

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE FORRAGEIRAS
UTILIZADAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL**

*Rodolfo Carapelli**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS (área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA).

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*Bolsista CNPq

São Carlos – SP
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C257ma	<p>Carapelli, Rodolfo. Métodos analíticos alternativos para avaliação da qualidade de forrageiras utilizadas na nutrição animal / Rodolfo Carapelli. -- São Carlos : UFSCar, 2007. 89 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.</p> <p>1. Multicomutação. 2. Eletroanalítica. 3. Fibra detergente neutro. 4. Microondas. I. Título.</p> <p>CDD: 543.07 (20^a)</p>
--------	---

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Aos meus pais, João e Leonilda,
meus exemplos de vida, e ao meu
irmão, Hugo Leonardo.**

**“...Se o que você quer em sua vida é só paz
Muitas docuras, seu nome em cartaz
E fica arretado se o açúcar demora
E você chora, você reza, você pede, implora
Enquanto eu provo sempre o vinagre e o vinho
Eu quero é ter tentação no caminho
Pois o homem é o exercício que faz...”**

(Raul Seixas/Marcelo Motta)

AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho:

À Deus por tudo.

À Profa. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira, pela orientação, conhecimento, paciência, apoio e amizade. E à Embrapa, em nome da Dra. Ana Rita, pela oportunidade de usufruir suas dependências e infra-estrutura.

Ao Engenheiro Eletrônico Luiz Francisco de Matteo Ferraz, da Embrapa Instrumentação Agropecuária, pelo desenvolvimento do programa de controle do sistema de multicomutação.

À Profa. Dra. Elma Neide Vasconcelos Martins Carrilho pelo auxílio no início do trabalho experimental.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi de Faria, pela contribuição durante o exame de qualificação e pelas discussões posteriores.

Ao Prof. Dr. Eduardo F. de Almeida Neves (*in memoriam*)

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pelas contribuições no decorrer do trabalho.

Ao especialista em laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP/Pirassununga), Ari Luiz de Castro pelas análises cromatográficas.

Aos Professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Aos amigos e companheiros do GAIA: Adriana Alice, Adriana Nori, Adriana Soares, Alexandra, Allen, Amália, Ana Beatriz, Andrea Oliveira, Andréa Fernandes, Caio, Carlinha, Carolina, Claudia, Daniela, Edénir, Edilene, Edivan, Eveline, Fabiana, Fernanda, Gilberto, Gian, Guto, Juliana, Kelber, Lilian, Mirian, Mário, Marquinho, Patrícia, Sherlan, Silvéria, Silmara, Silvia, Simone e Wladiana e aos que fazem ou fizeram parte de uma forma ou de outra deste grupo especial, o meu mais sincero agradecimento por tudo que vivi com vocês.

Aos companheiros do ex-GAIA com os quais tive o prazer de conviver

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo auxílio técnico, especialmente à Cristina, ao Gilbertinho, à Lourdes, ao Marcão, ao Vitor, e a todos os estagiários que passaram pelo laboratório de nutrição animal e solos, pela amizade e contribuições significativas ao desenvolvimento do trabalho.

À Claudia, Fernanda, Marcio, Gian e Lourdes pelas caronas até à fazenda Canchim.

Agradecimento especial à amiga Wania Christinelli pela grande ajuda despendida no início do trabalho experimental e aos amigos Eveline, Mário, Fer e Wlad pela valiosa ajuda na etapa final. E novamente à Fer pelo recipiente que destruímos.

Aos meus pais, meu irmão e a minha família, pela torcida, incentivo, amor, e por “fingirem” sentir saudades por eu estar longe.

Aos meus grandes amigos de graduação que sempre contribuíram muito no caminho que trilhei até aqui, em especial: Adriano (Nojo), Alexandra (Loira), Ana Claudia, Andréia, Camila (Cacazinha), Débora (Formigona), Fernanda Kopczynski, Franciele (Franz), Hércules (Herculino), Juliana, Sr. e Sra Leandro e Thais Piovan (agradeço também pela cervejinha dos domingos a tarde), Lenilson (Phob's), Lílian, Oscar (Alcemon), Roberta, Silvia, Thiago (Backs), e todos os amigos da UEM que foram agregados a esta saudosa turma.

Aos meus amigos “São Carlenses”: Akira, Basso, Diego, Edmilson, Eric, Leandro (Maritaca), Ricardo, Rodolfo, Rodrigo, Tiagão (Sociais) e Tiagão (Barto), pelos bons e maus momentos que passamos.

Aos grandes amigos de Maringá que sempre me receberam de braços abertos e com muita cerveja, sinuca e vários churrascos nos meus regressos ao lar.

Aos amigos feitos no departamento de química da UFSCar e na Embrapa Pecuária Sudeste durante o período de realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade e especialmente às secretárias da pós, Ariane, Cristina, Luciani e Caroline, por serem tão prestativas.

A todos os quais eu cometi a injustiça de não listar acima.

Muito obrigado!

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Algumas bactérias produtoras de ácido láctico em silagens.	7
Tabela 2.2: Rotas sintéticas de ácidos orgânicos e perda de matéria seca e energia inerente a cada rota no processo fermentativo de silagens	10
Tabela 3.1: Formulações das membranas seletivas com proporções relativas em peso (%).	36
Tabela 3.2: Programa de execução usado para titulação de amostras de silagem.....	40
Tabela 3.3: Etapas de execução do processo em fluxo	40
Tabela 3.3: Variáveis estudadas com seus níveis baixo e alto.	48
Tabela 4.1: Resultados obtidos em cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência nas amostras de capim brachiária, cana de açúcar e milho.....	65
Tabela 4.2: Resultados obtidos para as análises de agvs nos três procedimentos avaliados.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação de algumas comutações mecânicas em análise em fluxo. (a-d) linhas tracejadas representam o percurso do fluxo após a comutação (fonte: rocha <i>et al.</i> , 2002).....	18
Figura 2.2: Representação do processo de amostragem binária e mistura da amostra. s1 e s2: soluções miscíveis, v: válvula solenóide, r: reator, d: detector. a linha tracejada significa o caminho analítico após a comutação (fonte: rocha <i>et al.</i> , 2002).....	21
Figura 3.1. Detalhes do eletrodo tubular	35
Figura 3.2. Detalhes da montagem final do eletrodo. a, vista do suporte em corte; b, vista do eletrodo adaptado no suporte; 1, suporte de acrílico; 2, parafusos; 3, anéis de borracha de silicone; 4, cabo coaxial e 5, tubos de polietileno (entrada e saída do fluxo).	36
Figura 3.3. Desenho do suporte confeccionado em acrílico para adaptação do eletrodo de pH ao sistema de análise em fluxo.....	37
Figura 3.4: Sistema de titulação por multicomutação. transportador (NaCl 0,01 mol l ⁻¹); tampão trishidroximetilaminometano pH 9,0 (1x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹) vazão (1,0 ml min ⁻¹); solução titulante (NaOH); b1 = bobina reacional 1 (500 cm); b2 = bobina reacional 2 (70 cm), volume de amostra (0,28 ml).	38
Figura 3.5. Visão da tela do programa utilizado para o controle do sistema de multicomutação. (a) seleção do método a ser executado; (b) seleção da pasta onde os resultados obtidos devem ser salvos; (c) número de determinações; (d) tempo de cada determinação; (e) inicia o método selecionado; (f) display de velocidade da bomba; (g) controle manual da bomba (velocidade e sentido); (h) permite a execução da bomba em percentagem de rotação máxima; (i) parada manual da bomba; (j) controle manual das válvulas.....	39
Figura 3.6: Esquema do frasco pressurizado utilizado nas análises de FDN...	44
Figura 3.7: Curva de calibração do forno microondas utilizado no experimento	45
Figura 3.8: Ilustração da análise de FDN utilizando o método proposto	47

Figura 4.1: Eficiência de limpeza do sistema em um tempo fixo de 90 s em função da variação do pH do tampão.	51
Figura 4.2: Eficiência de limpeza do sistema em um tempo fixo de 90 s em função da elevação da concentração da solução tampão tris, pH 9,0.	52
Figura 4.3: Comportamento do sinal analítico com a variação do pH da solução tampão	52
Figura 4.4: Curva titulação do tampão tris-hidroximetilaminometano.....	53
Figura 4.5: Avaliação da posição de inserção da solução tampão . concentração de amostra = $0,05 \text{ mol l}^{-1}$	54
Figura 4.6: Variação do potencial do eletrodo em função da concentração do íon Li^+	55
Figura 4.7: Variação do potencial do eletrodo em função da concentração do íon K^+	55
Figura 4.8: Variação do potencial do eletrodo em função da concentração do íon Na^+	56
Figura 4.9: Avaliação do volume do reator b1 do sistema apresentado na figura 3.4. nesse estudo o reator b2 foi fixado em 70 cm.....	57
Figura 4.10: Avaliação do volume do segundo reator em relação ao sistema apresentado na figura 3.4. O reator b1 foi fixado em 500 cm.	58
Figura 4.11: Variação de potencial em função do volume de amostra inserida no sistema descrito na figura 3.4	59
Figura 4.12: Acompanhamento da zona de amostragem em função do tempo de limpeza do sistema apresentado na figura 3.4.....	59
Figura 4.13: Estudo da vazão da solução transportadora em função da variação de potencial, referente ao sistema apresentado na figura 3.4.....	60
Figura 4.14: Estudo da vazão da solução transportadora em função da eficiência de limpeza do sistema apresentado na figura 3.4.	61
Figura 4.15: Curva de calibração obtida com o sistema proposto na figura 3.4.	62
Figura 4.16: Curva de titulação obtida para o padrão: ácido láctico ($0,05 \text{ mol l}^{-1}$) e ácido acético ($0,01 \text{ mol l}^{-1}$) no sistema apresentado na figura 3.4.	63
Figura 4.17: Curva de titulação da solução tampão no sistema apresentado na figura 3.4. titulação do tampão	64

Figura 4.18: Cromatograma obtido da análise de amostra de silagem de capim brachiaria brizantha, cv marandu.	65
Figura 4.19: Curvas de titulação realizadas no sistema por multicomutação. (a) silagem de milho; (b) silagem de cana; (c) silagem de capim.....	67
Figura 4.21: Gráfico de pareto obtido.....	69
Figura 4.22: (a) Gráfico de efeitos principais; (b) Superfície de resposta para recuperação de FDN.....	69
Figura 4.23: Número de amostras analisadas simultaneamente no sistema extrator proposto.	70
Figura 4.24: Análise de amostras com baixos teores de amido.....	71
Figura 4.25: Análise de amostras com altos teores de amido.....	72

Resumo

MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE FORRAGEIRAS UTILIZADAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. Foram propostos métodos alternativos para algumas determinações rotineiramente realizadas em laboratórios de nutrição animal, com o objetivo de aumentar a eficiência laboratorial e reduzir os custos, mantendo porém a qualidade analítica. A primeira parte descreve a implementação da técnica de titulação potenciométrica ponto a ponto em um sistema de multicomutação utilizando eletrodo de membrana de PVC (tridodecilamina) para a determinação da acidez total em extratos de silagem. O sistema de multicomutação desenvolvido empregou três válvulas solenóides de três vias para controle das soluções e uma bomba peristáltica para propulsão dos fluidos. O tempo e a seqüência de acionamento das válvulas, a velocidade da bomba peristáltica e a aquisição dos dados foram controlados por um programa dedicado, desenvolvido em plataforma Labview®, utilizando um microcomputador equipado com uma interface eletrônica. Para efeito de validação do método, foram analisadas pelo sistema proposto amostras de silagem de capim *Brachiaria*, de cana-de-açúcar e de milho. Os resultados indicaram concordância ao nível de 95% de confiança quando comparados aos obtidos por cromatografia gasosa (ácidos acético, propiônico e butírico) e líquida (ácido láctico) e por titulação em batelada. Em uma segunda etapa, foi proposto procedimento para a determinação de fibra em detergente neutro em amostras de forragens com o emprego da tecnologia “nylon bag” para o armazenamento das amostras e de aquecimento por radiação microondas em um sistema semi-pressurizado. A análise consiste na solubilização dos componentes do conteúdo celular solúveis em solução de detergente neutro, restando a fibra em detergente neutro, basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina, proteína lignificada e sílica, determinados por gravimetria após secagem em estufa. O método foi validado a partir de análises de amostras fornecidas pelo “Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal”, coordenado pela Embrapa Pecuária Sudeste, sendo obtida alta correlação entre os resultados, viabilizando a recomendação do emprego do método.

Abstract

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS TO QUALITY EVALUATION OF FORAGES USED IN ANIMAL NUTRITION. Alternative methods were developed for some determinations performed in routine by animal nutrition laboratories, in order to increase laboratory efficiency and reduce costs maintaining analytical quality. In the first step, a multicommutation point to point potentiometric titration system to total acid in silage extracts with the use of a PVC (tridodecilamine) membrane electrode is described. The multicommutation developed system employed three solenoid valves for solution management and a peristaltic pump for the fluid propulsion. The time and sequence of switching valves, the velocity of peristaltic pump and the data acquisition were performed through a developed program in the Labview® platform using a computer with an electronic interface. Silage samples of *Brachiaria* grass, sugar cane and corn were analyzed by the proposed system in order to method validation. The results indicated agreement in order of 95% of confidence when were compared with the ones obtained by gas chromatography (acetic, propionic and butyric acids), and liquid (lactic acid), and by bath titration. In a second step, an alternative method for determination of neutral detergent fiber in forage samples was proposed, with the use of the nylon bag technology to samples storage, and a semi-pressure system heating by microwave radiation. This analyze consists of a cellular inner components solubilization in neutral detergent solution, remaining the neutral detergent fiber, basically formed by cellulose, hemicelluloses, lignin, lignin protein and silica, gravimetrically determined after oven drying. The method was validated from samples analysis supplied by the “Ensaio de Proficiência de Laboratórios de Nutrição Animal”, coordinate by Embrapa Cattle-Southeast. High correlation was obtained among the results obtained with the proposed method and furnace by the program, therefore its employment could be recommended.

Sumário

1) – Introdução	2
2) – Revisão da Literatura	6
2.1 – Ensilagem	6
2.2 – Análise de ácido graxos voláteis e ácido láctico	11
2.3 – Titulação potenciométrica	13
2.4 – Análise por injeção em fluxo	15
2.5 – Comutação em análise em fluxo	18
2.6 – Sistemas de multicomutação	19
2.7 – Detecção potenciométrica em análise por injeção em fluxo	22
2.8 – Titulação potenciométrica em fluxo	24
2.9 – Métodos analíticos	26
2.10 – Metodologias analíticas em laboratórios de nutrição animal	27
3) – Materias e Métodos	32
3.1 – Sistema de Multicomutação para a Determinação Potenciométrica de Acidez Total em Amostras de Silagem utilizando eletrodo íon seletivo	32
3.1.1 – Equipamentos e acessórios	32
3.1.2 – Reagentes	33
3.1.3 – Construção e acondicionamento do eletrodo de pH	34
3.1.4 – Formulação da membrana sensora	35
3.1.5 – Sistema em fluxo com detecção potenciométrica	37
3.1.6 – Interfaces do sistema de multicomutação	38
3.1.7 – Preparo das amostras	41
3.1.8 – Análises cromatográficas	41
3.1.9 – Títulos potenciométricas	42
3.2 – Análise de fibra em detergente neutro empregando forno de microondas doméstico e sistema pressurizado	42
3.2.1 – Equipamentos e acessórios	42
3.2.3 – Reagentes e solução	43
3.2.4 – Amostras	43
3.2.5 – Sistema de pressurização	44
3.2.6 – Calibração do forno microondas	45

3.2.7 – Análise de fibras em detergente neutro.....	46
3.2.8 Planejamento Fatorial	47
4) – Resultados e Discussões	50
4.1 Otimização do sistema de análise em fluxo utilizando multicomutação para a determinação de acidez total em amostras de silagem com eletrodo íon seletivo.....	50
4.1.1 Definição da solução tampão	50
4.1.2 Força iônica.....	54
4.1.3 Volume da bobina reacional.....	56
4.1.4 Volume da amostra	58
4.1.5 Vazão da solução transportadora	60
4.1.6 Avaliação do desempenho do eletrodo indicador.....	61
4.1.7 Titulação da solução tampão	63
4.1.9 Aplicação do sistema em amostras de silagem de milho, cana de açúcar e capim brachiaria	65
4.2 Análise de fibra em detergente neutro empregando forno de microondas doméstico e sistema pressurizado.....	68
4.2.1 Planejamento Fatorial	68
4.2.2 Otimização do número de amostras por análise	70
5) – Conclusão	746
6) – Referências	78

INTRODUÇÃO

1) – Introdução

O desenvolvimento e o progresso de nossa civilização devem-se em parte aos fenômenos da domesticação de plantas e animais. A criação de animais constitui parte expressiva da economia mundial atual, sendo considerada atividade estratégica por envolver a segurança alimentar da população em muitos países (BERCHIELLI *et al.*, 2006). Esse processo é conhecido como pecuária, que pode ser definida como o conjunto de processos técnicos usados na domesticação e produção de animais com objetivos econômicos, feita no campo.

É bem sabido que a nutrição é uma variável importante no processo de criação de animais de qualquer espécie e a avaliação dos alimentos usados na alimentação animal é um aspecto que deve ser considerado. Para uma alimentação eficiente é necessário o conhecimento das exigências dos animais, assim como a extensão pela qual diferentes alimentos suprem essas necessidades (SILVA & LEÃO, 1979). Muitas dessas informações são fornecidas por análises químicas, demandando métodos analíticos confiáveis para o monitoramento do valor nutritivo desses alimentos.

Na nutrição de ruminantes, as fibras são considerados nutrientes essenciais, pois produzem ácidos graxos voláteis (AGV) durante a fermentação ruminal, os quais são as principais fontes de energia para o animal. O processo de análise de fibras envolve a solubilização de componentes da parede celular em meio de detergentes neutro e ácido, sendo um processo demorado e moroso.

Outra condição a ser avaliada é o processo de conservação dos alimentos. No caso de animais ruminantes, quando geralmente plantas forrageiras são utilizadas como alimentos, esse processo é fundamental, considerando a produção estacional quando são alternados, durante o ano, períodos favoráveis e desfavoráveis ao crescimento das plantas. Os efeitos disso sobre a pecuária de leite e de corte são evidentes.

A preocupação com a preservação de alimentos começa com início da história da humanidade (ASHBELL, 1994), sendo que seu principal objetivo é

reter a maior proporção possível da quantidade original de nutrientes do alimento durante o período de armazenagem (WEINBERG & ASHBELL, 2003).

Ao dominar os métodos de preservação, torna-se possível a produção de alimentos na estação mais conveniente e econômica, e a utilização de acordo com a demanda (ASHBELL, 1994). Existem vários processos de preservação tais como: resfriamento e congelamento, preservação por aquecimento (pasteurização, esterilização comercial), secagem, modificação na atmosfera entre outros.(POTTER, 2003). Por motivos econômicos e razões técnicas, a maioria desses métodos não se aplica à conservação de forrageiras. Essas são preservadas principalmente por fenação ou por ensilagem. Em geral a prática da fenação é restrita a plantas que secam rápida e uniformemente, além de necessitar de regiões com baixa umidade. Isso faz com que a ensilagem se torne um processo mais abrangente para a preservação de forrageiras.

Denomina-se silagem a forragem verde conservada por meio de um processo de fermentação anaeróbica. As silagens são guardadas em silos. Chama-se ensilagem o processo de cortar a forragem, colocá-la no silo, compactá-la e protegê-la com a vedação do silo para que haja a fermentação. (CARDOSO e SILVA, 1995). Esse processo fermentativo gera ácidos orgânicos, responsáveis pela redução do pH que proporciona a conservação das forrageiras. A quantidade destes ácidos tem grande influência na qualidade da silagem produzida, influenciando inclusive no sabor e aroma do produto.

Tendo em vista a importância econômica da criação de animais e o papel fundamental exercido pelo processo nutricional nessa criação, fica evidente a necessidade de metodologias analíticas que possibilitem uma avaliação confiável do valor nutricional das rações utilizadas. Este trabalho propôs um sistema de titulação por multicomutação para a determinação de ácidos graxos solúveis em amostras de silagem e uma adaptação do método proposto por Van SOEST (1963) para a análise de fibras em detergente neutro empregando radiação microondas e sistema pressurizado para potencializar a análise.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2) – Revisão da Literatura

2.1 – *Ensilagem*

O processo de ensilagem constitui um dos métodos mais seguros de garantir o alimento para o gado durante o inverno e secas prolongadas. Curtas estações de crescimento e a dificuldade nas condições de secagem a campo, durante a colheita, encorajam os produtores a armazenar culturas com alto conteúdo de umidade na forma de silagens, apesar de que as perdas durante o armazenamento e descarregamento possam ser substanciais (ANDRADE E MELOTTI, 2003).

O processo consiste nos seguintes passos: colheita da forragem no estágio ótimo de maturidade, secagem (quando possível) para inserir a quantidade adequada de matéria seca nos silos para favorecer a fermentação láctica, corte da forrageira, carregamento do silo, compactação e fechamento para exclusão do ar, armazenagem e por fim descarregamento para alimentação de animais (WEINBERG & ASHBELL, 2003).

Para que o processo dentro do silo seja conveniente à conservação da forragem, a fermentação deve ser capaz de proporcionar uma rápida queda do pH do material estocado. Tal evento requer principalmente três condições: ambiente anaeróbico, população suficiente de bactérias redutoras de ácido láctico e nível adequado de substrato na forma de carboidratos solúveis (LEIBENSPERGER *et al.*, 1987; MUCK, 1988; MCDONALD *et al.*, 1991).

O estabelecimento da condição de anaerobiose na silagem ocorre pela expulsão do ar existente entre as partículas de forragem e pela subsequente vedação do silo. O rápido estabelecimento desta condição é desejável, porque a presença de ar permite a respiração de células da planta e de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos presentes na forragem, ambos utilizando oxigênio para a degradação de substratos, notadamente açúcares, a dióxido de carbono (CO₂) e água. A respiração é prejudicial à qualidade da silagem, por causar perdas de matéria seca e de energia e reduzir a quantidade de carboidratos solúveis disponíveis para a fermentação das bactérias produtoras de ácido láctico. Além disso, as bactérias lácticas são

aerotolerantes, têm o crescimento estimulado em anaerobiose, produzindo grande quantidade de ácido, quando essa condição é estabelecida no interior do silo (EDWARDS e MCDONALD, 1978; MCDONALD *et al.*, 1991).

Quanto a população de bactérias redutoras, considera-se o número de aproximadamente 10^8 bactérias láticas por grama de material ensilado como suficiente para garantir uma fermentação apropriada à conservação da silagem (MUCK, 1988). Entretanto, várias espécies de bactérias pertencentes a diferentes gêneros são capazes de fermentar açúcares a ácido lático como produto principal (PONTES & MARINHO, 1997). Elas podem ser agrupadas em duas categorias básicas: homofermentativas, que produzem apenas ácido lático, e as heterofermentativas, que apresentam, além do ácido lático, o etanol, ou o ácido acético adicionados ao CO_2 , como produtos finais da fermentação (Tabela 1) (MCDONALD *et al.* 1991). Conseqüentemente, a produção de ácido lático é maximizada quando a fermentação é dominada pelas bactérias láticas homofermentativas, fato que pode determinar uma variação no número requerido de bactérias láticas sobre a forragem para a promoção de uma fermentação eficiente.

Tabela 2.1: Algumas bactérias produtoras de ácido lático em silagens.

Homofermentativas	Heterofermentativas
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus acidiphilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus viridescens</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroids</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Streptococcus bovis</i>	

Fonte: MCDONALD *et al.* (1991)

Os carboidratos solúveis, ou açúcares (mono e dissacarídeos), são os principais substratos utilizados pelas bactérias láticas para a fermentação,

embora compostos como proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos e hemiceluloses também possam ser fontes de substratos para a fermentação nas silagens (HENDERSON, 1993). A quantidade de carboidratos solúveis requerida para uma fermentação eficiente depende da quantidade de ácido que será necessária para a redução do pH aos níveis apropriados à conservação. Por sua vez, essa demanda de ácido varia com habilidade da massa ensilada para opor-se ao abaixamento de pH, ou seja, varia com a capacidade de tamponamento da forrageira (TOMICICH *et al.*, 2003).

