

Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro em amostras com alto teor de amido

Utilization of industrial enzymes in the evaluation of neutral detergent insoluble fiber content in high-starch samples

Daiany Íris Gomes¹; Cláudia Batista Sampaio²; Edenio Detmann^{3*};
Sebastião de Campos Valadares Filho⁴; Rafael Mezzomo⁵;
José Gilson Louzada Regadas Filho⁶

Resumo

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar o uso de enzimas industriais na avaliação da fibra em detergente neutro (FDN) de materiais ricos em amido. No primeiro experimento verificou-se a exatidão das estimativas dos teores de FDN obtidas com a utilização de diferentes enzimas industriais (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) em diferentes volumes (50, 100, 250 ou 500 µL/amostra). Foram produzidas amostras contendo amido nas concentrações de 0, 100, 300, 500 e 1000 g/kg, utilizando celulose e amido purificados (n = 240). No segundo experimento foram avaliadas amostras de milho e sorgo, considerando-se os três tipos e os quatro volumes de enzimas utilizados no primeiro experimento, sendo adicionada a avaliação de alíquotas sem a utilização de enzimas (n = 104). Para amostras simuladas com concentração de amido menor ou igual a 300 g/kg não foram verificados vícios significativos sobre a recuperação da FDN, não havendo diferenças entre enzimas. Houve redução mais acentuada do teor de FDN por volume de enzima na amostra de milho em comparação ao sorgo. Para a avaliação dos teores de fibra em detergente neutro recomenda-se o uso das α -amilases Termamyl 2X e Liquozyme 2.2X com atividades de 240 e 300 KNU/g, respectivamente, em volumes de 250 µL para amostras de massa variando de 0,7 a 1,0 g.

Palavras-chave: α -amilase, amiloglicosidase, análise de alimentos, carboidratos fibrosos

Abstract

It were performed two experiments to evaluate the utilization of industrial enzymes in the evaluation of NDF contents in high-starch materials. In the first experiment, it was verified the accuracy of estimates of neutral detergent fiber (NDF) obtained with the utilization of three industrial enzymes (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2.X, and Amylase AG 300L) at different volumes (50, 100, 250 or 500 µL/sample). Samples were simulated to contain starch at 0, 100, 300, 500 and 1000 g/kg using purified cellulose and starch (n = 240). In the second experiment, samples of corn grain and sorghum grain were evaluated considering the same enzyme types and volumes used in the first experiment adding aliquots without using enzyme (n = 104). There was no significant bias of NDF recovery for simulated samples containing starch up to 300 g/kg. Considering those samples, none difference among enzymes was

¹ Prof^a Adjunta, Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, Parauapebas, PA. E-mail: daiany.gomes@hotmail.com

² Prof^a Adjunta, Dept^o de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG. E-mail: claudiabsampaio@yahoo.com.br

³ Prof. Associado, Dept^o de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG. E-mail: detmann@ufv.br

⁴ Prof. Titular, Dept^o de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG. E-mail: scvfilho@ufv.br

⁵ Prof. Adjunto, Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, Parauapebas, PA. E-mail: mezzomo@zootecnista.com.br

⁶ Bolsista de Pós-Doutorado, Dept^o de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG. E-mail: gilsonagro@yahoo.com.br

* Autor para correspondência

observed. It was observed a more intense decrease in NDF content according to each enzyme unit added on corn when compared to sorghum. Considering NDF evaluation in samples with mass of 0.7 to 1.0 g, it can be recommended the utilization of 250 μ L the α -amylases Termamyl 2X and Liquozyme 2.2X with activities of 240 and 300 KNU/g, respectively.

