco filtrante confeccionado com tecido não tecido (TNT) pode ser utilizado nas amostras de feno de tifton e concentrado, para determinar os teores de fibra em detergente neutro (FDN), pois não se difere estatisticamente do método convencional.

As amostras de milho, dieta total e silagem de sorgo ao serem analisadas pelo método do cadinho filtrante, apresentaram os seguintes valores médios 12,51, 54,58 e 51,39%

respectivamente, e estes resultados foram superiores ($p < 0,05$) aos valores médios obtidos no método de saco filtrante de 11,58, 52,86 e 49,71% respectivamente. Ambas amostras apresentaram baixo coeficiente de variação, demonstrando uma baixa variação entre os resultados obtidos. Uma possível explicação para essas diferenças observadas é de ter ocorrido perdas de partículas da amostra com o uso do saco filtrante. Casali et al. (2009) observaram a perda de partículas fibrosas da amostra na análise da FDN utilizando sacos com o tecido de náilon, por outro lado, esses autores não observaram essas perdas com o uso do tecido de TNT.

Comparação do uso da autoclave com diferentes materiais filtrantes com o método convencional foi realizado por Lourenço (2010) que utilizou para análise da autoclave os seguintes materiais filtrantes: filter bag F57 da Amkom[®], saco filtrante de TNT e cadinho filtrante. Esse autor verificou que o uso da autoclave produziu resultados superiores aos obtidos no método convencional para as amostras de silagem de milho, capim xaraés e capim marandu, independente do material filtrante utilizado, e os valores obtidos utilizando o cadinho filtrante foram superiores aos obtidos usando o saco filtrante de TNT.

A maior diferença observada foi para o farelo de soja que no método de saco filtrante, alcançou valores médios de 18,68%, e no método do cadinho filtrante de 11,41%, uma diferença de 7,27 pontos percentuais. Esse foi o alimento avaliado que apresentou maior coeficiente de variação. E de todos os alimentos avaliados, o farelo de soja foi o que teve maior dificuldade de filtração no cadinho filtrante, e embora isso tenha ocorrido, o valor médio da FDN com o cadinho foi menor que o uso do saco filtrante. Possivelmente pode não ter ocorrido a solubilização completa da amostra do farelo de soja durante o processo de lavagem do cadinho filtrante dificultando o processo de filtração. Já na técnica com o uso do saco filtrante, a formação de uma barreira pode ter impedido a solubilização completa de parte da amostra, o que elevou o valor final da FDN. Segundo Barbosa et al., (2015), além da barreira física que o saco filtrante produz, pode ocorrer aglomeração das partículas do alimento ao entrar em contato com a água da solução o que pode dificultar a passagem da solução pelas partículas da amostra e assim comprometer a extração, principalmente em alimentos concentrados, que possuem maiores quantidades de substâncias a serem solubilizadas pelo detergente neutro. No entanto, nas amostras de milho e de concentração esse fato não ocorreu.

4 CONCLUSÃO

Dependendo do tipo de alimento avaliado o percentual da FDN pelo método da autoclave utilizando cadinho filtrante difere do resultado obtido utilizando o saco filtrante.

REFERÊNCIAS

ALVES, A.R.; LEONARDO PASCOAL, A.F.; CAMBUÍ, G.B.; TRAJANO, J.S.; SILVA, C.M.; GOIS, G.C. Fibra para ruminantes: Aspecto nutricional, metodológico e funcional. **Pubvet**. Maranhão, v.10, n. 7, p.513-579, julho 2016. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/2883/fibra-para-ruminantes-aspecto-nutricional-metodoloacutegico-e-funcional>. Acesso em : 9 jun. 2023.

BARBOSA, M. M.; DETMANN, E.; ROCHA, G. C.; FRANCO, M. O.; VALADARES FILHO, S. C. Evaluation of laboratory procedures to quantify the neutral detergent fiber content in forage, concentrate, and ruminant feces. **Journal of AOAC International**, Vol. 98, Nº4, p.883-889, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-156>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article/98/4/883/5654632?login=false>. Acesso em: 9 de jun. de 2023.