Se utilizada uma forrageira que satisfaça todas as condições citadas nos parágrafos anteriores, os processos bioquímicos e microbiológicos que acontecem dentro do silo podem ser descritos por quatro estágios (WEINBERG e ASHBELL, 2003):

1. Processos aeróbicos durante o enchimento e imediatamente após o fechamento dos silos, enquanto o ar ainda está presente entre as partículas das plantas, o pH nesse estágio é 6,0 - 6,5. Neste estágio a respiração continua tanto quanto a proteólise e a atividade de microorganismos aeróbicos como enterobactérias, fungos e leveduras.
2. Fermentação, a qual é realizada por processos dinâmicos sucessivos da bactéria do ácido láctico que se altera de acordo com as condições que prevaleçam na silagem, o processo começa com a ação das espécies *Enterococcus* e *Leuconostoc*, seguida por *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Neste estágio há o acúmulo de ácido láctico e ácidos orgânicos e o pH decresce abaixo de 5,0, dependendo da composição da planta e capacidade tamponante.
3. Armazenamento, período quando o silo está fechado com mínimo de ar presente, portanto com poucas mudanças.
4. Descarregamento para alimentação, durante este estágio a silagem é posta em contato com o ar novamente, reativando os microorganismos aeróbicos, principalmente leveduras e fungos, que podem estragar a silagem.

A conservação do material ensilado relaciona-se com a queda do pH, por esse promover a diminuição da atividade proteolítica mediada por enzimas da própria planta e fazer cessar o crescimento de microorganismos

anaeróbicos indesejáveis, particularmente, enterobactérias e clostrídios (MUCK & BOLSEN, 1991).

As enzimas da forrageira capazes de promover a degradação de proteínas, as proteases das plantas, apresentam maior atividade quando o pH do meio situa-se entre 6 e 7. Contudo, mantêm alguma atividade em valores abaixo de 4 (HERON et al., 1989) e têm sua ação significativamente influenciada pela disponibilidade de água no meio (HENDERSON, 1993). Já as enterobactérias, microorganismos presentes nos intestinos de mamíferos, que contaminam as forragens ainda no campo, apresentam um pH ótimo para desenvolvimento por volta de 7, e a maioria das cepas não é capaz de crescer em valores de pH abaixo de 5 (MUCK & BOLSEN, 1991). Por sua vez, os clostrídios, considerados os principais microorganismos anaeróbicos que prejudicam a qualidade da silagem, contaminam a forragem na forma de esporos derivados de partículas do solo, iniciando seu crescimento logo que se estabelece condição de anaerobiose no silo. Como as enterobactérias, os clostrídios também são sensíveis a baixos valores de pH, mas são particularmente sensíveis à disponibilidade de água, sendo geralmente inativos em silagens com mais de 28% de MS, (EDWARDS e MCDONALD, 1978; FISHER e BURNS, 1987; LEIBENSPERGER & PITT, 1987; MCDONALD *et al.*, 1991). Portanto, o valor de pH adequado para promover a eficiente conservação da forragem ensilada está intimamente ligado à quantidade de umidade da forrageira.

Vários são os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação de silagens (lático, acético, isobutírico, propiônico, valérico, isovalérico, succínico, fórmico) (MCDONALD *et al.*, 1991), mas para a avaliação da qualidade do processo fermentativo, os mais comumente utilizados são os ácidos lático, butírico e acético.

Segundo ANDRANDE & MELLOTI, (2003), quanto mais ácido lático for produzido em relação aos ácidos acéticos e butírico, menor a energia dispendida para a produção de calor, menores são as perdas por descarboxilação, e menor é a formação de gases. Por tudo isso a silagem se torna mais energética e agradável em relação ao sabor e ao aroma para os

animais. A tabela 2.2 traz as principais rotas de produção dos ácidos orgânicos com a estimativa de perdas de matéria seca e energia inerentes a cada rota.

Tabela 2.2: Rotas sintéticas de ácidos orgânicos e perda de matéria seca e energia inerente a cada rota no processo fermentativo de silagens

Tipo de fermentação	Perda de MS	Perde de energia
Lática Homofermentativa		
1 glicose ----> 2 ácido láctico	0,0%	0,7%
Lática Heterofermentativa		
1 glicose ----> 1 ácido láctico + 1 etanol + 1 CO ₂	24,0%	1,7%
3 frutose ----> 1 ácido láctico + 2 manitol + 1 ácido acético + 1 CO ₂	4,8%	1,0%
Enterobactérias		
1 glicose ----> 1 ácido acético + 1 etanol + 2 CO ₂ + 2 H ₂	41,1%	16,6%
Clostridiana		
2 ácido Láctico ----> 1 ácido Butírico + 2 CO ₂ + 2 H ₂	51,1%	18,4%
3 alanina ----> 2 ácido propiônico + ácido acético + 3 NH ₃ + 1 CO ₂	22,0%	19,0%

Fonte: MCDONALD *et. al.* (1991)

Além disso, o ácido láctico é o ácido que possui maior constante de dissociação, por isso apresenta maior taxa de decréscimo da acidez e por consequência um pH final menor. Em contrapartida os ácidos butírico e acético estão relacionado a menores taxas de decréscimo de acidez e por consequência maiores pH final. E ainda como consta na tabela 2.2, esses ácidos são produtos de fermentação indesejada para a silagem (butírico/clostridiana, acético/heterofermentativa, enterobactéria, clostridiana) (TOMICH *et al.*, 2003).

2.2 – Análise de ácido graxos voláteis e ácido láctico

Haja visto a grande importância dos ácidos graxos voláteis, principalmente ácido acético, butírico e láctico, é de grande interesse a sua determinação, principalmente em análises de rotinas com fins em ciências agrárias.

Em geral, a análise de ácidos graxos é feita por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama - FID (do inglês Flame Ionization Detection) (SHANTHA *et al*, 1992).

Boa parte dos trabalhos encontrados tratam de ácidos graxos de cadeia longa. Para esses existem dois passos de importância fundamental para as determinações: a etapa de derivatização (como são compostos de elevado ponto de ebulição, é necessária a preparação de metil ésteres de ácidos graxos para a realização da análise) e a análise cromatográfica propriamente dita.

Para os ácidos graxos voláteis, entretanto, não há necessidade da etapa de derivatização, o extrato pode ser injetado diretamente no cromatógrafo gasoso, facilitando o processo de determinação. A obtenção desse extrato é relativamente simples e existem basicamente dois métodos que são bem aceitos e utilizados por grande parte dos laboratórios que realizam essas determinações.

KUNG Jr. *et al*. (1984), propuseram que o preparo das amostras fosse feito a partir da produção de um extrato aquoso com a silagem. Esse extrato é obtido misturando-se 25 g de silagem com 225 mL de água desionizada, processados em liquidificador industrial durante 1 min e a seguir filtrado. Segundo o autor supracitado, a partir desse extrato pode-se determinar as concentrações de ácido láctico, ácidos graxos voláteis (AGVs), etanol, pH e nitrogênio amoniacal. Outra alternativa para o preparo foi sugerida por SILVA e QUEIROZ (2002). Nesse caso, a silagem é pressionada em uma prensa hidráulica para a extração. Esse extrato é destinado à determinação dos parâmetros relacionados acima. Nessa metodologia é sugerida a adição de 200

g de silagem em uma prensa hidráulica de 24000 libras até a extração de 80 mL de extrato de silagem. Como não há a adição de solvente extrator evita-se a diluição da amostra favorecendo aumentando a sensibilidade da análise.

FUSSELL e MCCALLEY (1987) fizeram a determinação dos ácidos graxos voláteis juntamente com o ácido láctico em amostras de silagem por cromatografia gasosa. Nesse trabalho eles usaram uma coluna empacotada com polímero Carboxen de 1,5 m de comprimento e 4 mm de diâmetro interno. As condições do cromatógrafo eram: 240°C de temperatura para o injetor e detector, e fluxo de nitrogênio (gás carregador) de 40 mL min⁻¹. O preparo da amostra foi baseado no método proposto por KUNG Jr. (1984), onde 20 g de amostra foi agitada com 100 mL de água desionizada.

Outro trabalho onde é feita a determinação de ácidos graxos voláteis, mas em amostras de rúmen, utilizou cromatografia gasosa com coluna silanizada de 1,8 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno empacotada com 10% AT-1200 + 1% H₃PO₄ (80-100 mesh). As condições usadas foram de 150°C de temperatura de operação do forno e fluxo de nitrogênio (gás de arraste) de 30 mL min⁻¹. Nesse trabalho não foi determinado ácido láctico e os ácidos graxos voláteis foram determinados do C2 (ácido acético) ao C6 (ácido capróico) (LEVENTINI *et al.* 1992). DÖNMEZ *et al.* (2003) utilizaram-se do mesmo sistema de separação para determinar a quantidade de ácido láctico em amostras de silagem de milho e a quantidade de ácidos graxos voláteis (C2 à C4) em amostras de fluido ruminal de ovelhas com essas silagens. O preparo das amostras de silagem também foi feito segundo KUNG Jr. (1984), 25 g de silagem agitada com 100 mL de água desionizada.

Como pode ser observado pelos exemplos apresentados, grande parte dos métodos propostos para a análise de AGV e ácido láctico utilizam cromatografia gasosa, o que torna essa análise restrita a laboratórios que possuam este tipo de equipamento.

Uma alternativa ao método cromatográfico foi proposta por MOISIO *et al.* (1989), no qual as análises são feitas por titulação potenciométrica e os dados são tratados segundo método proposto por COMMON (1941). Utiliza curvas de capacidade tamponante (CT) para a obtenção do maior número de

resultados da curva de titulação, baseado principalmente, em dois princípios: (1) a forma de todas curvas CT são sempre as mesmas; (2) a curva CT da mistura é a soma das curvas de CT dos componentes multiplicada por suas respectivas concentrações. Com esse método os autores conseguiram determinar a quantidade de aminoácidos, ácido acético, ácido láctico, nitrogênio total, e açúcares redutores através de uma única titulação. O extrato para a titulação foi obtido através da prensagem da silagem conforme descrito por SILVA e QUEIROZ (2002).

Quanto às determinações dos ácidos graxos voláteis (o sistema determina ácido acético) e ácido láctico, há uma fonte de erro no que diz respeito à adição de ácido fórmico, usado como preservativo na preparação de silagem por muitos fazendeiros, já que os dois possuem pKa muito parecidos. Apesar disso não foram observados impedimentos para o controle de qualidade da silagem, visto que tanto o ácido láctico quanto o fórmico são benéficos para a qualidade da silagem em concentrações moderadas.

A determinação de acidez total também é um critério considerado na avaliação das condições fermentativas do processo de ensilagem, sendo a titulação o método mais usual para essa análise, sendo esta uma alternativa para laboratórios que não possuem equipamento apropriado para as análises seletivas dos ácidos. TUMANG *et al.* (2002) propuseram um sistema de multicomutação para determinação de acidez total em extratos de silagem utilizando detector espectrofotométrico. Esse sistema apresentou boa correlação com o método utilizando bureta, tanto potenciométrico quanto colorimétrico. A frequência analítica encontrada para este método foi entre 10-16 amostras por hora, numa faixa de concentração de 10^{-3} - 10^{-1} mol L⁻¹.

2.3 – Titulação potenciométrica

As técnicas potenciométricas medem o potencial dos eletrodos e sua variação com a mudança química, induzida no ambiente (CROW, 1994). Para realizar-se a análise são necessários apenas dois eletrodos: um indicador e um de referência. Em geral, o eletrodo indicador é íon-seletivo e o eletrodo de referência um eletrodo de prata/cloreto de prata ou calomelano. A diferença de potencial entre os dois eletrodos é medida; desde que o potencial do eletrodo de referência seja constante, as mudanças na célula de potencial são devido unicamente ao eletrodo indicador, que responde logaritmicamente à atividade das espécies em solução para a qual é sensível (BRETT e BRETT, 1994).

O processo de titulação é definido segundo a IUPAC como a determinação da quantidade de uma substância hipotética “A”, adicionando incrementos medidos de uma substância hipotética “B” (chamada titulante). A substância “A” reage com a quantidade adicionada de titulante, com o objetivo de encontrar o ponto final da titulação, no qual, essencialmente a reação está completa. Quando este ponto coincide com a adição exata do equivalente químico entre ambas espécies, é chamado ponto de equivalência, através deste ponto é possível determinar a quantidade do analito de interesse relacionando-se com a quantidade conhecida do titulante (INEZÉDY *et al.*, 1997).

Métodos potenciométricos podem ser usados para monitorar o curso de uma titulação, isto é, determinar o ponto final de uma titulação se o eletrodo indicador for sensível à pelo menos uma espécie química presente na solução a ser titulada (KELLNER *et al.*, 1998). A titulação potenciométrica proporciona resultados mais acurados do que o método correspondente empregando substâncias indicadoras. É particularmente usual para a titulação de soluções coloridas ou turvas e para a detecção de substâncias inesperadas presentes na solução (SKOOG *et al.*, 1998).

No trabalho de OSAWA *et al.* (2007) foi proposta a titulação potenciométrica como método alternativo ao método padrão da AOAC baseado em titulação com indicador para a determinação de ácidos graxos livres em amostra de óleos e gordura. O trabalho apresenta um valor médio de diferença

entre as duas metodologias de $13,1 \pm 3,1\%$ com variação de 8,0 a 17,8% (CV=23,3%). Nesse trabalho os autores concluíram que o método potenciométrico pode ser satisfatoriamente empregado na determinação da porcentagem de ácidos graxos livres de óleo.

As titulações potenciométricas são comumente empregadas em laboratórios para determinar os parâmetros físico-químicos dos produtos, os quais são direta ou indiretamente usados ou consumidos em nossas vidas diárias (TROMPIER, 2007). Entretanto, o processo de titulação é bastante moroso e requer um tempo elevado de análise. Tendo isso em vista foram propostas algumas melhorias, tais como, tituladores automáticos e titulações utilizando sistemas por injeção em fluxo.

2.4 – Análise por injeção em fluxo

Os sistemas de análise em fluxo - FIA (do inglês Flow Injection Analysis), têm sido utilizados principalmente para a mecanização/automação de análises químicas. Empregando esses sistemas é possível a implementação de praticamente todas as etapas envolvidas no processo analítico, tais como amostragem, separações, diluições, pré-concentrações, adição de reagentes, etc. (ROCHA *et al.*, 2000).

O processo tem como conceito básico a inserção da amostra em um fluido carregador, que a transporta para o detector. Inicialmente, a injeção da amostra no fluxo era feita empregando uma seringa hipodérmica, o que deu origem ao nome do processo. Ao longo do tempo, outros dispositivos foram propostos para a inserção da amostra no fluido carregador: injetor proporcional; válvula rotativa; válvulas de 6 e 8 vias; entre outros (REIS, 2000).

Durante aproximadamente vinte anos, foi aceito que a segmentação, dividindo o fluxo em compartimentos pequenos, regulares e separados por bolhas de ar, era a melhor maneira para se evitar o alargamento de uma zona discreta do analito (freqüentemente denominada de *dispersão da amostra*) no percurso, desde o ponto de sua introdução até o detector. Somente a partir da metade da década de setenta é que foi amplamente aceito que a segmentação podia ser omitida, utilizando-se sistemas em fluxo

com dimensões e vazões adequadas, simplificando-se assim o sistema analítico e aumentando-se o número de amostras que poderiam ser analisadas por unidade de tempo (freqüentemente denominado de *freqüência de amostragem*) (ZAGATTO *et al.* , 1999).

O processo de dispersão pode ser definido como a redistribuição de material através de incontáveis reposicionamentos dos elementos nos fluídos nas direções axial e radial causado pelos processos de convecção e difusão. A concentração resultante do soluto no fluido transportador é o resultado desses dois efeitos na zona de amostragem cilíndrica homogênea. A velocidade desses processos - e a extensão da mistura radial - depende principalmente do tipo de fluxo, se é, turbulento ou laminar (RUZICKA e HANSEN, 1988).

No fluxo turbulento, o movimento é caótico e a mistura em todas as direções, e igualmente intensa e rápida, resultando em rápida velocidade média com mínimo de dispersão, entretanto esse tipo de fluxo não é prático para amostras em fluxo, principalmente por requerer fluxos muito alto, o que é muito pouco econômico, ou tubos muito longos e estreitos que acarreta em uma pressão muito alta no sistema (RUZICKA e HANSEN, 1988).

O fluxo laminar é descrito por um número de Reynolds (Re) menor que 2100. O número de Reynolds é proporcional à densidade do fluído (ρ) e a vazão do transportador (Q) e é inversamente proporcional ao diâmetro interno do tubo (d_i) e a viscosidade do transportador. Um sistema FIA típico apresenta $d_i=0,05$ cm, Q entre $0,5 - 3$ mL min^{-1} , e um Re na faixa de 20-130. Nessas condições, a aerodinâmica é simétrica ao redor do centro do canal, onde o fluido move-se tão rapidamente quanto a velocidade do fluxo, enquanto a velocidade para as paredes do tubo tendem a zero. Conseqüentemente, milissegundos após a injeção, o perfil da zona de amostragem adquire uma distribuição parabólica centrossimétrica, sendo que a amostra esta distribuída ao longo desta parábola. Com essa distribuição da amostra não ocorre a interpenetração de amostras injetadas sucessivamente (RUZICKA e HANSEN, 1988).

Diversas são as possibilidades de sistemas que podem ser propostos empregando análise por injeção em fluxo. O sistema mais simples é o designado de sistema de linha única. Neste sistema, o fluído carregador é o reagente, e a mistura da amostra com o reagente ocorre exclusivamente pela

dispersão, enquanto a mesma é transportada em direção ao detector (REIS, 2000).

Entretanto, quando a razão entre os volumes de alíquota e do percurso analítico é inadequada, o reagente pode não alcançar o centro da amostra, em quantidade suficiente para satisfazer as condições para o desenvolvimento das reações químicas envolvidas. Para superar essa limitação, foi proposto um diagrama de fluxo onde a amostra é injetada em um fluxo transportador neutro, ou que contribua para a reação, e o reagente entra em contato com a amostra por confluência. Dessa forma, cada fração de amostra recebe a mesma quantidade de reagente e portanto não é formado gradiente de concentração de reagentes dentro do percurso analítico (REIS, 2000).

Além da automatização de análises químicas, pesquisadores da área de fluxo sempre buscaram a diminuição do volume de reagentes utilizados e por conseqüência a diminuição de resíduos gerados. Levando isto em consideração, apesar de o sistema FIA por confluência ter ampliado a gama de análises possíveis em relação ao sistema por linha única, a inserção de reagente neste diagrama ainda é contínua, ocasionando um consumo elevado de reagentes. Tendo isto em vista, houve a proposição de outro diagrama de fluxo, denominado inserção de amostras por zonas coalescentes (REIS, 2000).

Neste terceiro sistema, o reagente é injetado em sincronismo com a amostra, empregando alças, com isto, evita-se o consumo de reagente na ausência de amostra propiciando uma grande diminuição na geração de resíduos. Outra alternativa proposta ainda visando a diminuição de resíduos, foi a análise com fluxo intermitente, onde economiza-se o reagente durante a etapa de amostragem (REIS, 2000).

Em 1989 começou-se a desenvolver os sistemas de injeção por análise seqüencial, onde as válvulas de multiposição foram empregadas, essas traziam zonas de amostras e reagentes melhores definidas, proporcionavam diminuição no consumo de reagente e apresentava sistemas de configurações mais robustos (LENEHAN, 2002), foi a partir desses sistemas que começaram-se a utilizar válvulas para a inserção de amostra, trazendo uma revolução nos sistemas de fluxo.

Analisando a história da análise em fluxo, pode-se observar que desde o início da técnica até os dias atuais houve uma grande gama de mudanças,

principalmente visando diminuição do uso de reagentes e aumento do tempo de residência da amostra com mínima dispersão (REIS *et al.*, 1994). É fácil observar também que o desenvolvimento da análise em fluxo esta claramente ligado aos avanços nos dispositivos de comutação utilizados em análise em fluxo (KRUG *et al.*, 1986).

2.5 – Comutação em análise em fluxo

Comutação é definida como “(1) mudança de um estado em outro, (2) o ato de dar uma coisa para outra, (3) ato de substituir, (4) em eletricidade: a mudança de direção da corrente por um comutador” (MCKECHNIE, 1983).

Em processos de análise em fluxo, a comutação pode ser observada desde seus primórdios, nas análises segmentadas, onde um “braço” de amostragem era usado para selecionar amostra e solução carregadora alternadamente para ser aspirada através do caminho analítico (ROCHA *et al.*, 2002).

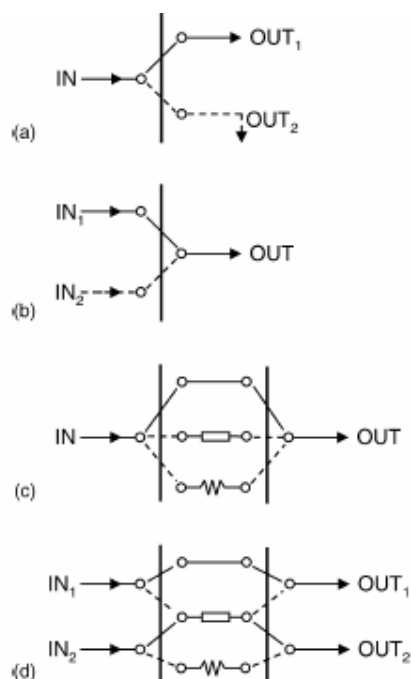


Figura 2.1: Representação de algumas comutações mecânicas em análise em fluxo. (a-d) linhas tracejadas representam o percurso do fluxo após a comutação (fonte: ROCHA *et al.*, 2002).

Os mecanismos mais simples de comutação envolve apenas redirecionamento de fluxo (fig. 2.1 "a" e "b"). Essa estratégia tem sido explorada por adição intermitente dos fluidos. No diagrama de comutação (fig 2.1a), a solução de limpeza pode ser adicionada após o sinal analítico ser alcançado, para reduzir o tempo de limpeza e aumentando a frequência analítica. Analogamente, o fluxo confluyente pode ser adicionado apenas quando a amostra está passando através do ponto de confluência, reduzindo o consumo de reagente. O mecanismo simples de comutação permite também a inserção de diferentes quantidades de espécies diversas no percurso analítico (fig. 2.1b), essa estratégia é geralmente usada em técnicas "sanduíche" e injeção seqüencial (ROCHA *et al.*, 2002).

Outro tipo de comutação mecânica (fig. 2.1c) envolve movimentação de componentes do sistema que é uma poderosa técnica para implementação de determinações simultâneas que envolvem discriminação cinética. Outra possibilidade é deslocar a amostra em um reator para aumentar o tempo de residência independente da dispersão (ROCHA *et al.*, 2002).

Uma outra estratégia usual para comutação mecânica envolve duas entradas e duas saídas de fluxo e oferece a possibilidade de seleção de diferentes percursos entre eles. Esta estratégia é bastante atrativa para troca iônica envolvendo adição e remoção de microcolunas, detecção "multilocalizada", entre outras (ROCHA *et al.*, 2002).

As potencialidades descritas acima podem ser expandidas pela replicação da ação e/ou repetição de todo mecanismo. Quando a configuração unitária de um sistema de comutação é repetida, apenas dois estados para o sistema podem ser estabelecidos e uma comutação interligada é alcançada. Com isso, sistemas versáteis podem ser alcançados de maneira a tirar vantagem dos mecanismos discretos de comutação com operações independentes. Essa é a essência os sistemas de multicomutação (ROCHA *et al.*, 2002).

2.6 – Sistemas de multicomutação

Sistemas baseados no conceito da multicomutação podem ser considerados a última geração de analisadores em fluxo (ZAGATTO *et al.*,

1999). A técnica teve início com REIS *et al.*(1994), que propuseram um sistema constituído de diversas válvulas solenóides, sendo que cada uma atua como um comutador independente.

As válvulas solenóides comportam-se como um interruptor entre dois estados: LIGA e DESLIGA, sendo que duas das três portas da válvula estão sempre conectadas. Tomando-se como exemplo o diagrama esquemático da figura 2.1a, quando a válvula esta desligada, a solução transportadora é aspirada para o detector. Quando é ligada, um pulso eletrônico de intensidade programada permite a inserção de amostra neste transportador. O volume de amostra inserida é proporcional à intensidade do pulso que pode ser alterado de acordo com a mudança do perfil da seqüência de inserção (ICARDO *et al.*, 2002).