Key words: α -amilase; amyloglucosidase; feed analysis; fibrous carbohydrates

Introdução

O método de análise de componentes fibrosos denominado de “sistema detergente” foi inicialmente desenvolvido para avaliação de forragens. Subseqüentemente, este foi estendido aos demais tipos de alimentos. Entretanto, a sua aplicação a outros tipos de matrizes orgânicas não fibrosas está associada a alguns problemas analíticos. De forma particular, a limitação do sistema detergente na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) em alimentos com elevado teor de amido está associada à dificuldade de filtração devido à concentração de amido em si, o qual pode se exceder em relação à capacidade do detergente em solubilizar a amostra (MASCARENHAS-FERREIRA; KERTENS; GAST, 1983) ou precipitar por gelatinização, promovendo superestimação da concentração de fibra insolúvel (HALL, 2007; VALENTE et al., 2011a).

O método de análise de FDN originalmente desenvolvido (VAN SOEST; WINE, 1967) passou por diversas alterações com o intuito de possibilitar a avaliação de concentrados em geral. No caso de alimentos com matriz orgânica rica em amido, apenas a solução detergente não se mostra eficiente em solubilizar o conteúdo celular; assim, recomenda-se o uso de enzima α -amilase para obter com exatidão a fração fibrosa insolúvel dos alimentos (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991; MERTENS, 2002; FERREIRA; MERTENS, 2007; VALENTE et al., 2011a). No entanto, a fonte e a quantidade da enzima não são devidamente especificadas; dessa forma, variações significativas podem ser observadas nos procedimentos adotados pelos laboratórios, reduzindo a rusticidade do método de análise. Isto se torna particularmente relevante em termos de análise de compostos fibrosos, pois os conceitos

de fibra atualmente empregados na nutrição animal são essencialmente empíricos e definidos pelo método (UNDERSANDER; MERTENS; THIEX, 1993; DETMANN, 2010). Assim, a proposição de um método modificado apresenta potencial para definir um novo valor de fibra, o qual deixa de ser comparável ao valor produzido pelo método original (UNDERSANDER; MERTENS; THIEX, 1993; MERTENS, 2002). Desta forma, o excesso de variantes de um mesmo método muitas vezes compromete o cotejamento adequado dos parâmetros estabelecidos em um trabalho de pesquisa, limita a aplicabilidade das inferências e restringe a robustez do método per si (DETMANN, 2010).

No método oficial para análise do teor de FDN adotado pela AOAC International (MERTENS, 2002) não há especificação direta de tipo, dose ou atividade da α -amilase a ser utilizada, mas somente procedimento de aferição de soluções enzimáticas por intermédio de avaliação visual. Isso denota limitações ao método, pois pode comprometer sua rusticidade.

Diferentes enzimas industriais estão disponíveis no mercado, as quais possuem, de forma geral, certificação de qualidade e de nível de atividade. Isso poderia constituir vantagem, pois a aquisição de produto certificado e padronizado poderia ampliar a homogeneidade de aplicação do método entre laboratórios, incrementando sua rusticidade. Contudo, devido ao rol de produtos disponíveis no mercado, o tipo e o volume das enzimas que poderiam ser potencialmente utilizadas na avaliação de FDN não estão estabelecidos. Este fato se torna particularmente relevante considerando-se que diferentes alimentos são constituídos por diferentes matrizes orgânicas, as quais apresentam diferentes níveis de complexidade para

solubilização e hidrólise de substâncias contidas no conteúdo celular, inclusive o amido. Isto demanda recomendações exatas com relação ao tipo e quantidade de α -amilase a ser usada na análise.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o uso de enzimas industriais na quantificação da concentração de fibra insolúvel em detergente neutro em materiais rico em amido.

Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

No primeiro experimento verificou-se a exatidão das estimativas dos teores de FDN obtidas com a utilização de diferentes amilases industriais em diferentes volumes (relações volume:amostra) em amostras contendo diferentes concentrações de amido. Neste sentido, utilizou-se a técnica de simulação de amostras proposta por Valente et al. (2011a; 2011b).

Foram avaliadas três amilases industriais: Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L. Ressalta-se que as duas primeiras são classificadas como amilolíticas, ao passo que a última é atribuída atividade amiloglicolítica. Todas as enzimas foram produzidas pela Novozymes® (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das características das enzimas.