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**, Jaboticabal, v. 30, n. 5, p.1572-1578, 25 abril 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000600027>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/Kx633F96QvQyZZD3tJHCfpz/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 9 jun. 2023.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; FILHO, S.C.V.; PEREIRA, J.C.; CUNHA, M.; DETMANN, K.S.C.; PAULINO, M.F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em saco de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v.38, n.1, p.130-138 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000100017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/qdZ75P7BZgM4z5QbwmWQPGx/?lang=pt#>. Acesso em: 9 jun. 2023

COSTA, N. L.; MONTEIRO, A.L.G; SILVA, A.L.P; MORAES, A.; GIOSTRI, A.F.; STIVARI, T.S.S.; BALDISSERA, T.C.; PIN, E.A. Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, Roraima, v.64, p. 31-41. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1034762/consideracoes-sobre-a-degradacao-da-fibra-em-forragens-tropicais-associada-com-suplementos-energeticos-ou-nitrogenados>. Acesso em: 9 jun. 2023.

D' ALMEIDA, M. L. O.; KOGA, M. E. T.; FERREIRA, D. C.; PIGOZZO, R. J. **Celulose**. São Paulo: SENAI- SP editora, 2013. cap. 1, p. 21. ISBN 978-85-8393-344-1. Disponível em: <https://www.google.com.br/books/edition/Celulose/5F79DwAAQBAJ?hl=ptBR&gbpv=1&dq=celulose&printsec=frontcover>. Acesso em: 9 jun. 2023.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; FILHO, S. C. V. **Métodos para análise de alimentos-INCT-Ciência Animal**, 1.ed. Visconde do Rio Branco, MG, 2012. 214p.

DETMANN, E.; COSTA E SILVA, L.F.; ROCHA, G.C.; PALMA, M.N.N.; RODRIGUES, J.P.P. **Métodos para análise de alimentos-INCT-Ciência Animal**, 2 ed. Visconde do Rio Branco, Minas Gerais: Suprema, 2021. 350p.

DESCHAMPS, F.C. Implicações do Período de Crescimento na Composição Química e Digestão dos Tecidos de Cultivares de Capim-Elefante (*Pennisetumpurpureum*Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Itajaí, SC, v.28, n.6, p. 1358-1369, 1999.DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000600025>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/HMkbgWvBtk3yDKqWyQ3P4Tm/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 9 jun. 2023.

FARIAS, J. S.; QUEIROZ, L. O.; SANTOS, G. R. A.; FAGUNDES, J. L. F.; SILVA, M. A. Avaliação de tecidos e equipamentos alternativos na análise de fibra em detergente neutro e de fibra em detergente ácido. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 72, n.3, p.229-233, 2015.DOI:<http://dx.doi.org/10.17523/bia.v72n3p229>. Disponível em: <https://docplayer.com.br/11782867-Nota-cientifica-avaliacao-de-tecidos-e-equipamentos-alternativos-na-analise-de-fibra-em-detergente-neutro-e-de-fibra-em-detergente-acido-1.html>. Acesso em: 9 jun. 2023.

GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. 3.ed. rev. e ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2012. 404p. ISBN:978-85-7269-440-7.

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, G. F.; **Análises físico-químicas de alimentos**. Viçosa, MG: Ed.UFV,2011. 303p. ISBN:978-85-7269-399-8.

LINO, A. G.; **Composição química e estrutural da lignina e lipídeos do bagaço de palha da cana-de-açúcar**. Viçosa-MG, 2015. Tese (doutorado)- Universidade Federal de Viçosa. Disponível em:<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/8522/1/texto%20completo.pdf>
Acesso em: 9 jun. 2023.

LOURENÇO, M. S. N. **Estudo Comparativo de Metodologias aplicadas em análises de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido com gerenciamento de resíduos químicos**. Jaboticabal, 2010. Tese (doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.Disponível em:
https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/104938/lourenco_msn_dr_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y.Acesso em: 9 jun. 2023.

MENEZES, N. L.; PIRANI, J. R.; GIULIETTI, A. M.; MONTEIRO, W. R.; VENTURELLI, M.; ESTELITA, M. E. M.; KRAUS, J. E.; ANGYALOSSY, V.; ARDUIN, M.; CECCANTINI, G. C. T.; PINNA, G. F. M. **Anatomia e morfologia de plantas vasculares**.São Paulo: USPUFSCar, 2005. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=3022334&forceview=1>. Acesso em: 9 jun. 2023.

MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. *In*: Simpósio Internacional de Ruminantes. **Anais** [...] SBZ-ESAL, 188, MG. 1992.

MERTENS, D. R. Gravimetric Determination of Amylase-Threatened Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. **Jornal of AOAC International**, Madison, v. 85, n.6, p.1217, 2002.Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/260983893_Gravimetric_Determination_of_AmylaseTreated_Neutral_Detergent_Fiber_in_Feeds_with_Refluxing_in_Beakers_or_Crucibles_Collaborative_Study. Acesso em: 9 jun. 2023.

NUNES, C. S; VELASQUEZ, P. A. T; CARRILHO, E. N. V. M; SOUZA, G. B. S; NOGUEIRA, A. R. A; OLIVEIRAA, S. G; BERCHIELLI, T.T. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag. *In: A produção animal e o foco no agron.* 42 ° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia 25 A 28 de julho de 2005, **Anais[...]** SBZ. Goiânia, junho de 2005. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/47196/1/Binder1.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2023.

PELL, A.N.; SCHOFIEL, D. P. Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion *In Vitro*. **Journal of Dairy Science**, Ithaca, NY, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, 1993. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77435-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77435-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030293774354>. Acesso em: 9 jun. 2023.

R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

RODRIGUES, A. C.; AMADO, É.; ALMEIDA, S. L. **Anatomia Vegetal**. Florianópolis: Biologia /EaD/ UFSC, 2015. cap. 1, p.11-16. ISBN: 978-85-61485-27-6. Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Anatomia-Vegetal.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2023.

RODRIGUES, R. C. **Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/40059/1/documento-306.pdf>. Acesso em: 10 de jun. 2023.

SENGER, C. C. D.; KOZLOSKI, G. V.; SNACHEZ, L. M. B.; 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**, Amsterdam, v. 146, n.1-2, p. 169-174, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.12.008>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840107005445?casa_token=0SZNB8vF7LYAAAAA:2Y1ve6JlvGZE_H4ss2c8NN5h96w_H20ddgfFu6PPrK3ZBfFkq6O85SnfBIOEf0E07XCagPzcSw. Acesso em: 9 jun. 2023.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed.- Viçosa: UFV, 2002. cap. 3, p. 47-235.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. In: FISILOGIA e Desenvolvimento Vegetal. 6. ed. rev. Porto Alegre: ARTMED, 2017. cap. 14, p. 379. ISBN:9781605352558. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=PpO4DQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=ptBR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true. Acesso em: 9 jun. 2023.

VALENTE, T. N. P; DETMANN, E; FILHO, S. C. V; CUNHA, M; QUEIROZ, A. C; SAMPAIO, C. B. *In situ* estimation of indigestible compounds contents in cattle feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l], v.40, n.3, p.666-675, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300027>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/h4JJtwcmYcd8mS8bXRYQdbB/?lang=en#>. Acesso em: 9 jun. 2023.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Comstock Publ. Assoc. Ithaca, 1994, p. 476.

VAN SOEST, PJ; ROBERTSON, JB; LEWIS, BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Ithaca, NY, v.17, n. 10, 1991, p.3583-3597. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1660498/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method of determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.46, n. 5, p. 829-835, 1 October 1963. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/46.5.829>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/46/5/829/5732052?RedirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 9 jun. 2023.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal of Association of Agricultural Chemistry**, Washington, v.51, n. 4, p.780-85, 1968. DOI:<https://doi.org/10.1093/jaoac/51.4.780>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/51/4/780/5720884?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 9 jun. 2023.

WEISS, W.P. Predicting energy values of feeds. **Journal of Dairy Science**, v.76, n. 6, p.1802, 1993. DOI:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77512-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77512-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030293775128>. Acesso em: 9 jun. 2023.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.; **Biologia molecular básica** [recurso eletrônico]. 5 . ed.- Dados eletrônicos. - Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 1, p. 3-4. ISBN:978-85-8271-058-6. Disponível em:https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=imm5AwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT2&dq=eucarioto+e+procarioto&ots=ism7DydsWA&sig=09UL67A06qQa1MK_PJYIesJNmMU#v=onepage&q=eucarioto%20e%20procarioto&f=true. Acesso em: 9 jun.2023.