O trabalho pioneiro de fluxo visava a determinação de ferro em digeridos de planta. Nele a introdução da amostra e de reagentes no percurso analítico foi realizada por aspiração utilizando uma bomba peristáltica de canal único. As válvulas foram posicionadas numa rede de fluxo de modo a facilitar a inserção de pequenas quantidades de amostra e reagente de maneira alternada. Conseqüentemente, o início do percurso analítico foi preenchido com uma fileira binária formada por pequenas quantidades de amostra e reagentes de maneira alternada. Enquanto a fileira foi transportada até o detector, dispersão mutua ocorreu na interface líquida. Dessa maneira uma mistura homogênea tende a ser rapidamente alcançada, proporcionando condições para o desenvolvimento de reações químicas (REIS *et al*, 1994). A figura 2.2 ilustra todo esse processo. Para o controle deste sistema, foi utilizado um microcomputador IBM 386 equipado com uma placa PCL 711 conectada à placa mãe.

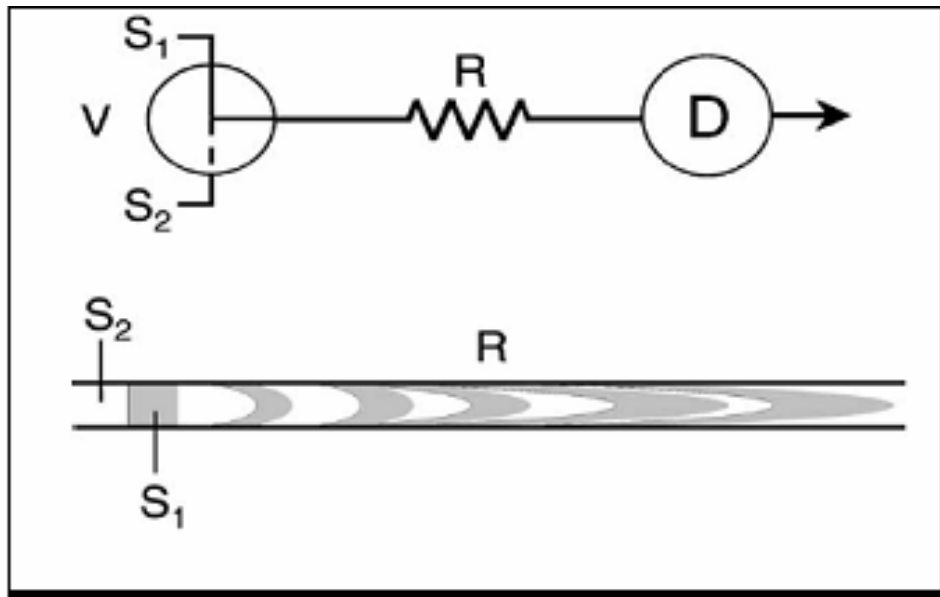


Figura 2.2: Representação do processo de amostragem binária e mistura da amostra. S1 e S2: soluções miscíveis, V: válvula solenóide, R: reator, D: detector. A linha tracejada significa o caminho analítico após a comutação (fonte: ROCHA *et al*, 2002)

Os sistemas de multicomutação trazem diversas vantagens em relação aos outros sistemas de análise em fluxo, as principais são as seguintes (ICARDO *et al*, 2002):

- a. Miniaturização de sistema de fluxo: com a inserção de pequenas quantidades pelas válvulas solenóides e interface eletrônica permitem o desenvolvimento de sistemas mais compactos e portáteis para análises sucessivas.
- b. Redução de consumo de amostra e reagente: configurações simples em sistemas de multicomutação permitem uma microdistribuição tanto de reagentes quanto amostra com bastante precisão; volumes de poucos microlitros podem ser inseridos com bastante precisão.
- c. Aumento da reprodutibilidade: válvulas solenóides requerem mínima intervenção do operador. O processo de inserção das espécies podem ser controlados via software por computador. Desse modo, a multicomutação contribui para a completa automatização dos métodos analíticos.
- d. Flexibilidade: multicomutação permite a pronta variação do tamanho do reator, volume de injeção e no final, qualquer variável que influencie no perfil da dispersão, sem alteração no sistema físico do sistema. As

alterações podem ser feitas alterando a duração do pulso elétrico que determina se as válvulas estão abertas ou fechadas, ou alterando a suas seqüência de comutação.

- e. Possibilidades expandidas para análise em fluxo: o controle eletrônico proporciona uma maior eficiência de controle de dispersão regional e temporal e no aumento da flexibilidade da multicomutação. Isso capacita esses sistemas a realizar de forma eficiente modos de implementação de gradiente (parada de fluxo, zonas coalescentes, zona de amostragem), métodos automáticos para determinação de multiparâmetros, e métodos complexos de sistemas multicanais que podem ser operados de maneira simples e efetiva.

2.7 – Detecção potenciométrica em análise por injeção em fluxo

Muito embora grande parte dos trabalhos realizados na área de análise em fluxo apresentem como processo de detecção a espectrofotometria, a detecção potenciométrica também foi aplicada em análises em fluxo, sugerindo o desenvolvimento dos sistemas denominados FIP (Flow Injection Potentiometry). (COUTO e MONTENEGRO, 2000).

Observou-se que a inserção de detectores potenciométricos em sistemas de fluxo contribui para uma melhoria das suas características operacionais, destacando-se a reprodutibilidade do sinal analítico, a rápida velocidade de resposta e o condicionamento contínuo da membrana sensora. Além disso, contribui para minimizar o problema de deslizamento de potenciais, para uma melhoria da seletividade analítica e evita a contaminação resultante do eletrodo de referência (COUTO e MONTENEGRO, 2000). Tudo isso torna muito interessante a realização de análises potenciométricas em fluxo.

Para se alcançar todas essas vantagens inerentes ao acoplamento FIA-eletrouímica, primeiramente houve uma evolução nas celas eletroquímicas utilizadas nos sistemas. Nos primeiros trabalhos, empregando eletrodos em sistemas em fluxo, as aplicações foram implementadas com eletrodos convencionais, o que dificultava o acoplamento dos mesmos nos

sistemas, e originava montagens pouco robustas. Visando superar estas dificuldades e obter um melhor aproveitamento das potencialidades do processo FIA, foram desenvolvidos eletrodo com geometria mais apropriada para o acoplamento aos módulos de análises. Dentre as geometrias propostas, a tubular permite a construção do eletrodo indicador com diâmetro igual ao do percurso analítico, facilitando o acoplamento direto (MARTELLI *et al.*, 1998).

Quanto aos tipos de eletrodos utilizados, os eletrodos íon seletivos (ISE, do inglês Íon Seletive Eletrodes) ganhou destaque na moderna potenciometria (TROJANOWICZ, 2000). A International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), define esses eletrodos como um sensor eletroquímico baseado em um filme fino ou em uma membrana seletiva a um elemento de reconhecimento. A diferença de potencial medida nestes eletrodos, tem como principal componente a variação da energia de Gibbs associada com a transferência de massa permiosseletiva através do limite de fase. O ISE deve ser usado em conjunto com um eletrodo de referência (eletrodo de referência interno ou externo) para completar a cela eletroquímica. A diferença de potencial medida é linearmente dependente ao logaritmo da atividade de algum íon em solução (BUCK, 1994).

A grande utilização dos eletrodos íons seletivos começou a partir de 1957, sendo que a primeira grande revolução na construção dos ISE foi em 1966 com a construção de eletrodos de membrana líquida. Em 1970, no País de Gales, ocorreu a segunda revolução na construção de ISE, neste momento foi utilizado pela primeira vez o eletrodo de membrana líquida à base de membrana de PVC. A introdução de PVC como material de membrana simplificou bastante a construção dos ISE. A importância destes trabalhos pode ser observada pelo fato de que o ISE-K baseado em valomicina e na matriz de PVC, é atualmente utilizado em quase todos analisadores clínicos comercializados (FERNANDES *et al.*, 2001).

As membranas líquidas a base de PVC são compostas principalmente dos seguintes componentes: 1. Ionóforo, é o componente mais importante da membrana íon-seletiva. Esse se liga ao íon primário, discriminando-o dos íons interferentes. Essa seletividade vem da forte complexação com o íon primário, e da deficiente complexação com íon interferentes. 2. Íons Lipofílicos, a presença de íons lipofílicos na membrana seletiva garante a exclusão de íons

com carga oposta ao íon primário, mantendo a concentração do íon primário constante na membrana, os mais usados são sais de amônio quaternário para ânions e derivados de tetrafenilborato para cátions. 3. Plastificantes, estes são importantes porque reduzem a viscosidade e proporciona homogeneidade para a membrana e ainda propiciam uma relativa mobilidade dos íons na membrana. Os plastificantes usualmente utilizados são o bis(2-etilexil) sebacate (DOS, apolar) e o *o*-nitrofeniloctil éter (*o*-NPOE, polar). 4. Matriz Polimérica, fornece estabilidade mecânica à membrana e não pode ter interação química com o íon em análise. ISEs de membrana polimérica geralmente usam cloreto de polivinila (PVC) como matriz (TORRES, 2006).

Existem diversos trabalhos que utilizam eletrodos tubular de membrana líquida a base de PVC, MARTELLI *et al.* (1998), propuseram a construção de um eletrodo tubular sensível ao íon hidrogênio para análise em fluxo, utilizando como ionóforo a tridodecilamina (TDDA) obtendo uma faixa linear de resposta de 3,5-12, e uma inclinação da curva de 51,6. Este sensor já foi utilizado anteriormente em outros trabalhos, sendo que o primeiro descrito foi de SHULTTHESS *et al.* (1981). HONGBO *et al.* (1985) avaliou o comportamento de diversos tipos de ionóforos (tridodecilamina, trioctilamina, trihexilamina, entre outros) em sistemas de fluxo em extrato de solo, sendo que estes citados apresentaram a melhor faixa linear de resposta pH entre 4,0 – 11 e inclinação da curva entre 56,9 e 59,9.

Este tipo de eletrodos tubulares de membrana líquida a base de PVC sensível a íons hidrogênio passaram a ter ampla utilização em sistemas em fluxo, sendo que uma vertente de trabalhos muito forte são as titulações potenciométricas em fluxo.

2.8 – Titulação potenciométrica em fluxo

Como já mencionado anteriormante, as titulações potenciométricas já são comumente empregadas em laboratórios para determinar os parâmetros físico-químicos dos produtos. Entretanto, é um processo bastante moroso e requer um tempo elevado de análise, o que leva a uma constante pesquisa visando a automatização do processo.

Uma opção para essa automatização tem sido a análise em fluxo. Os primeiros trabalhos que unem titulação e análise em fluxo são de BLADELL e LAESSIG (1964 e 1965), os quais descrevem adição variáveis ou não de titulante em um fluxo constante de amostra.

Diversos trabalhos foram propostos a partir destes, sendo que depois da proposição dos sistemas de multicomutação o número de trabalhos teve um salto muito grande chegando a aproximadamente 221 nos anos 90 e 227 no período de 2000-2007 (fonte www.webofscience.com, palavras chaves: titration and flow and analysis).

Dentre estes trabalhos, SAAD et al. (2007) propuseram um sistema para a determinação da quantidade de ácidos graxos livres em amostras de óleo de palma. O sistema consistia basicamente além da bomba peristáltica, de uma válvula rotatória, um câmara de mistura (preparada a partir de uma seringa de 5 mL) e um espectrofotômetro. Uma solução de KOH colorida devido ao acréscimo de indicador passava pelo sistema e a amostra era adicionada neste fluxo, ambos solubilizados em solvente 2-propanol, o decréscimo do sinal analítico era monitorado para em seguida obter-se a curva de titulação, esse sistema também foi adaptado pela inserção do reagente por confluência. O método descrito foi avaliado como eficiente em relação ao método de infravermelho com transformada de Fourier.

Utilizando detecção potenciométrica, BORGES *et al.* (2000) realizaram titulações de acidez total em amostras de bebidas, com um sistema multissegmentado utilizando um eletrodo tubular de membrana de PVC com sensor de tridodecilamina como detector. O sistema consistia de quatro válvulas solenóides duas delas destinadas ao carregador e à inserção de bolhas de argônio no início e final do plugue de amostra e as outras duas utilizadas pelo titulador e titulante. Para manter a força iônica constante, uma solução de cloreto de sódio foi utilizada como carregador. Esse sistema não apresentou diferença significativa ao nível de 95% quando comparado ao procedimento da AOAC. A frequência analítica encontrada foi de 22 amostras por hora e o desvio padrão relativo de 1,5%.

MARTELLI *et al.* (1999) propuseram um sistema bastante semelhante, também por multicomutação, tendo por diferenças o uso de um tampão ($5,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ tetraborato de sódio, mais 20×10^{-5} mol L⁻¹ de fosfato de

hidrogênio dissódico, mais $13 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de citrato de sódio) como carregador e o acréscimo de uma válvula solenóide no sistema que tinha por função manter o volume da análise e a força iônica do meio constante pela adição de uma solução de cloreto de sódio.

Em outro sistema, PAIM *et al.* (2002) utilizaram a reação de iodato (IO_3^-) por ácido ascórbico para a determinação do segundo em amostras de formulação farmacêutica, utilizando também sistema de multicomutação e membrana íon-seletiva ao íon iodato. Nesse sistema empregou-se apenas uma válvula, esquematizada tal como a figura 2b. A faixa de concentração do ácido ascórbico ficou entre $7,5 - 15 \text{ mmol L}^{-1}$ e quando comparado com o método manual esses resultados não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de significância.

Observa-se nestes trabalhos uma grande versatilidade de amostras analisadas e sistemas propostos para titulações e sistemas em fluxo, comprovando que este tipo de análise é uma das tendências da moderna química analítica.

2.9 – Métodos analíticos

Em adição à revolução da metodologia analítica proveniente do desenvolvimento dos conceitos de análise em fluxo, os processos de análise, recentemente, passam por desenvolvimento de novas estratégias de amostragem, tratamento de amostras e exploração dos dados, através de pesquisas em amostragens de campo, procedimentos por microondas e quimiometria (GUARDIA, 1999).

A extração assistida por microondas (MAE, do inglês Microwave Assisted Extraction) ganhou particular popularidade devido ao uso da irradiação microondas na análise de analitos voláteis por headspace para subsequente amostragem com micro-extração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Micro Extraction). Conceitualmente, MAE é uma extração líquido-líquido utilizando-se solvente com aquecimento à temperatura que beneficia a extração proporcionado pela irradiação de microondas. Entretanto, esse aquecimento é muito mais rápido em relação ao convencional, devido a

absorção da energia por um dipolo do solvente ou da amostra, fazendo assim crescer a velocidade das análises (RAYNIE, 2004).

Outro avanço importante são as análises quimiométricas. Essas podem ser definidas como um artifício da química analítica e das ciências de medidas que utiliza-se de matemática, estatística e outros métodos de lógica formal para determinar (freqüentemente por meios indiretos) as propriedades de substâncias (LAVINE, 2000) proporcionando o máximo de informação química relevante através dos dados possuídos. Além disso, são usadas também para o planejamento de experimentos, visando a otimização do trabalho experimental (ESTEBAN, 2006), sendo este último chamado planejamento fatorial.

O planejamento fatorial permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA, 2005). Neste tipo de estudo é muito importante ter-se bem definidos os fatores e as respostas que serão trabalhados. Os fatores, em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar, enquanto que as respostas são as variáveis de saída do sistema. A grande vantagem apontada neste tipo de planejamento é a consideração dos efeitos de interação entre as variáveis o qual proporciona maior confiança nas condições otimizadas.

Com todos esses avanços apontados, nem as técnicas de rotina laboratorial permanecem estáticas, pelo contrário estas estão em constante mudança em busca de melhores respostas tanto em relação à sensibilidade quanto à repetibilidade, de uma maior velocidade analítica ou ainda um melhor relação custo benefício.

2.10 – Metodologias analíticas em laboratórios de nutrição animal

A análise química de alimentos é fundamental quando o objetivo é a avaliação da sua qualidade, a partir de informações sobre seus teores de nutrientes, para viabilizar dietas balanceadas. A quantificação desses nutrientes presentes nos alimentos para animais proporciona maior

conhecimento do seu valor nutritivo, possibilita adequar dietas mais eficientes e racionalizar a utilização dos recursos (NOGUEIRA *et. al.*, 2005).

Visando a quantificação mais eficiente dos nutrientes, uma dieta mais balanceada e por conseqüência uma melhor produtividade, laboratórios de rotina de nutrição animal, têm percebido a necessidade de se manter atualizado quanto às novas tendências analíticas, tendo desta forma mantido constante aperfeiçoamento das técnicas empregadas na medida do possível e quando vantajoso.

A análise de matéria seca, por exemplo, que baseia-se na evaporação da água presente na amostra pela ação do calor, convencionalmente é realizada com estufa de secagem a 105°C, entretanto alguns laboratórios já se utilizam da radiação microondas segundo o método de SOUZA *et al.* (2002) para a realização dessas análises. Esta alteração implica em um ganho de tempo de 4306 min.

Outra análise de extrema importância que vem sofrendo mudanças contínuas no decorrer dos anos é a análise de fibras. Esta tem importância central nas análises de nutrição animal visto que produzem ácidos graxos voláteis (AGV) durante a fermentação ruminal, os quais são as principais fontes de energia para o animal. A princípio determinava-se apenas o teor de fibra bruta (FB), ou seja a porção dos carboidratos totais que resiste à hidrólise ácida e alcalina, constituindo-se, basicamente, de celulose e lignina insolúvel. Entretanto dessa maneira, havia um erro grave embutido, devido à solubilização de parte da lignina (fração solúvel em álcali diluído) e hemicelulose (SOUZA, 2003).

Com o objetivo de determinar a parede celular e fracionar seus componentes (hemicelulose, celulose e lignina), Van Soest (1963) propôs o método de extração baseado na solubilização de constituintes do conteúdo celular através do emprego de uma solução neutra de lauril sulfato de sódio (pH 7,0) e EDTA, denominada de Fibra em Detergente Neutro (FDN) a qual recupera a maior parte dos componentes da parede celular (basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina, proteína lignificada e sílica). No entanto, no resíduo insolúvel poderá conter proteínas insolúveis, nitrogênio ligado e alguns minerais (SOUZA, 2003).

Visando ainda solubilizar a proteína insolúvel e a hemicelulose, outro procedimento de extração foi proposto, denominado de Fibra em Detergente Ácido (FDA), o qual, através de fracionamento, possibilita determinar o teor de lignina e celulose (VAN SOEST & WINE, 1968). O nitrogênio lignificado, a lignina e a celulose são insolúveis em solução fortemente ácida (H_2SO_4 , $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), contendo um detergente quaternário brometo de cetil trimetilamônio ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$).

Analisando a evolução dos procedimentos propostos para FDN e FDA, percebe-se que, no primeiro trabalho de VAN SOEST, a determinação era morosa e lenta, (agitava-se a solução de detergente neutro com amostra à temperatura de ebulição sob refluxo por 1h, após filtrava-se, enxaguava o filtrado com água quente e acetona, por fim o produto era secado e a determinação feita por gravimetria), além disso dependia muito da mão de obra individual, o que limitava muito a eficiência do procedimento.

Posteriormente, como metodologia alternativa foi proposto um sistema comercial ANKOM, que utiliza recipientes de nylon, denominados filtros (filter bags), neste processo as amostras são pesadas e agitadas com a solução de detergente em ambiente fechado. Esta técnica garante condição homogênea de digestão e filtração para todas as amostras e possibilita, ainda, a realização de um número bem maior de análises por dia (12 amostras por hora), pois algumas etapas do método proposto por Van SOEST (1963), como as lavagens e filtrações sucessivas, que anteriormente eram feitas manualmente, passam a ser feitas no próprio sistema (BERCHIELLI et al., 2001). Esse método apresentou boa concordância com o original, segundo comprovaram KOMAREK (1993) e CONTRERAS-LARA (1999).

Por outro lado, esse método utiliza um analisador e filtros comerciais, sendo que estes possuem um valor elevado e não estão ao alcance de todos os laboratórios de rotinas. Tentando contornar um desses inconvenientes SOUZA *et al.* (submetido) confeccionaram filtros de TNT (tecido não tecido) para a realização de as análises utilizando o analisador ANKOM e compararam com os filtros de nylon. Os resultados descritos apresentaram boa concordância e justificaram o uso de filtros de TNT em substituição aos filtros comerciais para a análise de FDA e FDN em analisador ANKOM, tornando um pouco mais acessível este procedimento para pequenos laboratórios de rotina.

Entretanto ainda não há trabalhos na literatura que proponham alternativas para o uso do próprio analisador, sendo que este necessita de um investimento inicial razoavelmente elevado e torna ainda assim este processo inviável para pequenos laboratórios de rotina em nutrição animal.

MATERIAIS E MÉTODOS

3) – Materiais e Métodos

3.1 – Sistema de Multicomutação para a Determinação Potenciométrica de Acidez Total em Amostras de Silagem utilizando eletrodo íon seletivo

3.1.1 – Equipamentos e acessórios

Os seguintes equipamentos e acessórios foram empregados para o desenvolvimento do procedimento proposto:

- Agitador magnético (Corning PC-420, USA);
- Cromatógrafo gasoso (Finnigan 9001);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu 10 ADVP, Japão);
- Bomba peristáltica com 8 canais (Gilson miniplus, França);
- Eletrodo íon seletivo tubular construído em grafite (membrana seletiva tridodecilamina);
- Eletrodo Ag/AgCl (Orion, 90-02-00, USA);
- Eletrodo de vidro de junção dupla (Analion V631-5, São Paulo)
- Microcomputador Pentium 100, equipado com placa para interface eletrônica (Advantech PCL – 711S, EUA);
- Papel de filtro qualitativo;
- Potenciômetro (Analion PM608, São Paulo);
- Potenciômetro (Mettler Toledo 355 Ion Analyzer, Inglaterra);
- Registrador potenciométrico XY (Kipp & Zonen, modelo BD112, Holanda)
- Tubos de polietileno (0,8 mm.d. i.);
- Tubos de Tygon[®] para bombeamento das soluções;
- Válvulas solenóide (161T031 – Nresearch, EUA);

3.1.2 – Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes químicos de alto grau analítico. Água deionizada foi empregada no preparo das soluções e padrões, antes de sua utilização era submetida à radiação ultra-sônica por 30 minutos para a eliminação do CO₂ solúvel.

- Tridodecilamina (TDDA) (Fluka, Suíça);
- Bis(2etilhexil)sebacato (BEES) (Fluka, Suíça);
- Tetrakisclorofenilborato de potássio (KTPCIPB) (Fluka, Suíça);
- Matriz polimérica policloreto de vinila (PVC) (Fluka, Suíça);
- Tetrahidrofurano (THF) (Vetec, Rio de Janeiro)
- Hidróxido de sódio (Synth, São Paulo) 1,0 mol L⁻¹, preparada em meio de NaCl 0,1 mol L⁻¹ (titulante);
- Cloreto de sódio (Synth, São Paulo) 0,1 mol L⁻¹ (para manutenção da força iônica do meio);
- Solução tampão Trishidroximetilaminometano (C₄H₁₁NO₃) (Vetec, Rio de Janeiro) 5x10⁻³ mol L⁻¹ preparada em meio de cloreto de sódio 0,1 mol L⁻¹ (estabilizador do eletrodo indicador);
- Solução padrão cromatográfica de ácido acético (Fluka, Suíça): transferiu-se 4,82 mL de ácido acético P.A para um volume final de 100 mL, completado com água;
- Solução padrão cromatográfica de ácido propiônico (Fluka, Suíça): 5,99 mL de ácido propiônico P. A. para um volume final de 100 mL, completado com água;
- Solução padrão cromatográfica de ácido butírico (Fluka, Suíça): 7,34 mL de ácido butírico P. A. para um volume final de 100 mL completado com água;
- Solução padrão cromatográfica de ácido láctico (Supelco, USA): 8,48 mL de ácido láctico P. A. para um volume final de 100 mL, completado com água;
- Ácido láctico comercial (Reagen, Rio de Janeiro)
- Ácido Acético comercial (Qhemis, São Paulo)

Observações:

- As soluções de titulantes utilizadas foram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque utilizando-se sempre solução de cloreto de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Estas sempre foram padronizadas utilizando-se bureta manual e solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de biftalato de potássio (Nuclear, Rio de Janeiro).

3.1.3 – Construção e acondicionamento do eletrodo de pH

Construção do Transdutor Grafite-Epóxi

A resina epóxi foi preparada pela mistura de Araldit M e do composto Hardener HR (Giba-Geigy) numa respectiva proporção em peso de 1:0,4. A essa mistura foi adicionado pó de grafite (Merck) numa proporção em peso de 1:1.