Item	Enzima ¹		
	Termamyl 2X	Amylase AG 300L	Liquozyme Supra 2.2X
Atividade qualitativa	α -amilase	amiloglicosidase	α -amilase
Atividade quantitativa ^{2,3}	240 KNU-T/g	300 AGU/mL	300 KNU/g
Forma física	Líquida	Líquida	Líquida
Densidade (g/L)	1260	1170	1260
Organismo de produção	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
Método de produção	Produzido por fermentação submersa de microrganismos autoclonados. A proteína enzimática é separada e purificada a partir do organismo produtor.		
Temperatura de armazenamento	0-25°C	0-10°C	0-25°C

¹ A informação foi obtida do fabricante. ² Limite inferior. ³ KNU = unidades de *Kilo Novo* (*Kilo Novo Units*) de α -amilase; uma KNU é a quantidade de α -amilase que, sob condições padrões (pH 7,1; 37°C), dextriniza 5,26 g de amido. AGU = unidade de amiloglicosidase; uma AGU é definida como a quantidade de enzima que cliva 1 μ mol de maltose por minuto sob condições padrões de ensaio (concentração de substrato de 10 mg/mL; 37°C; pH 5,0; tempo de incubação de 30 minutos).

Fonte: Elaboração dos autores.

Foram produzidas amostras contendo 0, 100, 300, 500 e 1000 g de amido/kg de matéria seca. Utilizou-se como padrão analítico para aferição dos teores de FDN amostras de papel-filtro quantitativo (faixa preta; diâmetro 12,5 cm; cód, 050154, Vetec®), composto por celulose purificada. O papel foi processado em moinho de facas provido de peneira com porosidade de 1 mm, conforme recomendações de Valente et al. (2011a; 2011b).

As diferentes concentrações de amido foram produzidas pela mistura do padrão de celulose com amido purificado (Merck 101252).

As amostras foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®), seguindo-se a proporção de 20 mg de matéria seca/cm² de superfície. A solução de detergente neutro foi produzida segundo recomendações de Detmann et al. (2012).

Os sacos contendo as amostras foram acondicionados em potes de polietileno. A solução de detergente neutro foi então adicionada à temperatura ambiente seguindo a proporção de 100 mL/g de amostra. Sobre a solução de detergente neutro foram acrescentadas as enzimas em diferentes volumes: 50, 100, 250 ou 500 μL /amostra. Os potes foram vedados e autoclavados por 1 hora a 105°C (Método INCT-CA F-002/1; DETMANN et al., 2012). Após a extração, foram realizadas lavagens sequenciais com água destilada quente e acetona. Os sacos foram então secos em estufa com ventilação forçada ($60^\circ\text{C}/48$ horas) e, sequencialmente, em estufa não ventilada ($105^\circ\text{C}/2$ horas), acondicionados em dessecador e pesados. Foram avaliadas quatro repetições para cada combinação de tipo e volume de enzima e concentração de amido, totalizando 240 avaliações.

Previamente aos procedimentos de extração os sacos foram lavados com solução de detergente neutro comercial em ebulição, água quente e acetona; secos e pesados conforme o procedimento descrito anteriormente para se obterem as taras (DETMANN et al., 2012).

Como o padrão analítico de FDN é constituído por celulose purificada e o amido não possui componentes da FDN, admitiu-se que o resíduo insolúvel em detergente neutro deveria ser formado exclusivamente pela massa de celulose purificada submetida à análise. Assim, qualquer variação observada sobre o resíduo da análise em relação à massa de padrão celulose adicionada foi considerada como viés do processo analítico. Neste caso, o viés seria representado pela retenção de amido gelatinizado.

As estimativas dos vícios foram analisadas por intermédio de análise de variância, segundo delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $5 \times 3 \times 4$, sendo cinco concentrações de amido (0, 100, 300, 500 e 1000 g/kg), três tipos (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) e quatro volumes (50, 100, 250 e 500 μL /

amostra) de enzimas. Os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.1). A significância dos vícios médios de cada tratamento foi avaliada por intermédio das propriedades dos intervalos de confiança. Adotou-se $\alpha = 0,01$.