Na construção dos eletrodos tubulares (Fig. 3.1), foi empregado um cilindro de acrílico oco de comprimento de 7 mm, com diâmetros interno e externo de 7 e 10 mm, respectivamente. Através de um orifício lateral deste cilindro foi inserido o condutor central de um cabo coaxial que possuía uma placa de cobre de 6 x 2 mm soldada em sua extremidade. Essa placa foi então ajustada à parede interna do cilindro, que posteriormente foi preenchido com uma pasta grafite-epóxi previamente preparada. Durante o preenchimento tomou-se o cuidado de manter o cabo coaxial encostado à parede interna do cilindro de modo a evitar o posterior contato entre o material condutor do cabo coaxial e da membrana sensora. Após 24 h à temperatura de 70°C , período necessário para secar o suporte condutor, os dois lados do cilindro foram lixados sobre uma superfície plana e, em seguida, recobertos com uma camada de cola Araldite M não condutora. A seguir, estando seca esta camada, foi feito um furo de 0,8 mm de diâmetro no centro do cilindro no sentido axial, onde as soluções das membranas sensoras foram gotejadas empregando-se uma pipeta tipo “Pasteur”. Essa operação de aplicação das membranas foi repetida 10 vezes com intervalos de 30 min entre cada aplicação, para evaporação do solvente.

Na aplicação da solução sensora evitou-se a inundação do canal, pois com a evaporação do solvente poderia ocorrer a obstrução do mesmo. Após completadas estas operações, os eletrodos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 24 h, para garantir total evaporação do solvente orgânico. Finalizadas estas etapas, foram feitas as conexões elétricas e a montagem do eletrodo conforme mostrado na Figura 3.2.

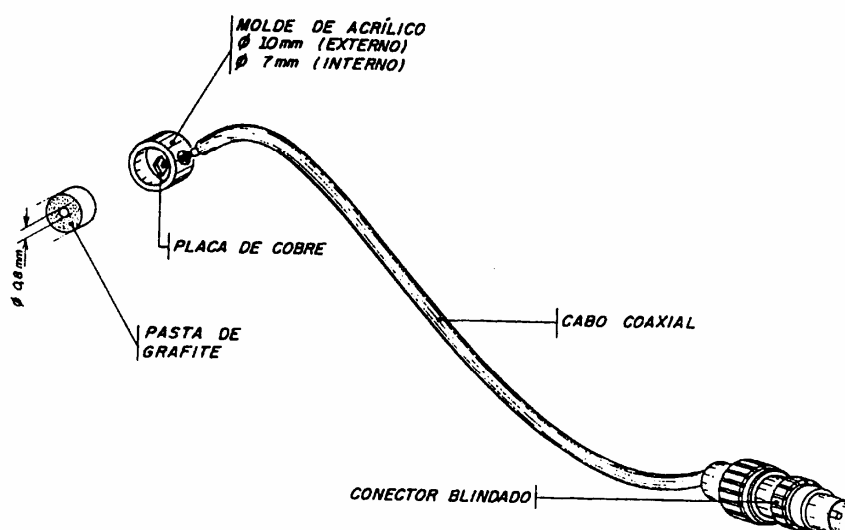


FIGURA 3.1. Detalhes do eletrodo tubular

3.1.4 – Formulação da membrana sensora

A membrana sensora foi preparada seguindo as proporções otimizadas por LEMOS *et al.* (submetido), e tinha a seguinte composição:

Todos os reagentes utilizados nessa seção são provenientes da Fluka® (Suíça). As composições das membranas seletivas estão descritas na Tabela 3.1, com proporções relativas em peso (%) entre parênteses.

Tabela 3.1: Formulações das membranas seletivas com proporções relativas em peso (%).

pH	Ionóforo	Plastificante	PVC	Aditivo
	Tridodecilamina (1,0)	Bis (2-etilhexil) sebacato (65,6)	(32,8)	tetrakis (4-clorofenil) borato de potássio (0,6)

Após a secagem das membranas sensoras, os eletrodos foram condicionados bombeando-se durante um período de 4 h, soluções contendo $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de tampão Tris (pH 7), através dos eletrodos. Enquanto os eletrodos não estavam sendo utilizados, seu canal era preenchido com a solução utilizada para seu condicionamento e as extremidades vedadas com luvas de polietileno. No início de cada período de trabalho o acondicionamento dos eletrodos era feito bombeando-se novamente a solução contendo $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de tampão Tris por aproximadamente 15 min.

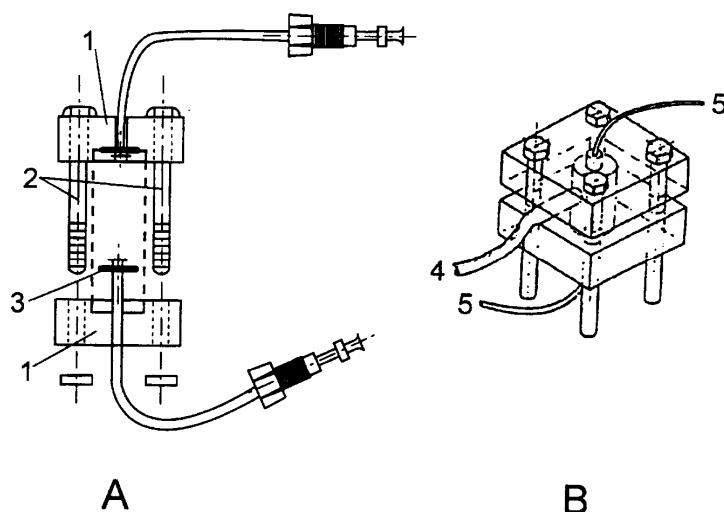


FIGURA 3.2. Detalhes da montagem final do eletrodo. A, vista do suporte em corte; B, vista do eletrodo adaptado no suporte; 1, suporte de acrílico; 2, parafusos; 3, anéis de borracha de silicone; 4, cabo coaxial e 5, tubos de polietileno (entrada e saída do fluxo).

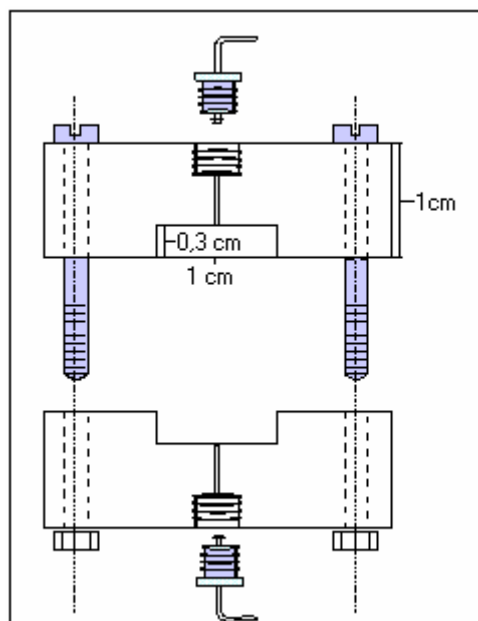


FIGURA 3.3. Desenho do suporte confeccionado em acrílico para adaptação do eletrodo de pH ao sistema de análise em fluxo.

3.1.5 – Sistema em fluxo com detecção potenciométrica

A resposta potenciométrica do eletrodo de pH foi medida em um sistema de análise em fluxo apresentado na Figura 3.4. Este sistema é constituído de uma bomba peristáltica, um potenciômetro, um registrador potenciométrico e um eletrodo de referência Ag/AgCl em solução saturada de KCl e de dupla junção líquida. Uma solução 10% de KNO_3 foi utilizada como solução de preenchimento externo do eletrodo de referência. Um tubo de aço inoxidável conectado a aterramento elétrico foi introduzido no fluxo principal do sistema com o objetivo de minimizar possíveis correntes espúrias oriundas da rede de distribuição elétrica e efeitos estáticos harmônicos gerados pela fricção dos tubos de propulsão com os roletes da bomba peristáltica.

O sistema de fluxo se baseia em uma titulação ponto a ponto onde a amostra e o titulante são inseridos por meio de válvulas solenóides no fluxo transportador. Essa etapa foi repetida mantendo o volume de amostra constante ($228 \mu\text{L}$) e elevando o volume de titulante num incremento de $16 \mu\text{L}$ por injeção até que se encontrasse o volume de equivalência da titulação. Visando manter a força iônica do meio constante, foi utilizada solução salina $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ como solução transportadora e preparou-se a solução de

hidróxido de sódio (titulante) também em meio dessa mesma solução, sendo que o incremento de volume de titulante era acompanhado de um decréscimo proporcional da solução transportadora para manter tanto a força iônica quanto o volume da solução constantes. Após a passagem da solução titulada pela primeira bobina reacional (B1 = 500 cm), responsável pela mistura entre a amostra e o titulante, era inserido por confluência o tampão 1×10^{-4} mol L⁻¹ Tris pH 9,0 (1 mL min^{-1}), que tinha por função estabilizar o eletrodo e diminuir o tempo de limpeza da análise. O tampão era inserido após a bobina B1 para evitar interferência na reação ácido/base e passava no sistema de forma contínua. Para evitar a formação de gradientes de concentração após a inserção do tampão, foi adicionada outra bobina reacional (B2 = 70 cm) após a confluência. Na figura 3.4 é apresentado o diagrama esquemático do sistema proposto.

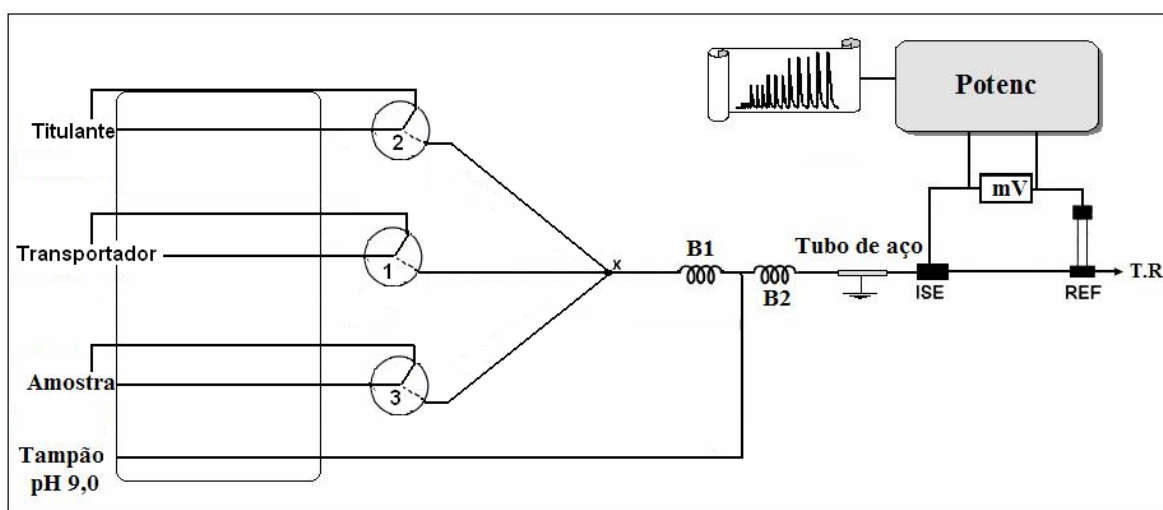


Figura 3.4: Sistema de titulação por multicomutação. Transportador (NaCl 0,01 mol L⁻¹); tampão Trishidroximetilaminometano pH 9,0 (1×10^{-4} mol L⁻¹) vazão ($1,0 \text{ ml min}^{-1}$); solução titulante (NaOH); B1 = bobina reacional 1 (500 cm); B2 = bobina reacional 2 (70 cm), volume de amostra (0,28 mL).

3.1.6 – Interfaces do sistema de multicomutação

O sistema de multicomutação está conectado a um microcomputador com interface eletrônica para acionamento das válvulas e controle da bomba peristáltica. Essa interface era constituída de uma placa PCL 711S (Advantech)

e o controle do sistema era realizado por programa desenvolvido em plataforma Labview® (National Instruments) (Figura 3.5). Além do controle das válvulas e da bomba peristáltica, o software também possibilita a aquisição dos dados. Por meio de código binário é possível desenvolver métodos (tabela 3.2) a serem armazenados no microcomputador e executado pelo programa. O desenvolvimento desta etapa foi realizado em colaboração com a Embrapa Instrumentação Agropecuária.

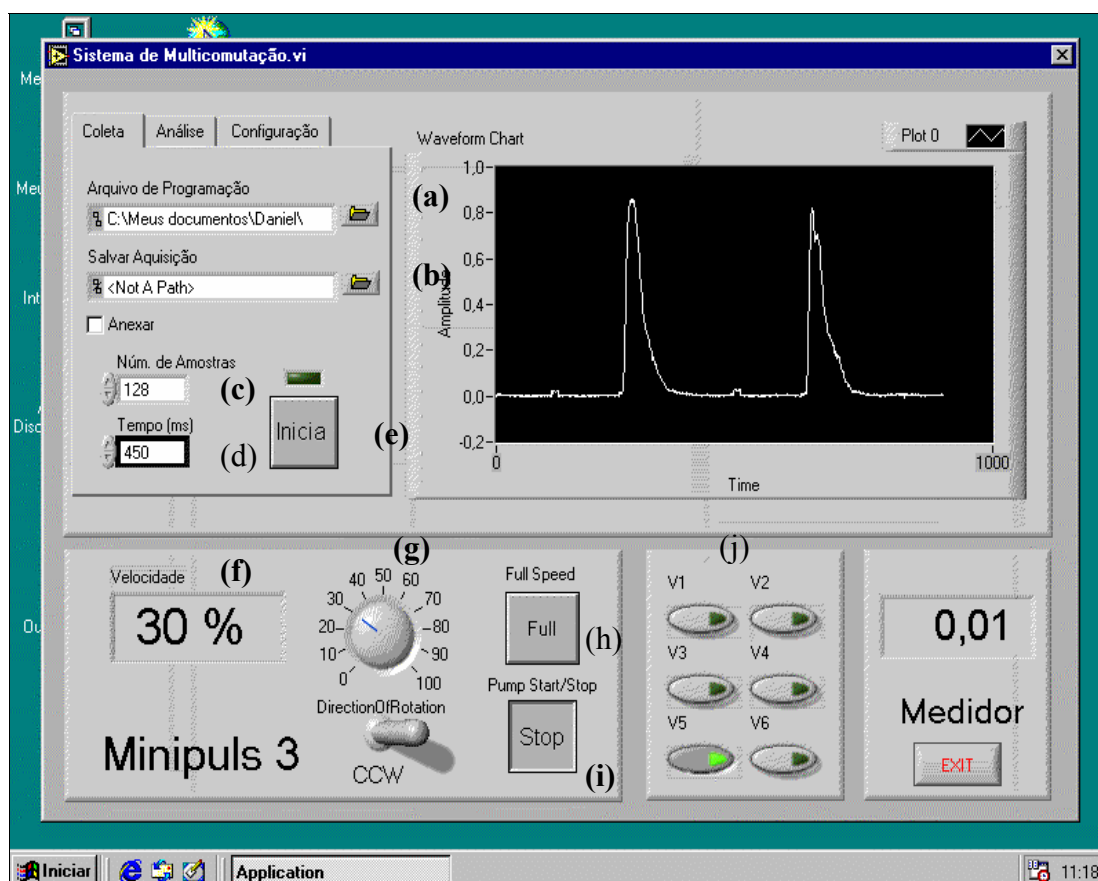


FIGURA 3.5. Visão da tela do programa utilizado para o controle do sistema de multicomutação. (a) seleção do método a ser executado; (b) seleção da pasta onde os resultados obtidos devem ser salvos; (c) número de determinações; (d) tempo de cada determinação; (e) inicia o método selecionado; (f) display de velocidade da bomba; (g) controle manual da bomba (velocidade e sentido); (h) permite a execução da bomba em percentagem de rotação máxima; (i) parada manual da bomba; (j) controle manual das válvulas.

Tabela 3.2: Programa de execução usado para titulação de amostras de silagem

Etapas	Válvulas	Velocidade (%)	Sentido	Tempo (s)
1	1,0,1,0,0,0	100	CW	6
2	0,0,0,0,0,0	100	CW	84
3	1,0,1,0,0,0	100	CW	3
4	1,1,0,0,0,0	100	CW	1
5	1,0,1,0,0,0	100	CW	3
6	0,0,0,0,0,0	100	CW	83
7	1,0,1,0,0,0	100	CW	3
8	1,1,0,0,0,0	100	CW	2
9	1,0,1,0,0,0	100	CW	3
6	0,0,0,0,0,0	100	CW	82
10	1,0,1,0,0,0	100	CW	3
11	1,1,0,0,0,0	100	CW	3
12	1,0,1,0,0,0	100	CW	3
13	0,0,0,0,0,0	100	CW	81
14	0,0,0,0,0,0	100	CW	0
15	END			

Tabela 3.3: Etapas de execução do processo em fluxo

ETAPA	VÁLVULA	SOLUÇÃO	VAZÃO (mL min ⁻¹)	TEMPO (s)
1	3 e 1	amostra	2,8	6
2	*	NaCl	1	84
3	3 e 1	amostra	2,8	3
4	2 e 1	titulante	1	1
5	3 e 1	amostra	2,8	3
6	*	NaCl	1	83
7	3 e 1	amostra	2,8	3
8	2 e 1	titulante	1	2
9	3 e 1	amostra	2,8	3
10	*	NaCl	1	82
11	3 e 1	amostra	2,8	3
12	2 e 1	titulante	1	3
13	3 e 1	amostra	2,8	3
14	*	NaCl	1	81

* a válvula 1 (referente ao fluxo transportador), que passa quase que continuamente no sistema, está conectada invertida, passando fluxo no momento em que está desligada, como forma de preservação da válvula.

3.1.7 – Preparo das amostras

A metodologia de avaliação do teor ácido total em amostras de silagem envolve uma etapa prévia de extração. Neste trabalho amostras de silagem de milho (*Zea mays*, L.), silagem de capim napier (*Pennisetum purpureum*) e silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foram utilizadas. As amostras coletadas do silo foram submetidas à extração sem tratamento prévio para evitar ao máximo a perda de analitos por volatilização. A extração foi realizada de acordo com o descrito no trabalho de Tumang *et. al.* (2002) no qual: 5 g de silagem eram pesadas e agitadas em agitador magnético com 80 mL de água por 10 min. Após essa etapa, a solução era filtrada por duas vezes para evitar que houvesse entupimento no sistema de fluxo.

Para a validação do método, foram realizadas análise cromatográfica e titulação potenciométrica em batelada, além da análise no sistema em fluxo proposto, sendo os resultados dos três procedimentos comparados por meio do teste *t* de Student em nível de 95 % de confiança.

3.1.8 – Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório de nutrição animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo campus de Pirassununga.

A determinação dos ácidos graxos voláteis foi feita por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (FID - do inglês, Flame Ionization Detection), nas seguintes condições: oxigênio (gás comburentes) vazão de 175 mL min⁻¹. Hidrogênio (gás combustível) vazão de 15 mL min⁻¹. As temperaturas de operação foram: injetor - 220°C, coluna - 150°C inicial, mantendo por 2 min e seguida de uma rampa com incrementos de 10°C por min até atingir 210°C; detector de ionização de chama - 250°C. A coluna empregada foi de vidro com 2 metros de comprimento x 1/8" de diâmetro, empacotada com 80/120 Carbowax B-DA/4% Carbowax 20M. O equipamento

foi calibrado com uma solução de padrão misto e uma curva já previamente estabelecida no programa do equipamento (BORWIN versão 1.21.60), o volume de amostra injetada foi de 1 μL .

A determinação do ácido láctico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography). As condições de análise foram: coluna C_{18} -ODS de 15 cm/0,6cm de diâmetro de partículas com 5 μm e poros de 100 Å, temperatura do forno de 50°C, fase móvel H_2SO_4 $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com fluxo de 1,0 mL min^{-1} ; detecção ultravioleta ($\lambda = 210 \text{ nm}$). Para a análise o cromatógrafo pré- aquecido foi calibrado com injeções de 2 μL da solução de padrão misto em uma curva já estabelecida no programa do equipamento (SHIMADZU CLASS-VP versão 5,031) o volume de amostra injetada foi de 2 μL .

3.1.9 – Titulações potenciométricas

Para as titulações potenciométricas em batelada foram empregados um potenciometro e um eletrodo de vidro de junção dupla. O incremento de volume foi de 50 μL , o volume de extrato titulado foi 10 mL e a concentração de hidróxido de sódio variável conforme a necessidade.

Para a determinação do volume de equivalência das titulações tanto em batelada quanto em fluxo foi utilizado um software desenvolvido em plataforma quickbasic pelo Dr. Eduardo F. de Almeida Neves professor emérito da Universidade Federal de São Carlos baseado no método da Segunda derivada.

3.2 – Análise de Fibra em detergente Neutro Empregando Forno de Microondas Doméstico e Sistema Pressurizado

3.2.1 – Equipamentos e acessórios

Para o desenvolvimento do procedimento foi necessária a utilização dos seguintes materiais.

- Agitador magnético (Corning PC-420, USA);

- Balança analítica (Ohaus AP2500, Suíça);
- Dessecador a vácuo, com luva, tampa e fundo, em vidro borossilicato, equipado com placa de porcelana e sílica-gel azul;
- Estufa com entrada de ar forçada;
- Filtros de TNT (Tecido-Não-Tecido);
- Microondas doméstico (Brastemp/Eletrolux);
- Sistema de pressurização em polietileno, adaptado no laboratório.

3.2.3 – Reagentes e solução

- Composição da solução de detergente neutra:
 - Etilenodiaminotetraacético (Vetec, Rio de Janeiro-Br) = 0,064 mol L⁻¹;
 - Dodecilsulfato de sódio (Synth (90%), São Paulo-Br) = 0,126 mol L⁻¹;
 - Hidrogênio fosfato de sódio (Synth, São Paulo-Br) = 0,032 mol L⁻¹;
 - 2-metoxietanol (Synth, São Paulo-Br) = 0,131 mol L⁻¹;
 - Tetraborato de sódio (Synth, São Paulo-Br) = 0,034 mol L⁻¹;
- Propanona P.A. (Dinâmica, Br);
- Solução de Uréia 8 mol L⁻¹ (Vetec, Rio de Janeiro-Br);
- Solução de α -amilase (Novozymes / α - amilase termamyl 120 L).

3.2.4 – Amostras

Para o desenvolvimento desta etapa do trabalho foram utilizadas amostras fornecidas pelo Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal da Embrapa (SOUZA *et al.*, 2005). Esse material possui avaliação estatística contendo a média e desvio padrão de aproximadamente 36 laboratórios. As amostras utilizadas foram: capim Napier (*Pennisetum purpureum* cv. Guaçu), capim Tanzânia (*Panicum maximum* cv Tanzania), capim Elefante (*Pennisetum purpureum schum*), feno de capim tifton (*Cynodon ssp* cv. 85), leguminosa de estilosante de campo grande (*Stylosanthe capitata* e *Stylosanthe macrocephala*), farelo de trigo e de arroz integral. Estas amostras

foram moídas em moinho de facas de aço inoxidável de bancada (tipo Wiley) com peneira de 1 mm (20 a 40 *mesh*).

3.2.5 – Sistema de pressurização

O procedimento de análise de fibras em detergente neutro foi realizado empregando um novo modelo de frasco de extração pressurizado a ser utilizado sob radiação microondas. A vantagem proveniente desta modificação deve-se à elevação da temperatura de ebulição inerente ao aumento da pressão. Essa elevação da temperatura facilita a solubilização dos componentes da parede celular e, por conseqüência, diminui o tempo de análise.

A Figura 3.6 apresenta os detalhes do frasco utilizado, o qual é constituído basicamente de 2 componentes principais, sendo um compartimento inferior (1), de forma cilíndrica, totalmente fechado, onde é armazenada a solução de detergente neutro; e (2) uma tampa contendo uma válvulas e um pino de segurança.

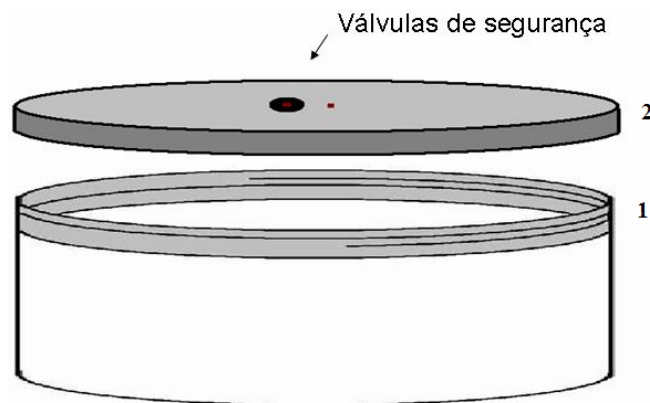


Figura 3.6: Esquema do frasco pressurizado utilizado nas análises de FDN

O frasco tem o funcionamento similar à uma panela de pressão. É totalmente fechado, o vapor da solução não pode dispersar-se e assim a pressão interna aumenta, tornando-se superior à pressão atmosférica. A elevação da pressão faz com que a solução entre em ebulição a temperaturas superiores que quando submetido à pressão atmosférica; o vapor formado levanta o pino de uma válvula de segurança localizada na parte central da

tampa e é liberado. Nesse momento a pressão do vapor se estabiliza e a temperatura do interior do frasco permanece constante. O acoplamento deste frasco com forno de microondas traz o benefício de um aquecimento mais rápido, devido à interação entre a radiação microondas e o dipolo da solução e a migração iônica. É importante atentar para a necessidade de o material do frasco ser transparente à radiação microondas.

3.2.6 – Calibração do forno microondas

Para o aquecimento da solução de detergente neutro no sistema pressurizado primeiramente foi efetuada a calibração do forno de microondas, para garantir a confiabilidade e o registro dos parâmetros utilizados na análise. Foi utilizado para isso o método da elevação da temperatura da água, valendo-se do conceito de que a elevação de temperatura (ΔT) é diretamente proporcional à potência da radiação de microondas, conforme descrito por ROSSINI *et al.* (2004). A equação 4.1 foi utilizada para o cálculo da potencia e a curva de calibração correspondente está apresentada na Figura 3.7.

$$P = C_p \cdot n \cdot \Delta T \cdot t^{-1} \quad (4.1)$$

Na equação: C_p = capacidade calorífica da água; n = quantidade de matéria da água; ΔT = variação da temperatura; t = tempo

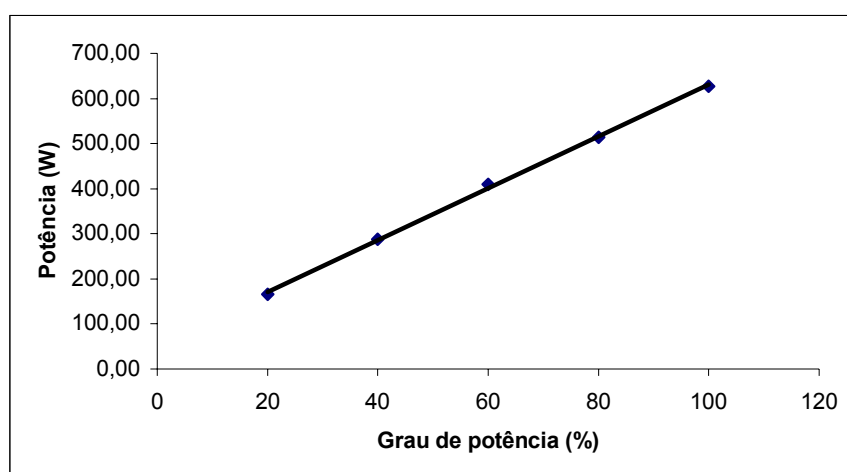


Figura 3.7: Curva de calibração do forno microondas utilizado no experimento

3.2.7 – Análise de fibras em detergente neutro (FDN)

Para as análises, foram empregados filtros de TNT (Tecido-não-Tecido) 6x5cm conforme proposto por SOUZA *et al.* (submetido). As amostras foram pesadas e inseridas nos filtros (0,25 g) e digeridas em solução de FDN, em sistema pressurizado acoplado à radiação microondas. Os parâmetros experimentais deste processo foram avaliados através de um planejamento fatorial 2³, sendo otimizados em 20 min de análise, potencia de 627 W e 1 L de solução de detergente. Para amostras com altos teores de amido (farelo de trigo e farelo de arroz) foi necessário um período de incubação prévia, também avaliado neste trabalho, e otimizado em 30 min com soluções de uréia 8 mol L⁻¹ (125 mL) e amilase termoestável (4,5 mL) à 90°C. Após digestão, os filtros contendo as amostras foram submetidos a três enxágües com água destilada quente durante cinco min e, posteriormente, escorridos e imersos, por três minutos, em acetona. Os filtros foram secos em estufa com circulação forçada de ar, a 105°C por três horas. Em seguida, foram colocados em dessecador e, após atingirem a temperatura ambiente, foram pesados. A partir desses dados foram calculadas a concentração de FDN utilizando a equação 4.2:

$$\%FDN = \frac{(P3 - (P1 \times C1)) \times 100}{P2} \quad (4.2)$$

sendo que:

P1= tara do saquinho; P2= peso da amostra; P3= peso após o processo de extração, e C1= peso final do saquinho após secagem/peso do saquinho original).

A Figura 3.8 é mostra um esquema de funcionamento da análise de FDN utilizando o método proposto.

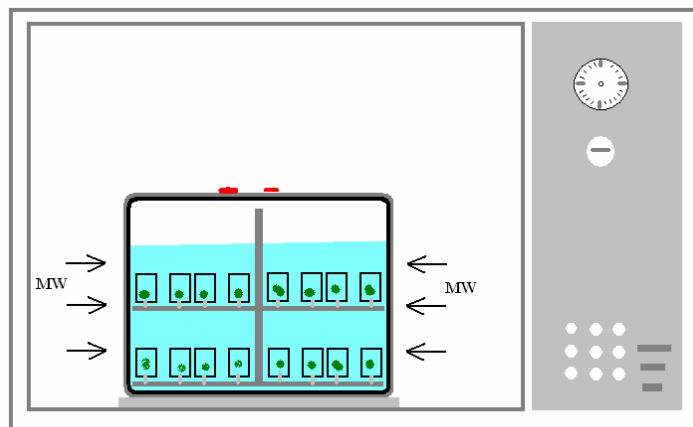


Figura 3.8: Ilustração da análise de FDN utilizando o método proposto

3.2.8 Planejamento Fatorial

Para o processo de otimização das melhores condições de determinação de fibra em detergente neutro, foi proposto um planejamento fatorial em dois níveis 2^3 . Os parâmetros avaliados foram tempo de exposição à radiação microondas (t), com os níveis de variação inferior e superior de 5 e 20 min, potência aplicada (P) com variações de 343 e 627 W (50 à 100%) e volume de solução extratora (V), 0,5 e 1,5 L (tabela 3.4). Os dados obtidos pelo planejamento fatorial foram analisados com o software Statgraphics plus for Windows 3.0. Além disso foram otimizados o período de incubação do amido e o número de filtros por análise por meio de planejamento univariado. No primeiro, foram feitos 4 experimentos nos quais foram variados o tempo de incubação da seguinte forma: (1) 0 min; (2) 15 min, (3) 30 min e (4) 45 min. Para evitar problemas de saturação do meio pelo amido, nos experimentos 3 e 4, a mistura, que consistia de 120 mL de solução de uréia e 4,5 mL de solução de α -amilase foi substituída a cada 15 min. Após cada etapa de incubação, foi realizada a extração de fibra das amostras pelo método proposto. No segundo planejamento foram feitos 5 experimentos variando-se o número de filtros no

processo de extração conforme descrito a seguir: (1) 10; (2) 12; (3) 15; (4) 18 e (5) 20 filtros. A resposta avaliada em todos os planejamentos foi a porcentagem de recuperação baseada nos valores fornecidos pelo EPLNA (SOUZA *et. al.*, 2005).

Tabela 3.4: Variáveis estudadas com seus níveis baixo e alto.

Variável	Nível Baixo (-)	Nível Alto (+)
Potencia do microondas (W)	343,37	627,48
Volume de solução extratora (L)	0,5	1,5
Tempo de análise (s)	5	20

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4) – Resultados e Discussões

4.1 Otimização do sistema de análise em fluxo utilizando multicomutação para a determinação de acidez total em amostras de silagem com eletrodo íon seletivo

Para a realização das análises em fluxo, foi necessário primeiramente avaliar os parâmetros inerentes ao sistema. Foram otimizados a concentração e o valor do pH da solução tampão, a solução salina (força iônica) e sua concentração, o volume das bobinas reacionais, o volume de amostra injetado e a vazão da solução transportadora, sendo para isso utilizado um planejamento univariado.

4.1.1 Definição da solução tampão

Conforme descrito na literatura (HAUSER *et al.*, 1989; HONGBO *et al.*, 1985), para a estabilização do eletrodo de membrana polimérica à base de tridodecilamina é necessário o contato da membrana com uma solução de pH constante, ou seja, uma solução tampão. Para que essa solução não interfira na determinação é recomendado o uso de soluções com baixa capacidade tamponante (β), da ordem de 10^{-4} à 10^{-5} mol L⁻¹.

HAUSER *et al.* (1989), propuseram o uso de tampão Imidazol (10^{-4} mol L⁻¹) pH 6,9 em meio de solução de KCl 0,01 mol L⁻¹, resultando em um β de 6×10^{-5} . HONGBO *et al.* (1985) utilizaram tampão hidrogenofosfato de potássio em meio de cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹, o que resultou em uma capacidade tamponante de $2,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

No presente trabalho, dentre as diversas soluções tampão avaliadas a única que apresentou eficiência na estabilização do eletrodo foi a solução Tris-HCl, provavelmente por ter sido a mesma utilizada no condicionamento do eletrodo. As investigações sobre as condições mais adequadas para a solução indicaram que maiores valores de concentração e de pH resultaram em maior

eficiência na limpeza do sistema, provavelmente devido à maior concentração de íons OH^- presentes no fluxo, que por sua afinidade por íons H^+ diminuem a saturação da interface eletrodo-solução. Nas figuras 4.1 e 4.2 é apresentada a comparação entre a eficiência de limpeza (%) em função do pH e da concentração da solução tampão, em um tempo fixo de 90 s. Como menores valores de pH resultam em potenciais maiores, o incremento de potencial resultante da injeção da amostra diminui, comprometendo a determinação (Figura 4.3). Em função desses resultados, optou-se pela definição dos seguintes parâmetros: pH 9,0 e concentração $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Tris, sendo esse valor de concentração definido em função de apresentar capacidade tamponante (β) próxima aos valores descritos na literatura e eficiência de limpeza do sistema próxima a 100%. Na figura 4.4 é apresentada a curva de titulação da solução tampão. O valor β , calculado segundo o procedimento proposto por SILVA & SIMONI (2000), foi de $1,34 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

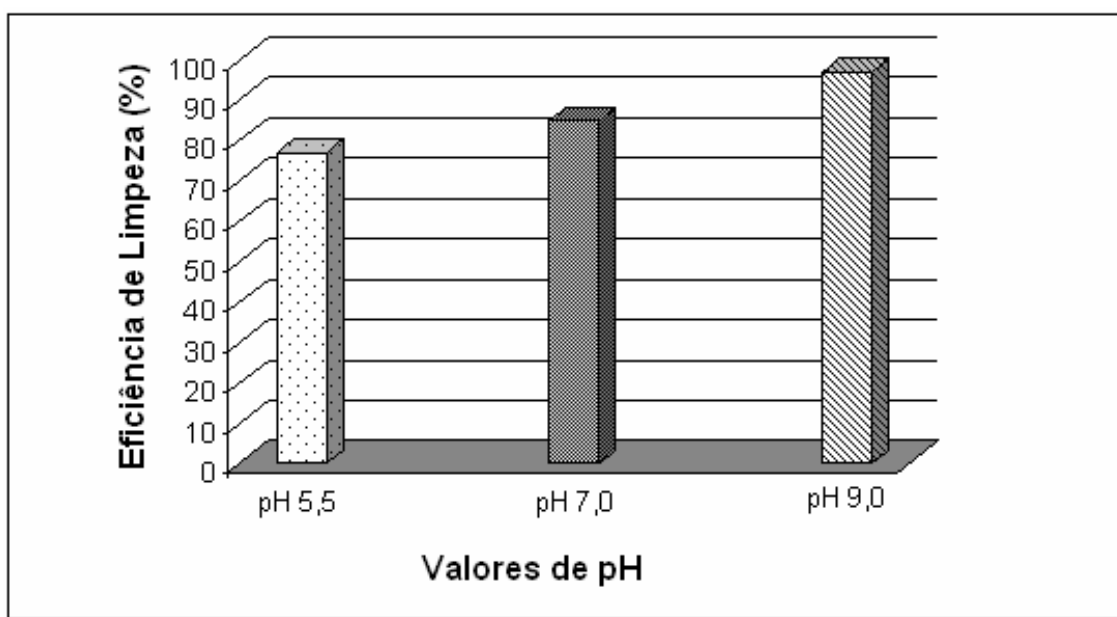


Figura 4.1: Eficiência de limpeza em um tempo fixo de 90 s do sistema em função da variação do pH do tampão.

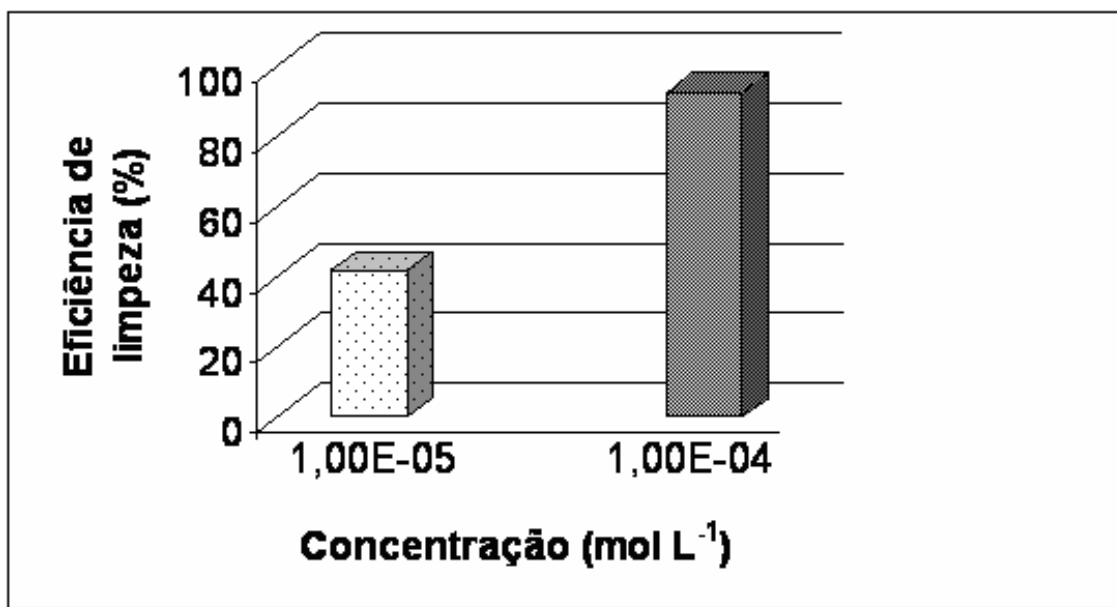


Figura 4.2: Eficiência de limpeza do sistema em um tempo fixo de 90 s em função da elevação da concentração da solução tampão Tris, pH 9,0.

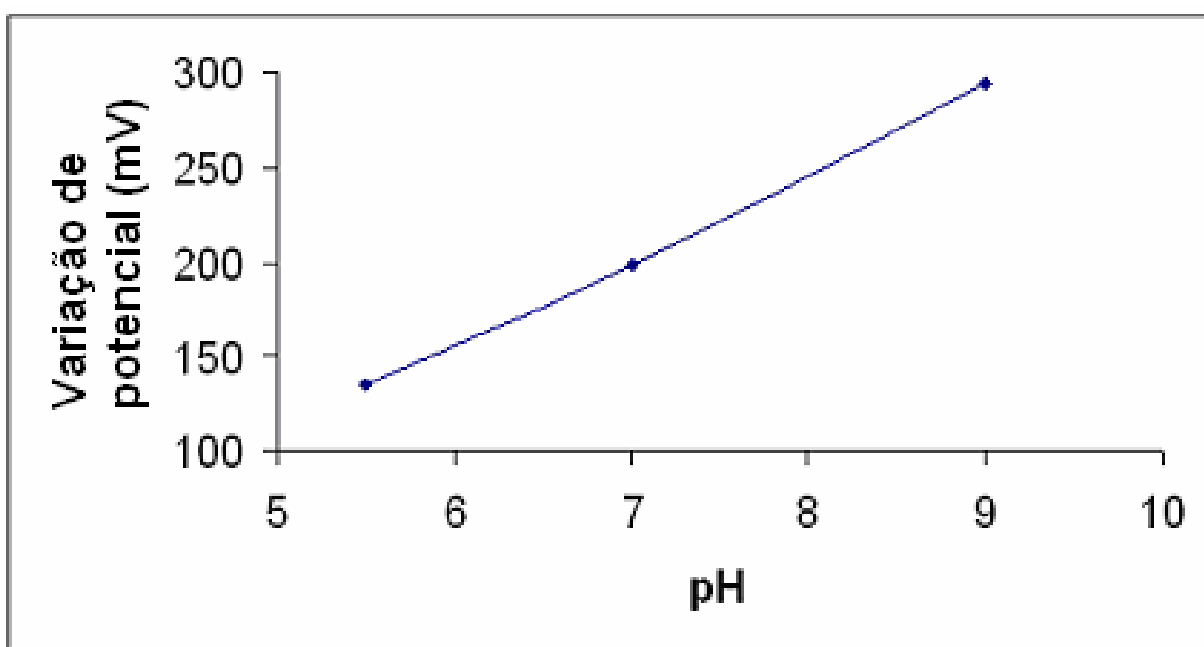


Figura 4.3: Comportamento do sinal analítico com a variação do pH da solução tampão

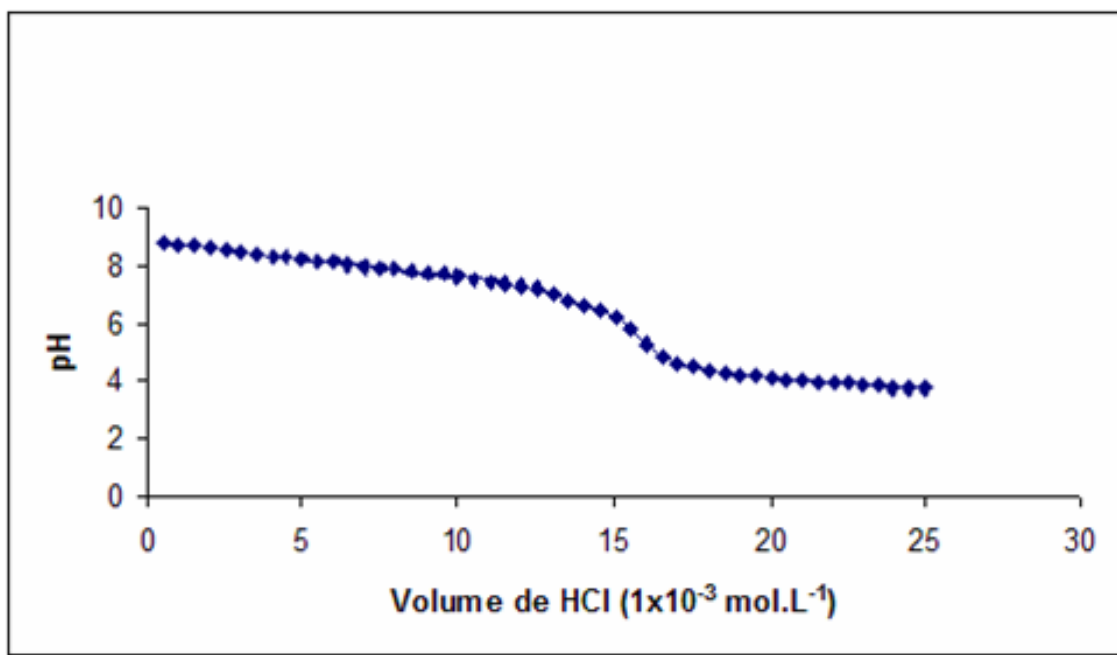


Figura 4.4: curva titulação do tampão Tris-Hidroximetilaminometano

A posição de inserção da solução tampão no sistema também se mostrou importante. Quando a solução foi inserida antes da primeira bobina reacional, não houve variação do potencial até o volume de hidróxido injetado ser suficiente para vencer a capacidade tamponante da solução e interagir com a amostra, provocando uma queda brusca de potencial (Figura 4.5 (a)). Por outro lado, a alteração da inserção da solução, ou seja após a primeira bobina reacional, provocava a queda gradual de potencial, evidenciando a reação entre amostra e titulante e, portanto, uma menor interferência do tampão na determinação (Figura 4.5(b)). Assim, foi selecionado o segundo diagrama para o sistema.

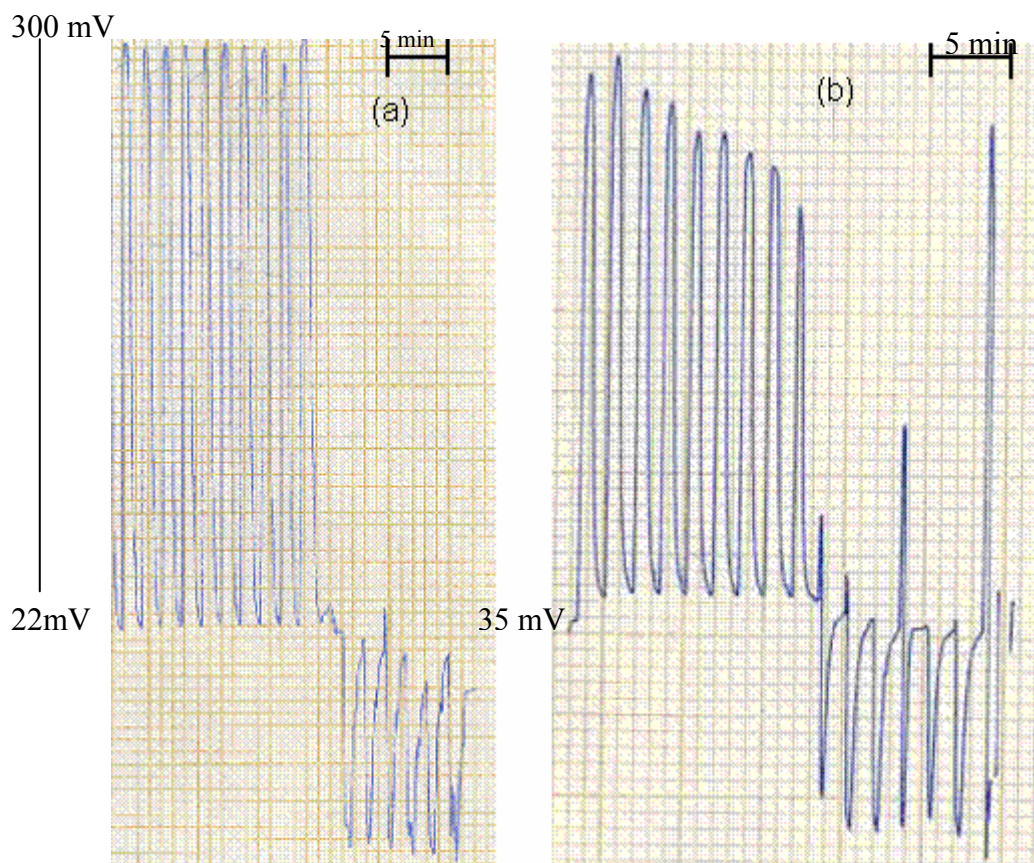


Figura 4.5: Avaliação da posição de inserção da solução tampão. Concentração de amotra = $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

4.1.2 Força iônica

Para a diminuição das interferências do potencial de junção e manutenção do coeficiente de atividade foi avaliada a utilização de uma solução salina para obter a força iônica constante do meio.

A resposta do eletrodo foi avaliada para três soluções salinas: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de lítio (LiCl) e cloreto de potássio (KCl). Percebeu-se que os sais de lítio e potássio apresentaram uma variação de potencial acentuado na faixa de concentração em que a análise era realizada ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em relação à curva apresentada pelo cloreto de sódio. Para evitar interferências de potencial provenientes da solução salina, visto que a concentração do cátion sofre variação durante a análise devido à inserção do titulante, optou-se pelo emprego de NaCl que apresentou uma variação de potencial menos brusca. As curvas de potencial em função da concentração dos sais são apresentadas nas figuras 4.6; 4.7 e 4.8.