No segundo experimento foram utilizadas amostras de milho grão e sorgo grão como matrizes orgânicas amiláceas. As amostras foram processadas em moinho de facas (1 mm; VALENTE et al., 2011b) e avaliadas quanto ao teor de matéria seca (método INCT-CA G-003/1; DETMANN et al., 2012). Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em sacos F57 (Ankom®) e avaliadas quanto aos teores de FDN conforme os procedimentos descritos para o primeiro experimento. Neste caso, foram avaliados três tipos (Termamyl 2X, Liquozyme Supra 2.2X e Amylase AG 300L) e quatro volumes de enzimas (50, 100, 250 e 500 μL /amostra) para cada matriz. Adicionalmente, foram avaliadas alíquotas sem a utilização de enzimas. Foram avaliadas quatro repetições para cada combinação, totalizando 104 avaliações.

Os teores de FDN de cada matriz foram avaliados de forma independente para cada enzima por intermédio de análise de regressão tendo como variável independente o volume de enzima utilizado. Após a inspeção do comportamento dos dados optou-se pela adoção de modelo com estrutura *linear-response-plateau* (LRP), o qual foi parametrizado por:

$$\hat{Y} = \hat{F}_0 + \hat{\beta} \times V; \forall V < V_c \quad (1);$$

$$\hat{Y} = \hat{F}_c; \forall V \geq V_c \quad (2);$$

em que: \hat{Y} = teor estimado de FDN (g/kg de matéria seca); \hat{F}_0 = teor estimado de FDN quando $V = 0$; V = volume de enzima (μL /amostra); $\hat{\beta}$ = decréscimo sobre os teores de FDN com a utilização de enzima [(g/kg)/ μL]; V_c = volume crítico de enzima a partir do qual não se observa mais redução em \hat{Y} (μL); e \hat{F}_c = teor estimado de FDN com $V \geq V_c$ (g/kg).

Para o ajustamento das funções as estimativas dos teores de FDN sem a utilização de enzimas em cada alimento foram consideradas como nível 0 para todas as enzimas. As funções foram ajustadas utilizando-se o procedimento *linear-response-plateau* do software SAEG (versão 9.1), adotando-se $\alpha = 0,01$.

Resultados

Houve interação tripla ($P < 0,01$) de tipo e volume de enzima e concentração de amido sobre

as estimativas dos vícios de recuperação da celulose purificada (Tabela 2). De forma geral, vícios significativos ($P < 0,01$) somente foram obtidos nas amostras simuladas contendo as concentrações de 500 e 1000 g/kg de amido, independentemente do tipo e volume de enzima, excetuando-se a combinação obtida com o volume de 500 μL e a enzima Liquozyme Supra 2.2X. Ressalta-se que os valores do vício de recuperação, de forma geral, foram superiores para as amostras contendo amido na concentração de 1000 g/kg em relação às amostras contendo 500 g/kg (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas do viés médio (mg/amostra) de recuperação de celulose de acordo com as diferentes combinações de tipo de enzima, volume de enzima e concentração de amido em amostras simuladas

Enzima	Volume (μL)	Concentração de amido (g/kg) ^{1 2}				
		0	100	300	500	1000
Termamyl 2X	50	-17,1 (0,187)	-16,7 (0,198)	12,5 (0,333)	240,3 ($<0,001$)	153,0 ($<0,001$)
	100	-23,3 (0,740)	-1,9 (0,883)	13,8 (0,357)	181,2 ($<0,001$)	136,3 ($<0,001$)
	250	0,4 (0,978)	-8,8 (0,497)	0,0 (0,998)	51,5 ($<0,001$)	133,7 ($<0,001$)
	500	3,5 (0,784)	-0,1 (0,994)	12,7 (0,395)	75,4 ($<0,001$)	87,6 ($<0,001$)
AG 300L	50	-13,9 (0,283)	16,8 (0,194)	25,0 (0,055)	187,6 ($<0,001$)	228,6 ($<0,001$)
	100	-14,2 (0,271)	-1,6 (0,898)	14,3 (0,270)	210,1 ($<0,001$)	249,0 ($<0,001$)
	250	-11,7 (0,364)	-0,7 (0,957)	21,1 (0,105)	249,0 ($<0,001$)	224,4 ($<0,001$)
	500	-11,5 (0,373)	1,9 (0,883)	13,4 (0,300)	201,1 ($<0,001$)	224,2 ($<0,001$)
Liquozyme	50	-10,4 (0,422)	6,1 (0,641)	-3,7 (0,772)	64,4 ($<0,001$)	127,6 ($<0,001$)
	100	-27,3 (0,036)	5,8 (0,653)	7,1 (0,579)	75,7 ($<0,001$)	120,3 ($<0,001$)
	250	-34,0 (0,089)	7,3 (0,569)	-2,0 (0,873)	42,8 (0,001)	114,1 ($<0,001$)
	500	-0,8 (0,947)	-20,7 (0,111)	-6,3 (0,625)	17,1 (0,187)	75,1 ($<0,001$)

¹ EPM = 12,93. ² Os valores entre parêntese correspondem ao nível descrito de probabilidade para o erro tipo I, que foi associado a: $H_0: \mu = 0$ e $H_a: \mu \neq 0$.

Fonte: Elaboração dos autores.

O desdobramento da interação tripla complementou a informação gerada pela avaliação da significância dos vícios. Assim, para amostras com baixa concentração de amido (≤ 300 g/kg), além da não verificação de vícios significativos ($P < 0,01$; Tabela 2), observou-se não haver diferença entre as enzimas ($P > 0,01$), independentemente do volume utilizado (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da diferença entre as enzimas considerando-se estudo aninhado às diferentes combinações volume de enzima \times concentração de amido.

Concentração de amido (g/kg)	Volume de enzima (μ L)	Valor P ¹
0	50	0,935
0	100	0,766
0	250	0,371
0	500	0,698
100	50	0,176
100	100	0,891
100	250	0,678
100	500	0,394
300	50	0,291
300	100	0,913
300	250	0,377
300	500	0,488
500	50	<0,001
500	100	<0,001
500	250	<0,001
500	500	<0,001
1000	50	<0,001
1000	100	<0,001
1000	250	<0,001
1000	500	<0,001

¹ Diferenças entre enzimas.

Fonte: Elaboração dos autores.

Contudo, para amostras com 500 e 1000 g/kg de amido verificou-se diferença ($P < 0,01$) entre as enzimas em todos os volumes utilizados (Tabela 3). De forma geral, as enzimas Termamyl 2X e Liquozyme Supra 2.2X propiciaram menores vícios nas amostras com maiores concentrações de amido, quando comparadas à Amylase AG 300L (Figura 1). Em comparação específica, a enzima Liquozyme Supra 2.2X mostrou-se pouco mais eficiente que a enzima Termamyl 2X, pois propiciou vícios de menor valor (Figura 1).

Dentro de cada matriz orgânica avaliada, as diferenças entre enzimas foram de pequena magnitude, havendo, contudo, diferenças marcantes entre milho e sorgo (Tabela 4; Figuras 2 e 3). Embora apresentando teores de FDN similares com a utilização de maiores volumes de enzimas, a ausência de amilase na análise causou maior distorção sobre a amostra de milho, com elevação de cerca de 360 g/kg sobre o teor de FDN, comparada a, aproximadamente, 100 g/kg na amostra de sorgo (Tabela 4). As amostras também diferiram no tocante à característica de hidrólise do amido, havendo, em média, maior redução do teor de FDN por volume de enzima na amostra de milho em comparação ao sorgo [aproximadamente 7 vs, 0,8 (g/kg)/ μ L]. Isso culminou com maior demanda de enzima para a correta avaliação do sorgo em comparação ao milho (Tabela 4; Figuras 2 e 3).