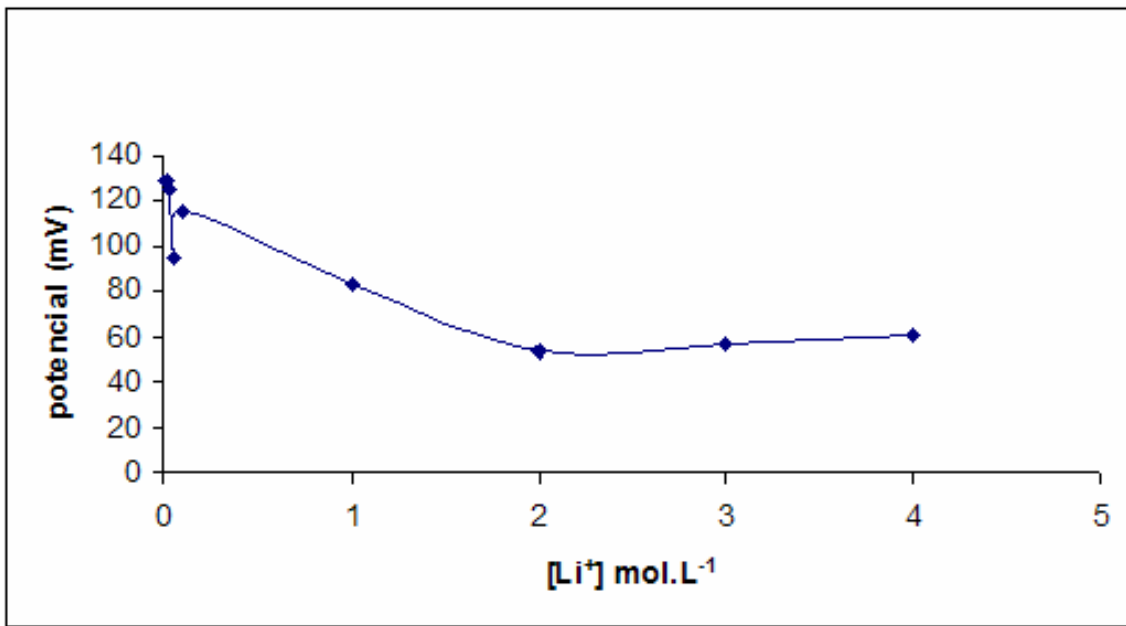


Figura 4.6: Variação do potencial do eletrodo em função da concentração do íon Li^+

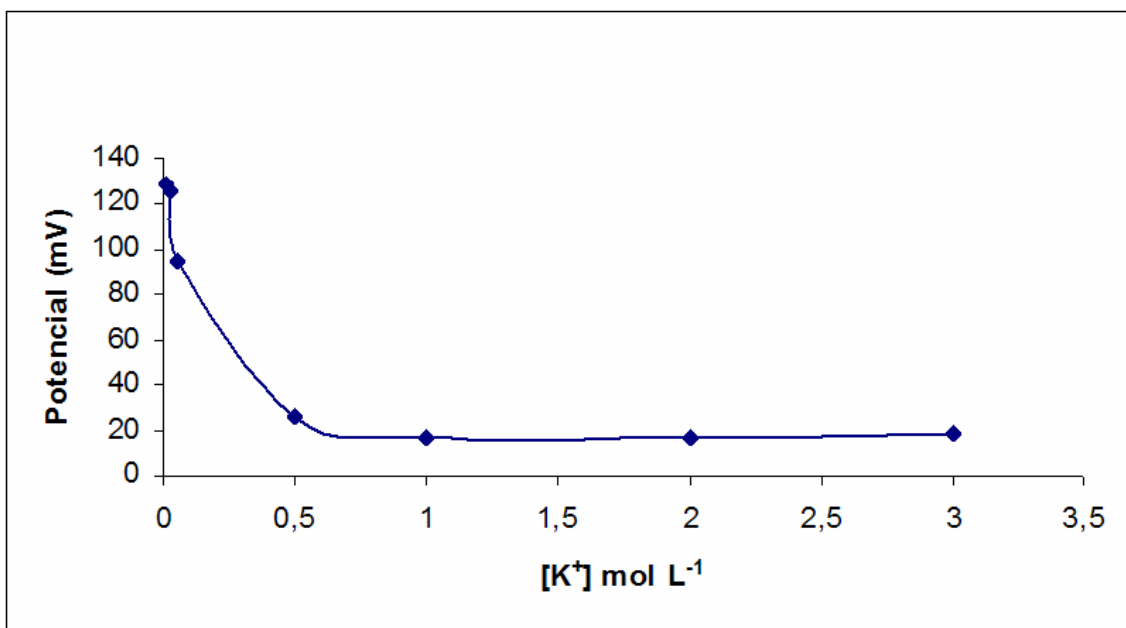


Figura 4.7: Variação do potencial do eletrodo em função da concentração do íon K^+ .

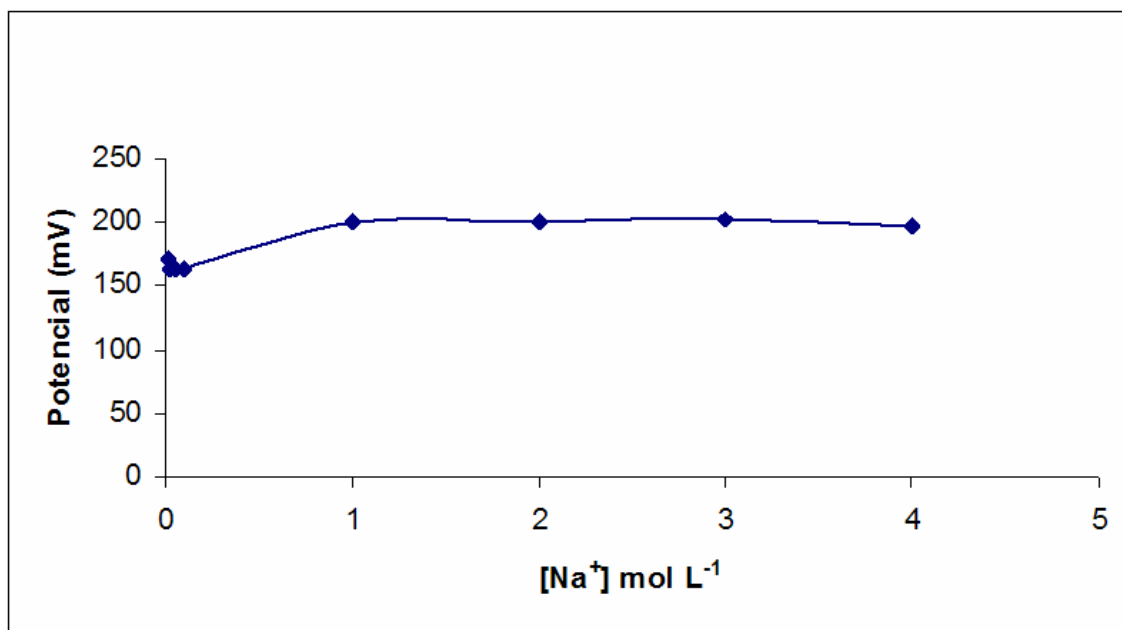


Figura 4.8: Variação do potencial do eletrodo em função da concentração do íon Na⁺

4.1.3 Volume da bobina reacional

O processo de titulação ponto a ponto não trabalha com curva de calibração. Isso implica que a utilização de cinéticas de reação incompletas, como em sistemas em fluxo convencionais, fica inviabilizada, ou seja, é necessário que a reação se complete. Isso foi comprovado ao se avaliar o volume da bobina reacional. Notou-se neste experimento que era necessário uma grande dispersão para a realização das determinações. Para isso, foram testados reatores de diversos volumes, sendo que mesmo os maiores apresentavam evidencia de mistura ineficiente com aumento do volume do titulante. Em vista disso optou-se por reator com maior volume, mas que não implicasse em um elevado tempo de análise. Na figura 4.9 é apresentada a comparação entre dois reatores (1 e 2,5 mL) em função do incremento de potencial e da eficiência de limpeza em um tempo fixo de 90 s, utilizando solução de ácido acético 1×10^{-2} mol L⁻¹. Com esse estudo, concluiu-se que tanto a perda de sinal analítico (58,7 mV) quanto de eficiência de limpeza (15%) inerente ao aumento do percurso analítico são aceitáveis em consideração à determinação de interesse, em função de uma melhor mistura. Durante esse experimento um segundo reator (B₂) de 70 cm (~300 μ L) foi

empregado, para evitar gradientes de intensidade iônica na zona de amostragem, visto que esses podem dificultar a medida dos sinais transientes.

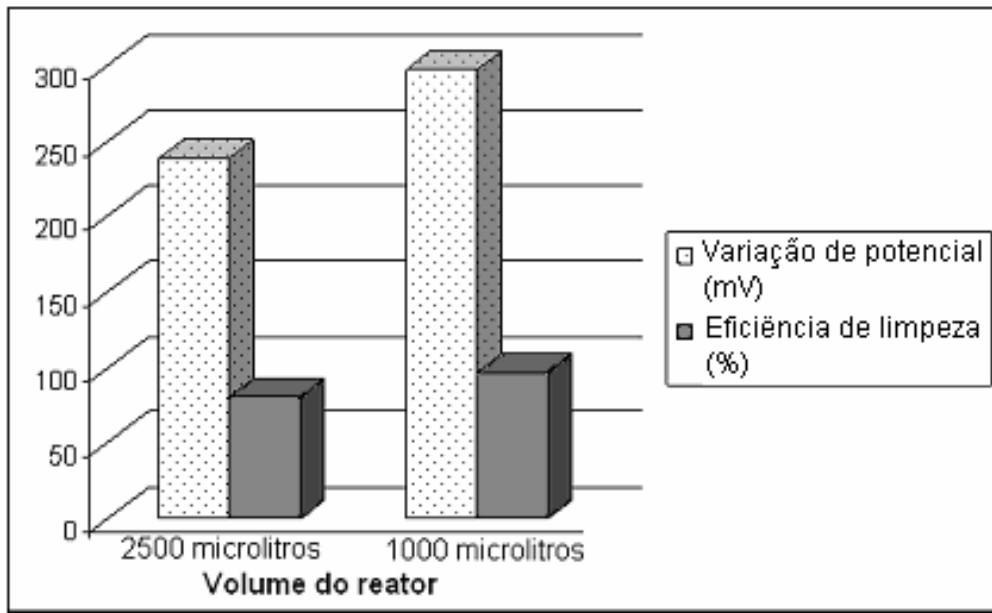


Figura 4.9: Avaliação do volume do reator B1 do sistema apresentado na figura 3.4. Nesse estudo o reator B2 foi fixado em 70 cm.

Para certificar-se do tamanho do reator B₂ para evitar os gradientes de intensidade iônica na zona de amostragem, reatores de 25, 50 e 70 cm foram avaliados. Os resultados indicaram que o reator de 70 cm seria adequado. Na figura 4.10 são apresentados os resultados obtidos durante essa avaliação, após o primeiro (B₁) ter sido fixado em 500 cm (~ 2500 μ L).

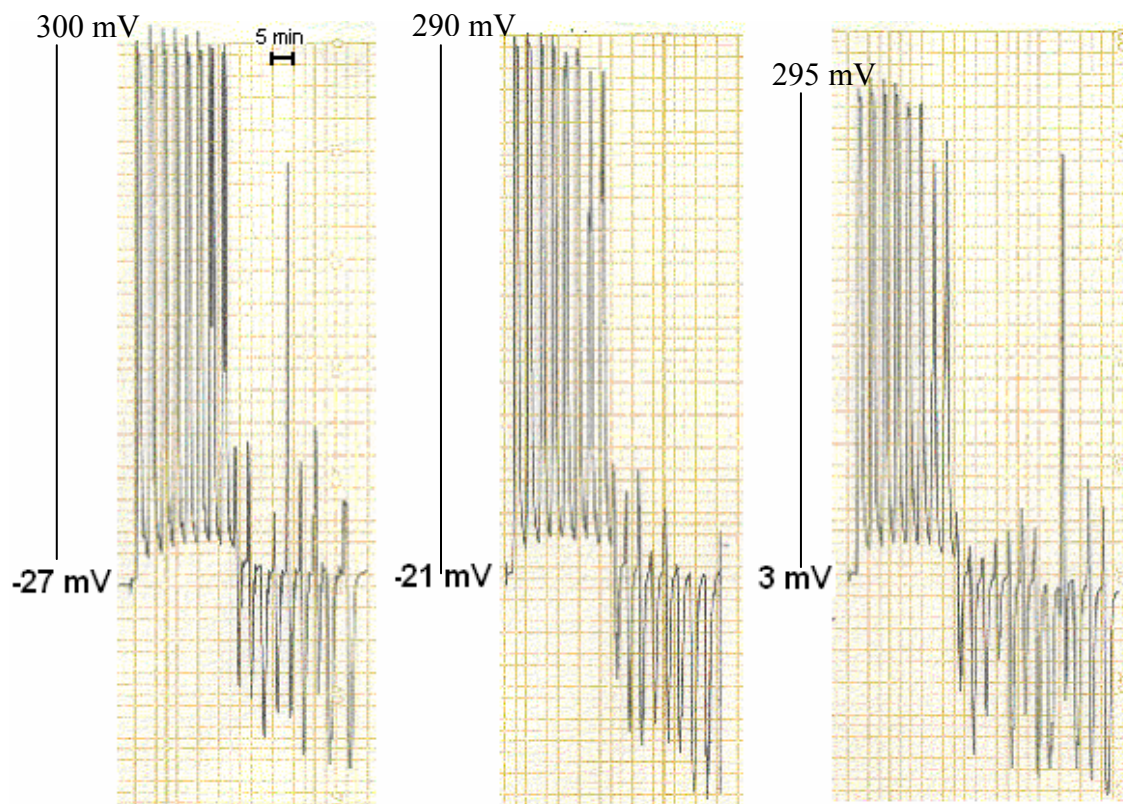


Figura 4.10: Avaliação do volume do segundo reator em relação ao sistema apresentado na figura 3.4. O reator B₁ foi fixado em 500 cm. Concentração de amostra = 0,01 mol.L⁻¹

4.1.4 Volume da amostra

O volume de amostra foi avaliado levando-se em conta o incremento de potencial e o tempo de limpeza resultante da injeção. Os volumes de 93, 186 e 280 μL , que correspondem ao tempo de abertura de válvulas de 2, 4 e 6 s foram testados. O sistema foi o mesmo apresentado na figura 3.4, com exceção do reator B₁, que nesse experimento foi fixado em 50 cm. Para a geração dos sinais foi utilizada uma solução $5,71 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de ácido acético. Como pode ser observado na figura 4.11, o aumento de volume de amostra, como era esperado, aumenta o incremento de potencial de maneira significativa. Entretanto, o tempo de limpeza foi semelhante para todas as condições de volume avaliadas (figura 4.12). Esse perfil levou à definição de 280 μL como volume de amostra, elevando o incremento de potencial para a realização das determinações.

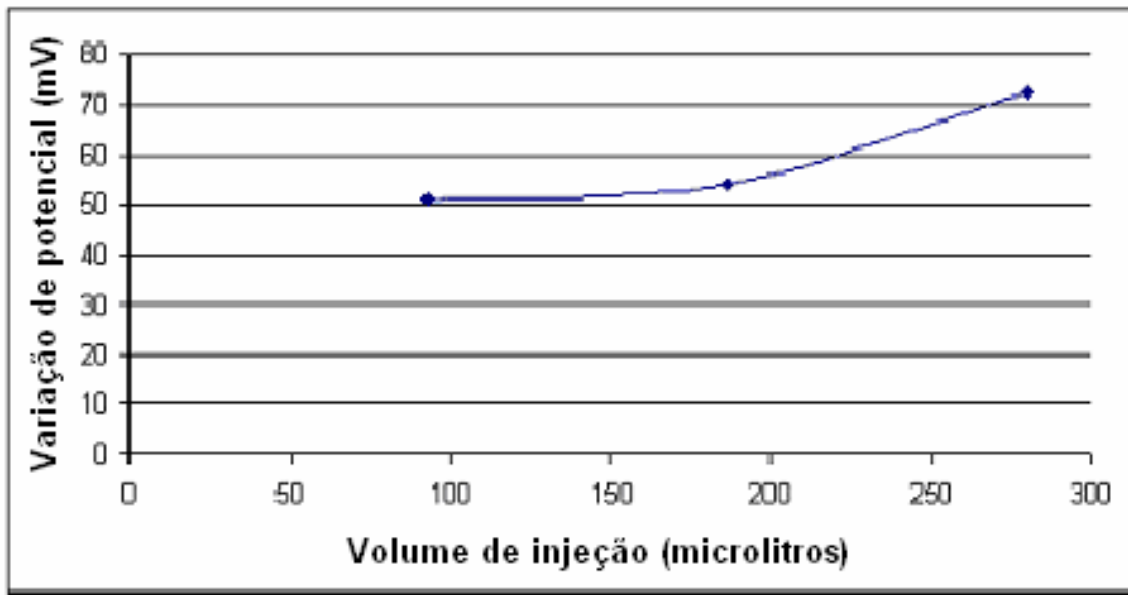


Figura 4.11:Variação de potencial em função do volume de amostra inserida no sistema descrito na figura 3.4

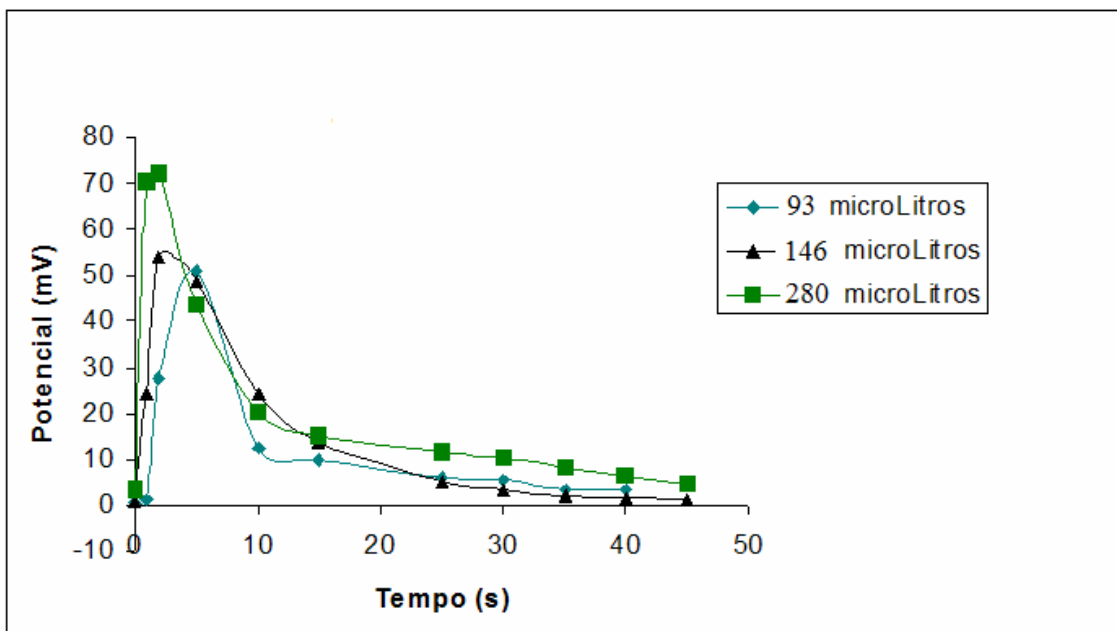


Figura 4.12: Acompanhamento da zona de amostragem em função do tempo de limpeza do sistema apresentado na figura 3.4.

4.1.5 Vazão da solução transportadora

Para este experimento foram utilizados os parâmetros otimizados no item anterior e uma solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético. Foram testadas vazões de $0,5$, $1,0$ e $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, sendo que os resultados estão apresentados nas figuras 4.13 e 4.14. Como esperado, a influência da vazão no sinal analítico foi pequena, razão pela qual foi estabelecida a vazão de 1 mL min^{-1} , procurando-se diminuir a geração de volume de resíduos e, por outro lado, evitar perdas acentuadas na velocidade analítica (Figura 4.13). Além disso, a eficiência de limpeza diminuiu com a diminuição da vazão para $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 4.14).

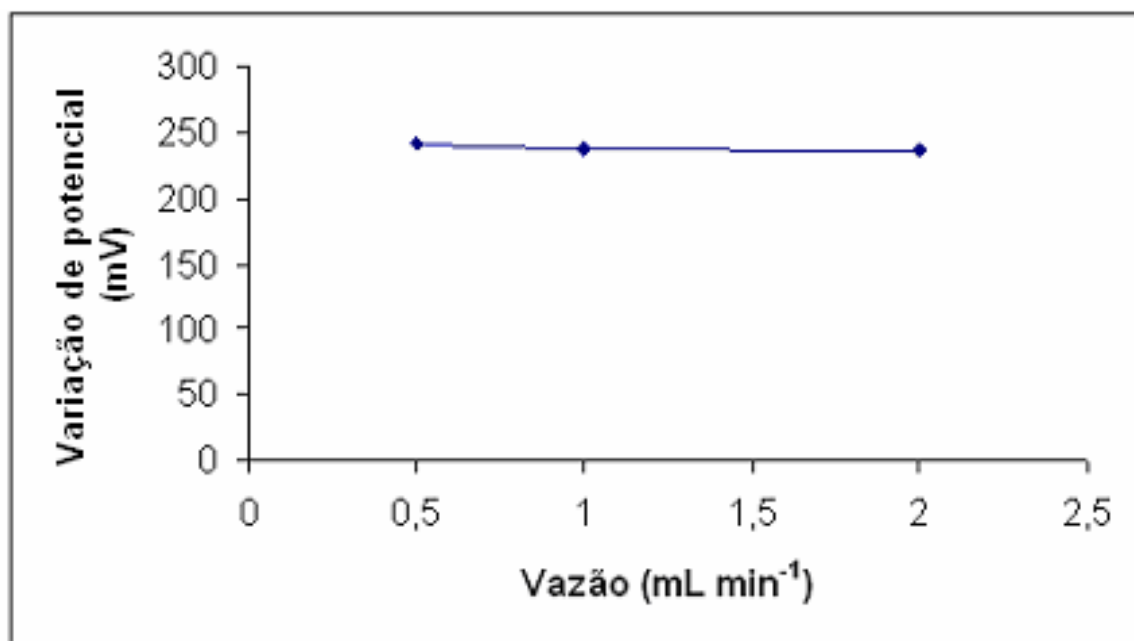


Figura 4.13: Estudo da vazão da solução transportadora em função da variação de potencial, referente ao sistema apresentado na figura 3.4.

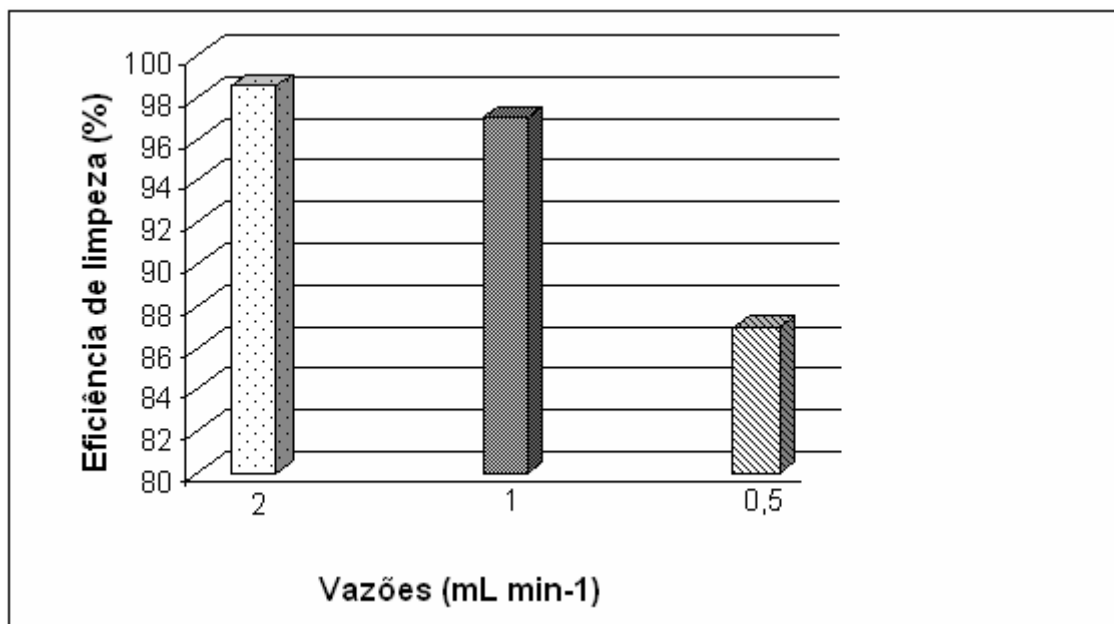


Figura 4.14: Estudo da vazão da solução transportadora em função da eficiência de limpeza do sistema apresentado na figura 3.4.

4.1.6 Avaliação do desempenho do eletrodo indicador

Para avaliação do desempenho do eletrodo íon-seletivo, foi realizada a análise de uma curva de calibração de pH em função do potencial. Foi constatado que o eletrodo apresentava resposta sub-nernstiana ($y = -31,914x + 303,36$). Deve ser enfatizado que o processo de construção da membrana pode vir a acarretar esse tipo de comportamento, pois a solução é depositada por meio de pipeta tipo “Pasteur” no orifício do corpo de grafite, o que dificulta a obtenção de uma membrana homogênea. Coeficiente de 0,9935 na faixa de pH 2 à 12 representou a linearidade do sistema, sendo a curva de calibração apresentada na figura 4.15.

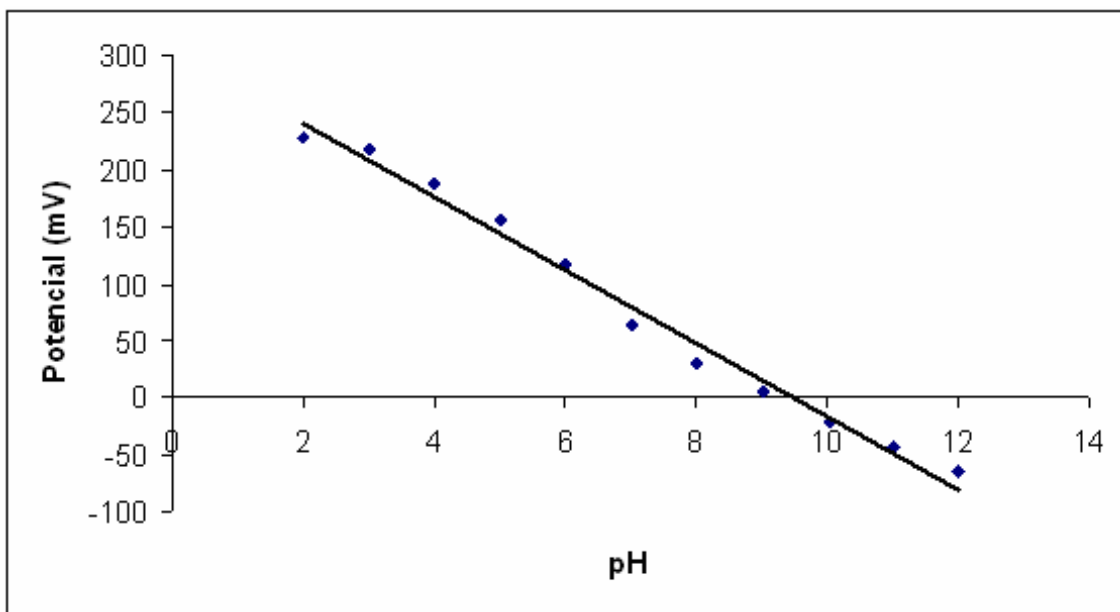


Figura 4.15: Curva de calibração obtida com o sistema proposto na figura 3.4.

Para a avaliação das condições do sistema, foram realizadas determinações de uma solução analítica contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido láctico e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético. Como mencionado anteriormente, a inserção de um volume muito grande de titulante provocava a mistura ineficiente com a amostra. Portanto, para a realização desse experimento utilizou-se uma solução padronizada de NaOH com a concentração relativamente elevada ($0,274 \text{ mol L}^{-1}$) para que o ponto de viragem da titulação ocorresse em incrementos de volumes reduzidos. Além disso, sendo o volume de equivalência pequeno, obteve-se aumento na frequência analítica. Na figura 4.16 é apresentada a curva de titulação obtida.

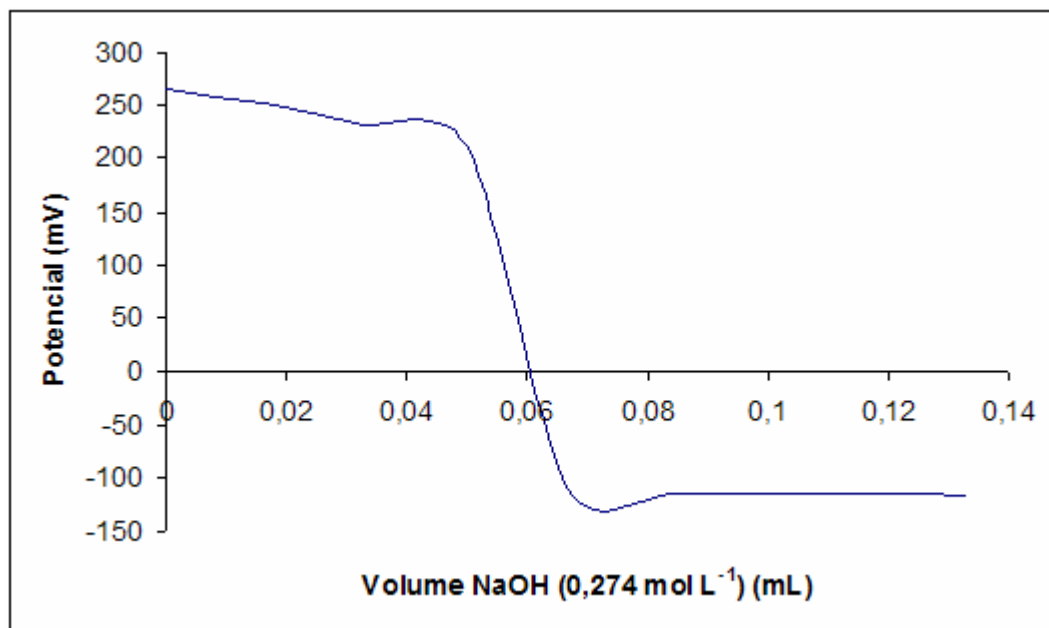


Figura 4.16: Curva de titulação obtida para o padrão: ácido láctico ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido acético ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) no sistema apresentado na figura 3.4.

Os resultados obtidos, concentração = $0,057 \text{ mol L}^{-1}$; desvio padrão = $6,92 \times 10^{-5}$ e porcentagem de erro relativo = 4,99%, mostraram-se satisfatórios. A partir desses resultados foram realizadas análises com amostras de silagem e definidas as figuras de mérito do sistema.

4.1.7 Titulação da solução tampão

Para certificar-se que as espécies tituladas eram realmente provenientes da amostra, foi realizada a titulação da solução tampão, sendo que o resultado obtido (Figura 4.17) demonstrou que a curva de titulação estava realmente relacionada à amostra, visto que o ponto viragem da solução tampão já havia sido alcançado na primeira injeção do titulante. Com esse experimento também foi possível se verificar que a capacidade tamponante estava apropriada para a análise.

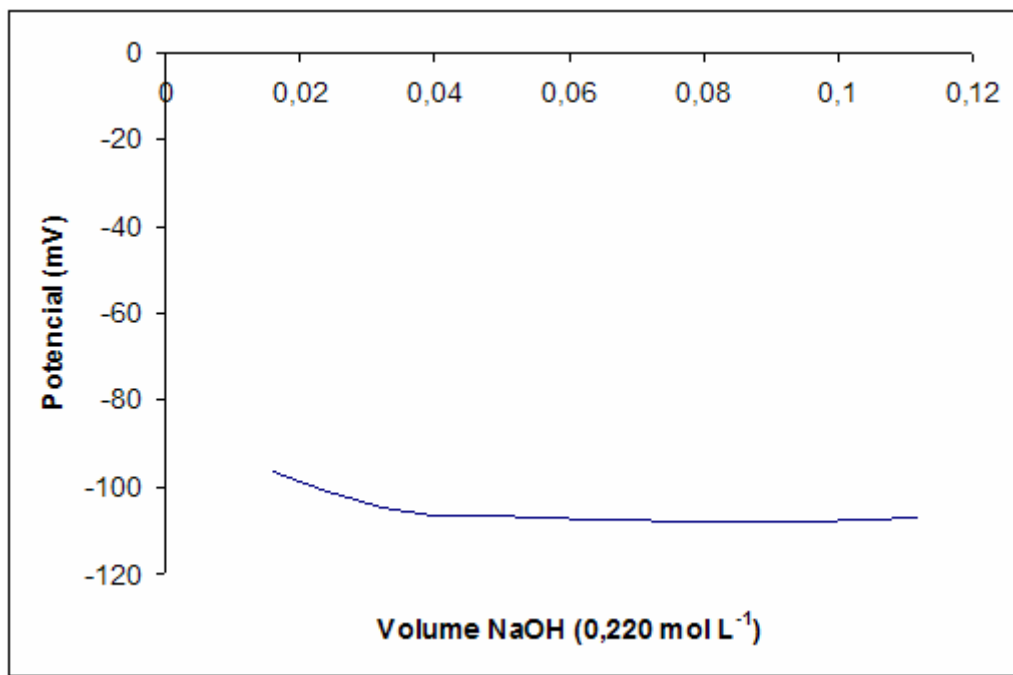


Figura 4.17: Curva de titulação da solução tampão no sistema apresentado na figura 3.4. Titulação do tampão

4.1.8 Figuras de mérito do sistema proposto

Após a otimização das condições experimentais, o sistema final foi definido nas seguintes condições experimentais: vazão de 1 mL min^{-1} reagente de estabilização tampão Tris-HCl ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), vazão de 1 mL min^{-1} de solução transportadora (NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), volume de amostra $280 \mu\text{L}$, solução de NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para o ajuste da força iônica, frequência analítica de 8 amostras por hora (considerando-se 5 pontos na titulação), desvio padrão relativo de 0,176 %, volume gasto de solução transportadora, 6,83 mL, volume de titulante, 0,166 mL e volume de amostra 1,4 mL (considerando-se 5 pontos na titulação).

4.1.9 Aplicação do sistema em amostras de silagem de milho, cana de açúcar e capim brachiaria

Antes da realização das determinações no sistema proposto, foram feitas análises cromatográficas para avaliação do perfil das amostras extraídas em meio aquoso, de acordo com o procedimento descrito no item 3.1.7. Os resultados obtidos estão na Tabela 4.1. A figura 4.18 ilustra um dos cromatogramas obtidos.

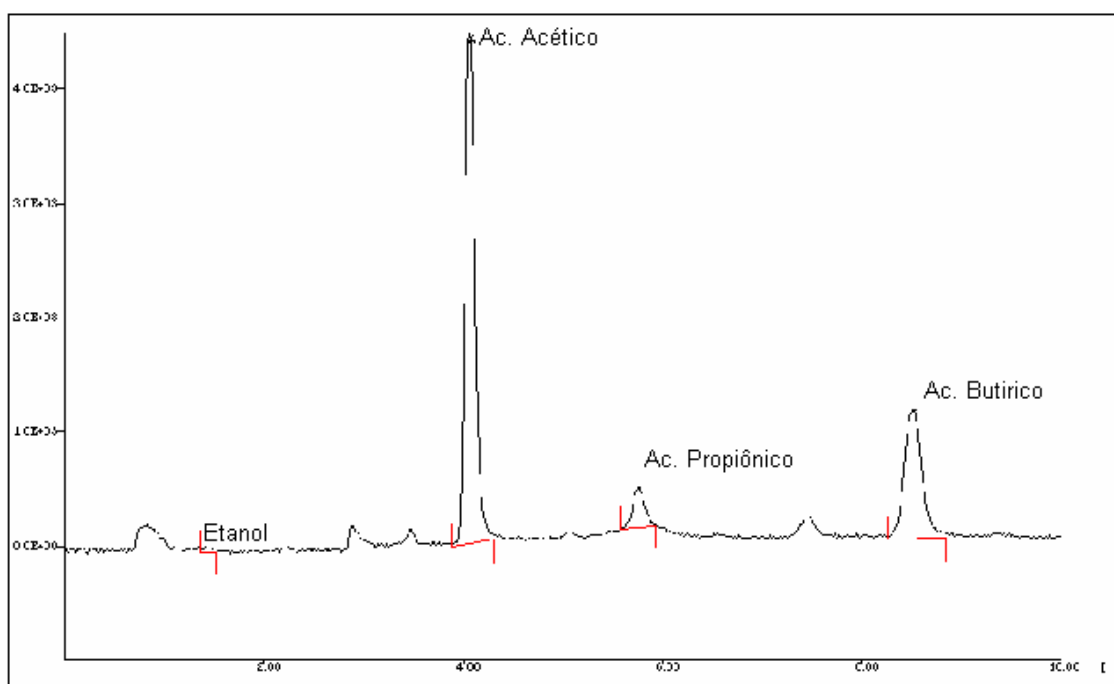


Figura 4.18: Cromatograma obtido da análise de amostra de silagem de capim brachiaria brizantha, cv Marandu.

Tabela 4.1: Resultados obtidos em cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência nas amostras de capim brachiária, cana de açúcar e milho.

	Silagem Capim brachiaria (mol L ⁻¹)	Silagem de milho (mol L ⁻¹)	Silagem de cana (mol L ⁻¹)
Ácido Acético	$1,9 \times 10^{-2} \pm 3,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2} \pm 7,2 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-2} \pm 7,7 \times 10^{-4}$
Ácido Propílico	$1,4 \times 10^{-3} \pm 6,1 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4} \pm 7,5 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-4}$
Ácido Butírico	$2,1 \times 10^{-4} \pm 3,3 \times 10^{-5}$	$8,9 \times 10^{-4} \pm 1,1 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-4} \pm 2,1 \times 10^{-6}$
Ácido Láctico	ND	$5,8 \times 10^{-4} \pm 1,1 \times 10^{-6}$	ND
AGVs totais	$2,1 \times 10^{-2} \pm 3,4 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2} \pm 7,7 \times 10^{-4}$	$7,8 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-3}$

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na tabela 4.1, ao contrario do que seria esperado os teores de ácidos graxos extraídos foram baixos, isso devido principalmente ao processo de extração utilizado, que provocou uma elevada diluição das amostras. Esse mesmo extrato foi utilizado para fins de comparação com o sistema proposto.

Análises titulométricas, tanto em fluxo quanto em batelada foram realizadas. Em função dos baixos valores obtidos, foi feita a adição de analito (ácido láctico) até a obtenção de concentração final de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de ácidos graxos totais, para aproximar-se das condições encontradas nas amostras rotineiras, visto que o processo de extração aplicado foi ineficiente para a extração do ácido láctico. Além disso, como o pH do extrato foi elevado, poderia haver comprometimento na precisão da análise, devido ao baixo incremento de potencial alcançado. Para efeito de comparação dos métodos, os resultados são apresentado descontando-se o valor do padrão (Tabela 4.2). Na figura 4.19 são apresentadas curvas de titulação para cada tipo de amostra analisada e na figura 4.20 é apresentada a comparação entre os procedimentos de determinação.

Tabela 4.2: Resultados obtidos para as análises de AGVs nos três procedimentos avaliados

Amostra	Titulação em Batelada	Titulação por	
		multicomutação (Sistema proposto)	Cromatografia
(mol L ⁻¹)			
Cana	$6,68 \times 10^{-3} \pm 4,68 \times 10^{-4}$	$6,41 \times 10^{-3} \pm 2,22 \times 10^{-4}$	$6,97 \times 10^{-3} \pm 1,03 \times 10^{-3}$
Capim brachiaria	$2,65 \times 10^{-2} \pm 2,83 \times 10^{-3}$	$2,03 \times 10^{-2} \pm 1,74 \times 10^{-4}$	$2,02 \times 10^{-2} \pm 2,03 \times 10^{-3}$
Milho	$1,50 \times 10^{-2} \pm 4,77 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-2} \pm 5,81 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-2} \pm 1,15 \times 10^{-3}$

n=3

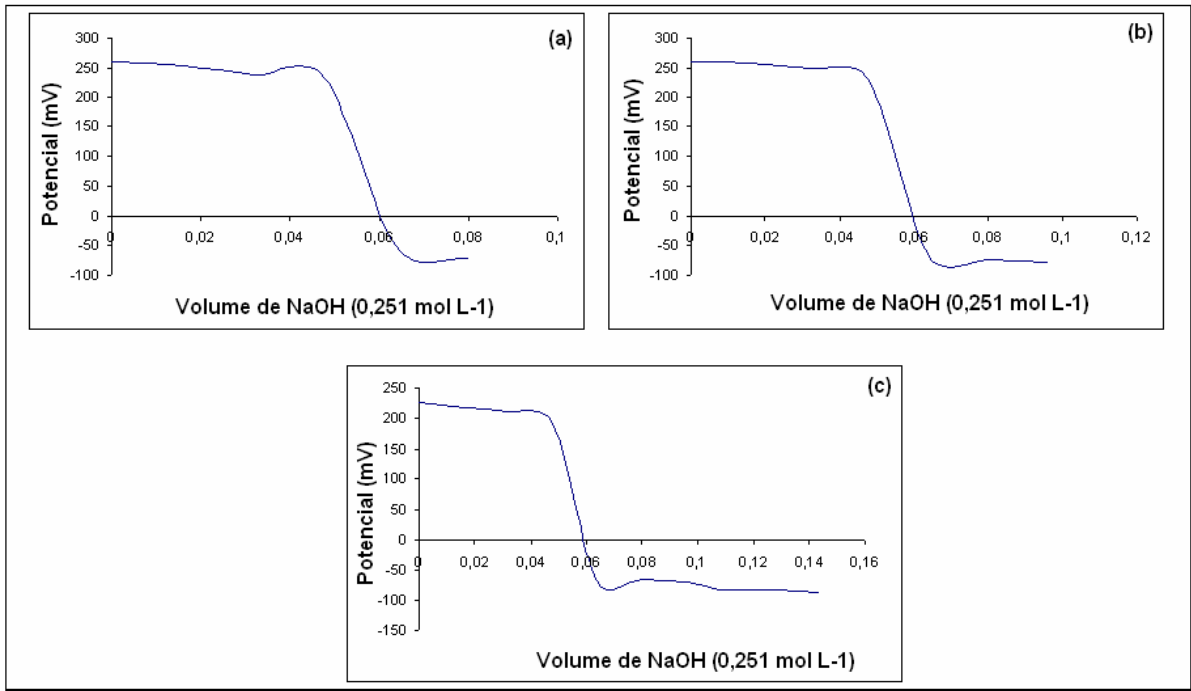


Figura 4.19: Curvas de titulação realizadas no sistema por multicomutação. (a) silagem de milho; (b) silagem de cana; (c) silagem de capim

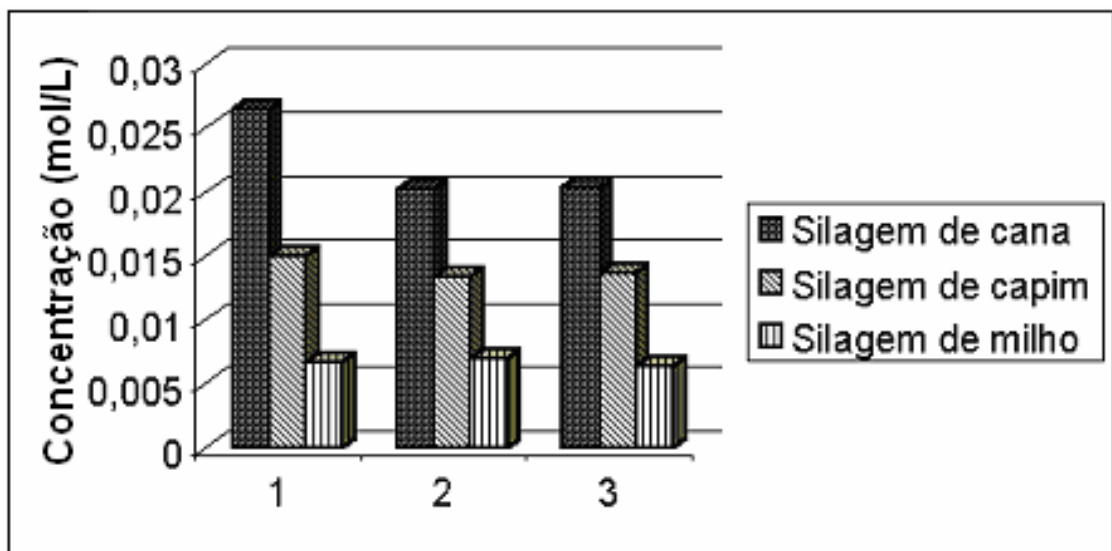


Figura 4.20: Comparação dos métodos de análise para três amostras de silagem diferentes. (1) Titulação em batelada; (2) Sistema por multicomutação; (3) Determinação cromatográfica

Aplicando o teste *t* ao nível de 95 % de confiança verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o método proposto tanto com o método cromatográfico quanto com o método de titulação em batelada.

4.2 Análise de fibra em detergente neutro empregando forno de microondas doméstico e sistema pressurizado

4.2.1 Planejamento Fatorial

Os parâmetros experimentais selecionados no planejamento fatorial 2^3 aplicado ao procedimento de extração do conteúdo celular para a análise de FDN foram tempo de exposição à radiação microondas (*t*), potência aplicada (*P*) e volume de solução extratora (*V*). Para esse estudo 10 filtros foram empregados em cada experimento. O planejamento fatorial foi desenvolvido nos níveis máximo e mínimo, sendo o percentual de concordância o teor de fibra recuperado de acordo com os valores certificados pelo EPLNA (SOUZA *et. al.*, 2005) (Tabela 5.3).

Depois de processados os resultados foi observado que as variáveis que apresentaram efeitos significativos a 95% de confiança foram - potência aplicada e tempo de exposição à radiação microondas. Conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 4.21), verificou-se também que não houve interações entre as variáveis e que o volume da solução extratora não foi significativo nas análises. Essas tendências podem ser confirmadas observando-se a figura 4.22, através dos gráficos de efeitos principais (a) e da superfície de resposta (b). A partir desses gráficos é possível observar que maiores valores de potência e tempos de extração resultam em melhores porcentagens de recuperação, enquanto que a variação do volume de solução extratora não apresentou variação nos resultados. Em função dessas observações foram definidos os seguintes parâmetros de funcionamento do forno com radiação microondas para a extração de FDN: potência de 890 W,

tempo de exposição à radiação microondas de 20 min e volume de solução extratora de 1 L.

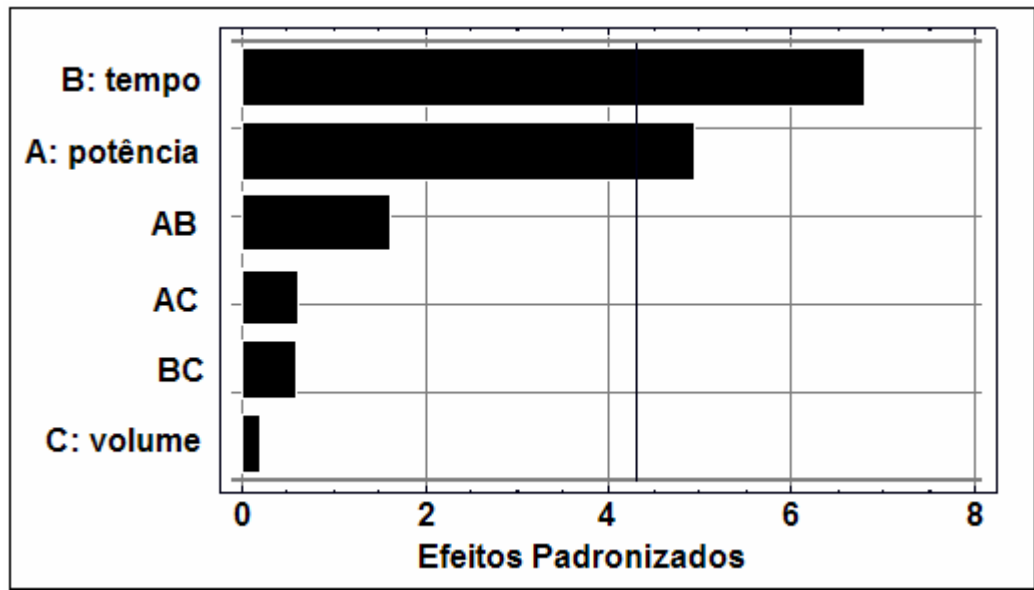


Figura 4.21: Gráfico de Pareto obtido.

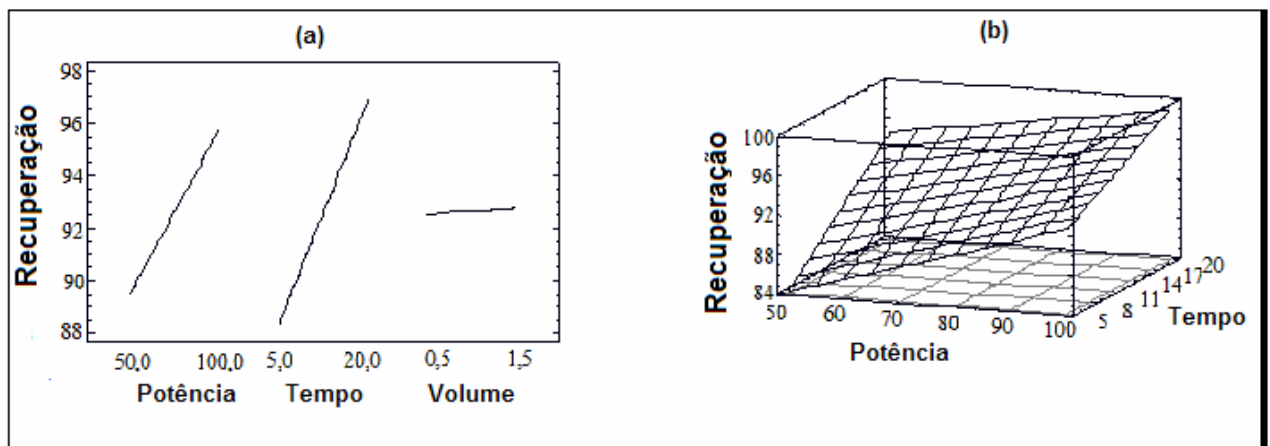


Figura 4.22: (a) Gráfico de efeitos principais; (b) Superfície de resposta para recuperação de FDN

4.2.2 Otimização do número de amostras por análise

Após fixados os parâmetros experimentais, procedeu-se à otimização do número de amostras a serem analisadas simultaneamente, visando uma maior frequência analítica. Um planejamento fatorial univariado foi empregado, elevando-se gradativamente o número de amostras por análise, tendo a recuperação como a resposta avaliada.

A variação do número de amostras foi feita com base no número de suportes (filtros) da seguinte forma: 10, 12, 15, 18 e 20 unidades para um mesmo volume de solução, utilizando os parâmetros pré-estabelecidos. Observou-se que a recuperação dos teores de fibra manteve-se constante, na faixa de 99,3-108,8% (figura 4.23). Entretanto, em função do diâmetro relativamente reduzido do sistema extrator, os experimentos empregando quantidades superiores a 18 filtros provocaram uma elevação de pressão que resultou em acionamento da válvula de segurança para alívio de pressão do sistema. Em vista disso, por motivos de segurança, optou-se por fixar o número de 18 amostras a serem extraídas simultaneamente, nas condições pré-estabelecidas de configuração do sistema extrator.

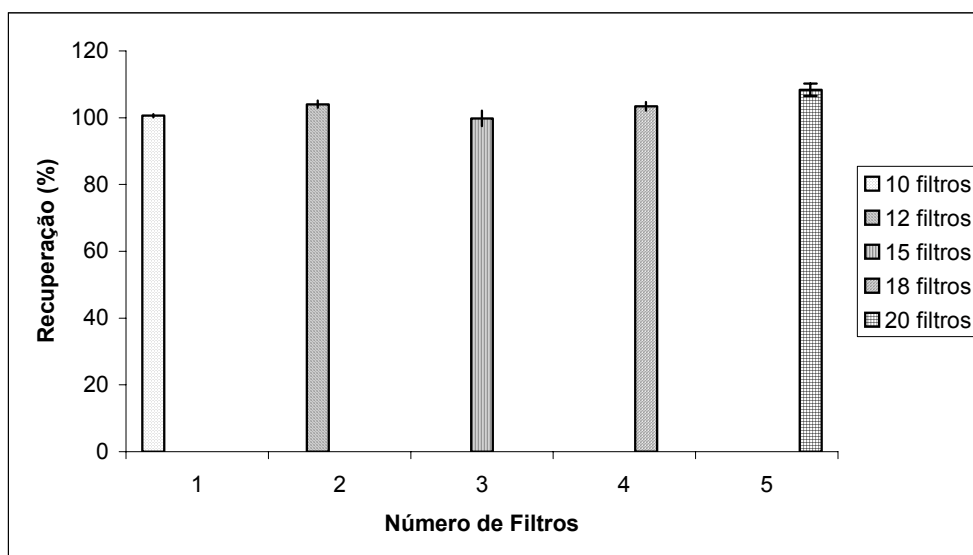


Figura 4.23: Número de amostras analisadas simultaneamente no sistema extrator proposto.

Após a determinação das melhores condições do sistema extrator, esse foi testado com amostras comerciais, com variados teores de fibras e de amido.

4.2.2.1 Amostras com baixos teores de amido

Para este tipo de amostra, o sistema extrator apresentou recuperações da ordem de 101 a 108% em relação aos resultados fornecidos pelo EPLNA (SOUZA *et. al.*, 2005), , com erros no intervalo de 1,15 a 8,8% e coeficientes de variação entre 0,7 e 6,1 adequados para esse tipo de análise. Na figura 4.24 podem ser observados a recuperação e o desvio padrão obtidos.

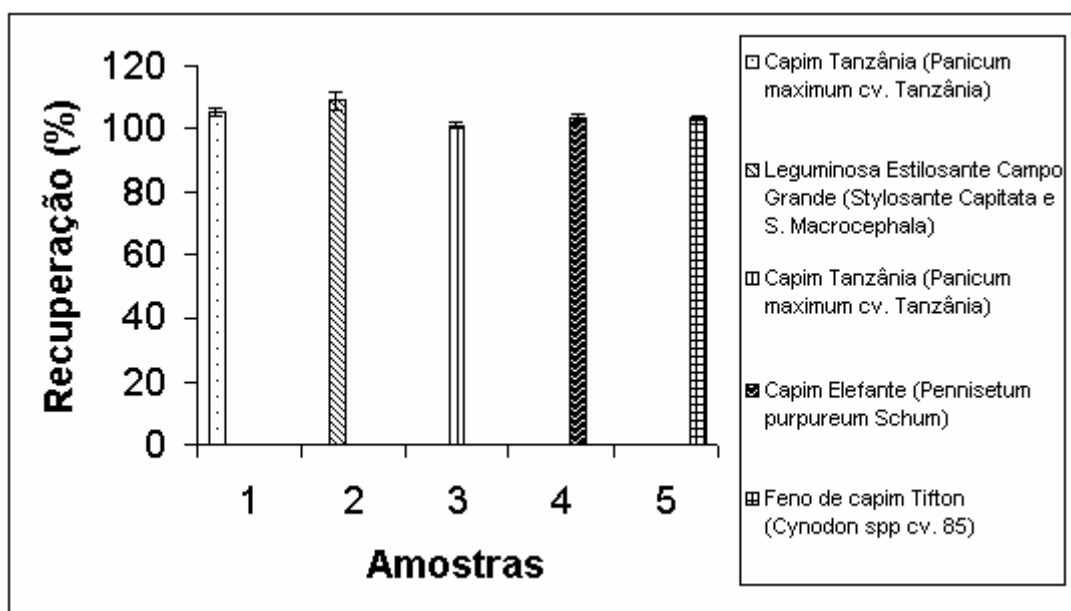


Figura 4.24: Análise de amostras com baixos teores de amido

4.2.2.2 Amostras com altos teores de amido

Southgate (1977) cita em sua revisão alguns trabalhos prévios de determinação de FDN os quais relataram que essa análise sofre interferência positiva em alimentos ricos em amido, pois esse ficaria retido na FDN devido a alterações estruturais, formando um material gelatinoso. De acordo com a literatura pertinente, essa interferência pode ser eliminada por meio de um

tratamento prévio das amostras com a incubação em meio de uréia e α -amilase termoestável (MENDES *et al.*, 1985).

A partir dessas primeiras avaliações, foi elaborado planejamento univariado para avaliar o tempo necessário para a hidrólise do amido, utilizando soluções de uréia 8 mol L⁻¹ e α -amilase termoestável sob aquecimento a 90°C, visando uma melhor recuperação no teor de fibras. Foram realizados quatro experimentos em triplicatas, cada um contendo 3 amostras de forrageiras distintas. Nesses experimentos foram variados os tempos de incubação da seguinte forma: (1) 0 min; (2) 15 min, (3) 30 min e (4) 45 min. Para evitar problemas de saturação do meio pelo amido, nos experimentos 3 e 4 a mistura, que consiste de 120 mL de solução de uréia e 4,5 mL de solução de α -amilase, foi substituída a cada 15 min. Após cada etapa de incubação, foi realizada a extração de fibra das amostras pelo procedimento proposto, empregando extração em frasco pressurizado e aquecimento por radiação microondas e avaliada a porcentagem de recuperação em relação aos valores fornecidos pelo EPLNA (SOUZA *et al.*, 2005). Os resultados estão apresentados na figura 4.25.

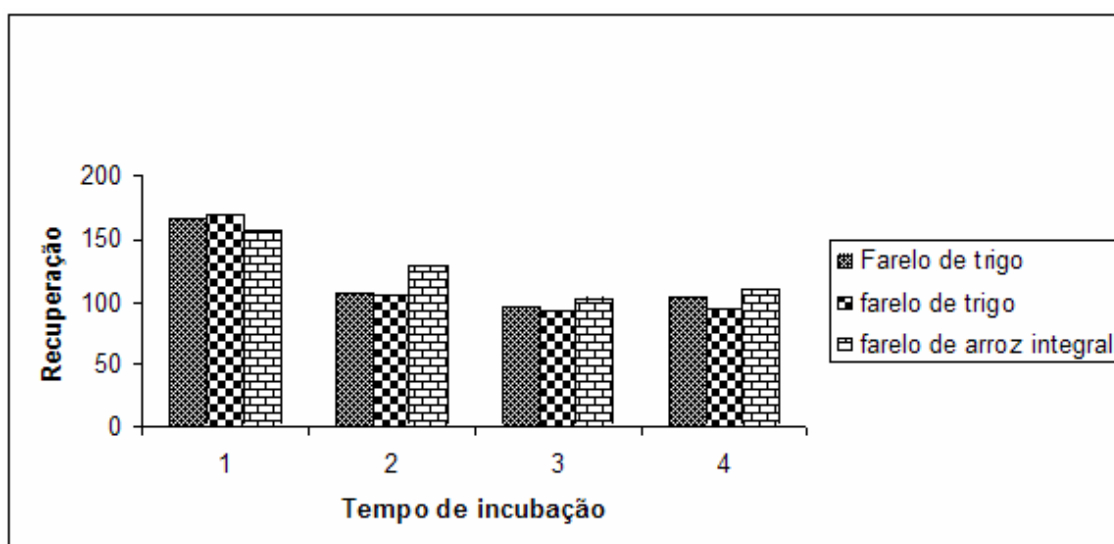


Figura 4.25: Análise de amostras com altos teores de amido

Foi possível observar através da figura 4.25 que nos experimentos 1 e 2 o tempo de incubação não foi suficiente para eliminar a interferência do amido,

resultando em um valor superestimado do teor de fibra, enquanto que nos experimentos 3 e 4 ocorreu uma hidrólise mais efetiva do amido, proporcionando resultados satisfatórios evidenciada pela percentagem de recuperação. Conclui-se que o experimento 3, que apresentou uma recuperação da ordem de 93 a 105%, coeficiente de variação de 0,83 a 4,63, erro relativo de 2,79 a 6,77 e no qual foi empregado o tempo de incubação de 30 minutos, é o mais indicado para análise de amostras com alto teor de amido.

CONCLUSÃO

6) – Conclusão

Os procedimentos propostos neste trabalho para análises em laboratórios de nutrição animal mostraram-se eficientes quando comparados com procedimentos já bem definidos e utilizados a longo tempo por esses laboratórios.

A titulação ponto a ponto em sistema de multicomutação, quando comparada ao processo em batelada, traz como vantagem já inerente a sistemas de fluxo a automatização do processo e uma menor interferência do analista, evitando erros sistemáticos. Além disso, proporciona versatilidade às análises, com baixo custo de implementação. Quanto à comparação com os resultados obtidos por cromatografia, devido à alta dispersão necessária para as determinações e, por consequência, mistura ineficiente quando há a adição de um volume elevado de titulante, não foi possível a determinação seletiva dos ácidos graxos. A comparação entre os resultados foi limitada à soma dos resultados obtidos, referentes à determinação da acidez total presente nos extratos.

De uma maneira geral, o sistema por multicomutação proposto apresenta-se versátil e facilmente cambiável para outras configurações.

O sistema semi-pressurizado empregado para a análise de fibras em detergente neutro mostrou-se eficiente e aplicável tanto para amostras com baixos teores de amido quanto para amostras com altos teores de amido, sendo que para essas foi necessário o emprego de incubação com uréia e utilização da enzima α -amilase para a hidrólise do amido.

O procedimento proposto apresenta-se como alternativa de fácil implementação, baixo custo, eliminação de etapas durante o procedimento, diminuição na geração de resíduos laboratoriais, com a manutenção da qualidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

5) – Referências

ANDRADE, S.J.T., MELOTTI, L.; Elephantgrass (*Pennisetum purpurem*, Schum) silage under effect of bacterial inoculants. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V. 40, p. 219-229; 2003, suplemento 3

ASHBELL, G. Basic Principle of Preservation of forage, By-Products and Residues as Silage or Hay; In: Embrapa Pecuária Sudeste. 1994. **A Summary of a Course Given at Embrapa São Carlos**

BERCHIELLI, T. T. ; PIRES, A. V. ; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, v. 1. 583 p., 2006.

BERCHIELLI T. T.*et al.* Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKOM. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 5, p.1572-1578, 2001

BLAEDEL, W. J.; LAESSIG, R. H. Continuous automated buretless titrator with direct readout. **Analytical Chemistry**. v. 36, n. 8, p.1617-1623, 1964

BLAEDEL, W. J.; LAESSIG, R. H. Continuous titration with a tubular mercury-EDTA electrode. **Analytical Chemistry**. v. 37, n. 3, p.332-336, 1965

- BORGES E. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. P. Automatic stepwise potentiometric titration in a monosegmented flow system. **Mikrochimica Acta**. v. 135, p. 179-184, 2000
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. Oxford: Oxford University Press, 427 p., 1993.
- BUCK, R. P.; LINDNER E. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (IUPAC recommendation 1994). **Pure & Applied Chemistry**. v. 66, n. 12, p.2527-2536, 1994
- CARDOSO, E. G.; SILVA, J. M. Silos, silagem e ensilagem. Disponível em <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD02.html>>, acessado 03 jun 2007, 14:55:47
- CONTRERAS LARA, D. Two techniques for measuring neutral detergent (NDF) and acid detergent fibers (ADF) in forage and by products. **Revista Archivos de Zootecnia**. v. 48, p. 351-354, 1999
- COUTO, C. M. C. M.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Detectores potenciométricos para sistemas de análise por injeção em fluxo, evolução e aplicação. **Química Nova**. v. 23, n. 6, p. 774-784, 2000
- COMMON R. H. The buffer curves of silage extracts; **The Analyst**; v. 66, n.787, p. 407-411, 1941.

CROW, D. R. **Principles and applications of electrochemistry**. London: Chapman and Hall, 228 p., 1974.

DÖNMEZ N. *et al.* The effects of different silage on rumen protozoan number and volatile fatty acid concentration in sheep fed corn silage. **Small Ruminant Research**. v. 48; p.227-231; 2003

EDWARDS, R.A., McDONALD, P. Fermentation of Silage - A Review. In: Iowa, 1978, West Des Moines. 115p.

ESTEBAN M.; ARIÑO, C.; DÍAZ-CRUZ, J.M. Chemometrics for the analysis of voltametric data. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 25, n. 1, p.86-92, 2006

FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. O. Eletrodo íon-seletivo: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão de conceitos. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p.120-130, 2001

FISHER, D. S.; BURNS, J. C. Quality analysis of summer-annual forages. II. Effectsof carbohydrate constituents on silage fermentation. **Agronomy Journal**, v. 79, n. 2, p.242-248, 1987.

- FUSSEL, R. J., MCCALLEY, D. V. Determination of volatile fatty acids (C2-C5) and lactic acid in silage by gas chromatography; **The Analyst**; v. 112; p1213-1216; 1987.
- GUARDIA, M. An integrated approach of analytical chemistry. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 10, n. 6, p.429-437, 1999
- HAUSER, P. C. *et al.* Measurement of pH by flow injection over a wide dynamic range with PVC neutral carrier electrodes. **Analytica Chimica Acta**. v. 221, p.139-146, 1989
- HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**. v. 45, n. 1, p.35-56, 1993.
- HERON, S.J.E. , EDWARDS, R.A., McDONALD, P. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. **Journal of Science and Food Agriculture**. v. 37, n.10, p.979-985, 1986.
- HONGBO, C.; HANSEN, E. H.; RUZICKA, J. Evaluation of critical parameters for measurement of pH by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**. v. 169, p.202-220, 1985
- ICARDO, M. C.; MATEO, J. V. G.; CALATAYUD, J. M. Multicommutation as a powerful new analytical tool. **Trends in analytical Chemistry**. v. 21, n. 5, p. 366-378, 2002

INEZÉDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M. **Compendium of analytical nomenclatures – Definitive Rules**. IUPAC; 1997.

KELLNER, J. M.; MERMET, M. O.; WILDMER H. M. **Analytical Chemistry**. Weinheim: Wiley-VHC, 916p. 1998.

KOMAREK, A. R. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. **Journal of Dairy Science**. Vol. 76, Supplement 1. p. 250. 1993

KRUG F. J.; BERGAMIN-FILHO H.; ZAGATTO, E. A. G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**. v. 179, p.103-118, 1986

KUNG JR., L.; GRIEVE, D. B.; THOMAS, J. W. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**. v. 67; p. 299-306, 1984.

LAVINE, B.K. Chemometrics. **Analytical Chemistry**. v. 72, p.91R-96R, 2000

LEIBENSPERGER, R. Y.; PITT, R. E. A model of clostridial dominance in ensilage. **Grass and Forage Science**, v. 42, n. 3, p.297-317, 1987.

LEMOS, S. G. *et al.* Multivariate strategy for optimization of PVC membranes for pH sensors. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**.

SUBMETIDO

- LENEHAN, C. E.; BARNETT, N. W. ; LEWIS, S. W. Sequential injection analysis. **The Analyst**. V. 127, p. 997-1020, 2002
- LEVENTINI M. W. *et al.* Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. **Journal of Animal Science**. v. 68, p. 4334-4344, 1990
- MARTELLI, P. B. *et al.* Automatic potentiometric titration in monosegmented flow system exploiting binary search. **Analytica Chimica Acta**. v. 387, p. 165-173, 1999
- MARTELLI, P. B. *et al.* Construção e avaliação de um eletrodo tubular sensível ao íon hidrogênio como detector em sistemas de análise em fluxo. **Química Nova**. v. 21, n. 2, p.133-139, 1998
- MCKECHNIE J.L.(Ed.), Websters' New Twentieth Century Dictionary of the English Language, 2 Edição, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NY, 1983.
- McDONALD, P., HENDERSON, A.R., HERON, S. **The biochemistry of silage**. 2ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991. 340p.
- MENDEZ, M. H. M. *et al.* Método da fibra detergente neutro modificado para amostras ricas em amido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 5, n. 2, p.123-131, 1985

MOISIO T.; HEIKONEN M. A titration method for silage assessment. **Animal Feed Science and Technology**. v. 22, n. 4, p. 341-353, 1989

MUCK, R.E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 11, p.2992-3002, 1988.

MUCK, R. E.; BOLSEN, K. K. Silage preservation and additive products. Field Guide and Silage Management in North America. In: National Feed Ingredients Association, 1991 West Des Moines p.105-126.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 334p. 2005.

OSAWA, C.C., LIRENY, A.G.G., RAGAZZI, S.; Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis; **Química Nova**; 29(3); p593-599; 2007.

PAIM, A. P. S. *et al.* Automatic potentiometric flow titration procedure for ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p.1221-1225, 2002

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J.L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária Ambiental**. V. 10, n. 2, p.106-110, 2005

PONTES, M.E.; MARINHO, A. Caracterização das bactérias lácticas presentes em produtos alimentares. **Veterinária Técnica**, v. 7, n. 3, p.42-45, 1997.

POTTER, N.N.; Deterioration Factors and Their Control. In WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; Engineering aspects of ensiling. **Biochemical Engineering Journal**; V. 13, p181-188;2003

RAYNIE, D.E. Modern extraction techniques. **Analytical Chemistry**. v. 76, p.4659-4664, 2004p.

REIS B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**. v. 19, n. 1, p.51-56, 2000

REIS, B. F. *et al.* Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plants digest. **Analitica Chimica Acta**. v. 293, p.129-138, 1994

ROCHA, F. R. P. ; MARTELLI, P. B. ; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**. v. 23, n. 1, p. 119-125, 2000.

ROCHA, F. R. P *et al.* Multicommutation in flow analysis: concepts, application and trends. **Analytica Chimica Acta**. v. 468, p.119-131, 2002

- ROSINI, F. ; NASCENTES C. C. ; NOBREGA, J. A. Experimentos didaticos envolvendo radiação microondas. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 1012-1015, 2004.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. 2 ed. New York: Chichester, 1988. 498
- SAAD, B. Determination of free fatty acids in palm oil samples using non-aqueous flow injection titrimetric method. **Food Chemistry**. v. 102, p. 1407-1417, 2007
- SCHULTHESS, P. *et al.* A hydrogen ion-seletive liquid-membrane electrode based on tri-*n*-dodecilamine as neutral carrier. **Analytica Chimica Acta**. v. 131, p.111-116, 1981
- SHANTA N.C., NAPOLITANO, G.E.; Gas chromatography of fatty acids; **Journal of Chromatography**; 624; p37-51; 1992.
- SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I.. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. São paulo: Livroceres 1979
- SILVA, D. J., QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos**. 3.ed., Viçosa: UFV, 2002

- SILVA, C. R.; SIMONI, J. A. Avaliação da capacidade tamponante – um experimento participativo. **Química Nova**. v. 23, n. 3, p.405-409, 2000
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5.ed. Philadelphia: Harcourt Brace College, 1998. 849p.
- SOUTHGATE, D. A. T. The definition and analysis of dietary fibre. **Nutritional Review**. v. 35, n. 3, 31-37, 1977
- SOUZA, G. B. **Pré tratamento e caracterização dos constituintes nutricionais em amostras de alimento animal**. São Carlos; 2003; 75p.
Dissertação (mestrado em química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo
- SOUZA, G. B. *et al.* Otimizações na metodologia “Nylon Bag” empregada na determinação de fibras. **Revista Brasileira de Zootecnia**. SUBMETIDO
- SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; GUIMARÃES, E. S. Ensaio de proficiência de laboratório de nutrição animal. **Boletim Embrapa**. v. 64, 2005
- SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; RASSINI, J. B. Determinação de matéria seca e umidade em solos e plantas com forno de microondas doméstico. **Boletim Embrapa**. v. 33, 2002, 9p.

- TOMICH, T. R. *et al.* Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: Uma proposta para qualificação da fermentação; **boletim embrapa**. v. 57; 2003
- TORRES, K. Y. C. *et al.* Recentes avanços e novas perspectivas dos eletrodos íon-seletivos. **Química Nova**. v. 29, n. 5, p.1094-1100, 2006
- TROJANOWICZ, M., **Flow injection Analysis - Instrumentation and Application**, World Scientific, 2000
- TROMPIER E. Potentiometric titration: Meeting the challenge of reliable measurements. Disponível em: http://www.radiometer-analytical.com/all_resource_centre.asp?code=122> acesso em: 04 jun. 2007, 16:31:49
- TUMANG, C. A.; PAIM, A. P. S.; REIS, B. F. Automatic flow system titration based on multicommutation for spectrophotometric determination of total acidity in silage extract. **Journal of AOAC Internation**. v. 85, n. 2; p. 328-332; 2002
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Official Agr. Chem.**, v.46(5), p.829-835, 1963.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 51, p.780-785, 1968.

WEINBERG Z. G.; ASHBELL G. Engineering aspects of ensiling. **Biochemical Engineering Journal**. V. 13, p. 181–188, 2003

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações – IUPAC 1994). **Química Nova**. n. 22, n. 1, p. 143-146; 1999

ZAGATTO, E.A.G. *et al.* Evolution of the commutation concept associated with the developmente of flow analysis. **Analytica Chimica Acta**. v. 400, p. 249-256, 1999