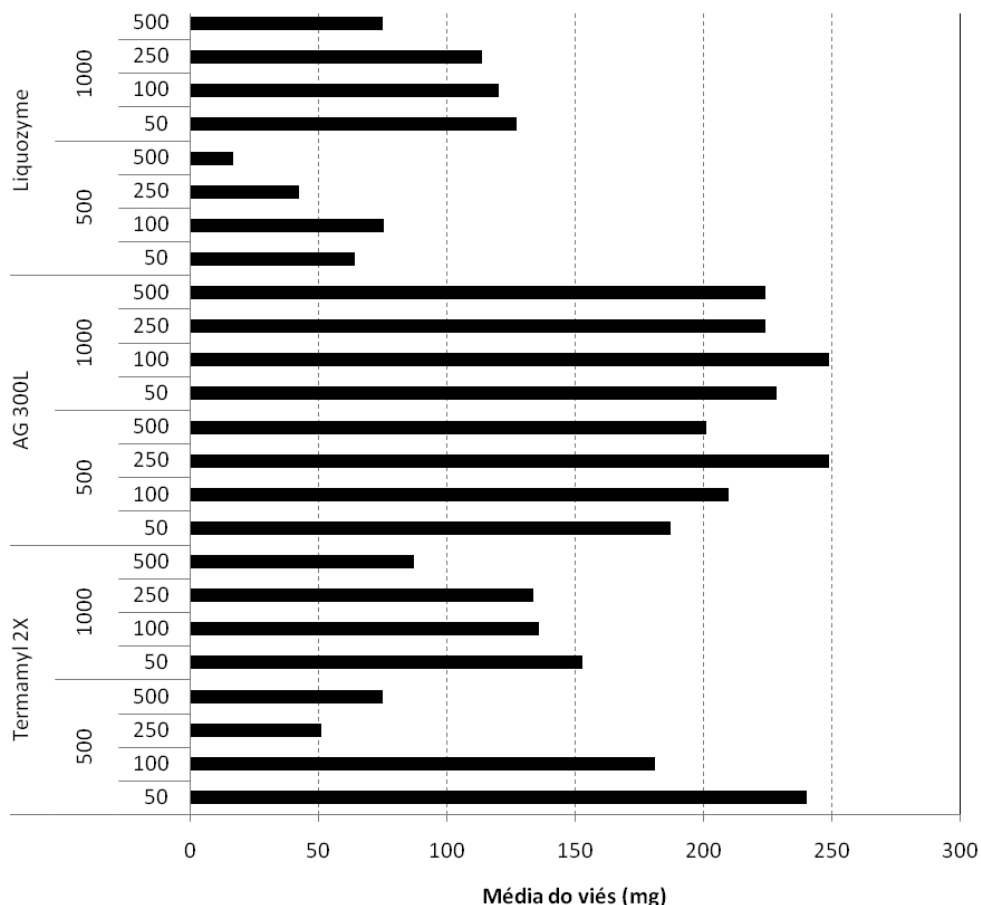
Tabela 4. Parametrização das estimativas de concentração de fibra em detergente neutro (g/kg) em diferentes matrizes amiláceas em função do volume das enzimas (μL) de acordo com modelo *linear-response-plateau*.

Matriz	Enzima	Fase Linear ¹		Plateau ¹		s_{XY}
		\hat{F}_0	$\hat{\beta}$	V_c	\hat{F}_c	
Milho	Termamyl 2X	552,2	-7,19	49,91	193,2	17,02
	AG 300L	552,2	-7,17	49,89	194,5	10,55
	Liquozyme	552,2	-6,74	52,74	196,8	7,88
Sorgo	Termamyl 2X	290,0	-0,74	134,35	190,0	8,62
	AG 300L	284,6	-0,77	124,59	189,1	6,76
	Liquozyme	285,1	-1,04	108,43	172,1	4,52

¹ Detalhes sobre os parâmetros podem ser obtidos nas equações (1) e (2).

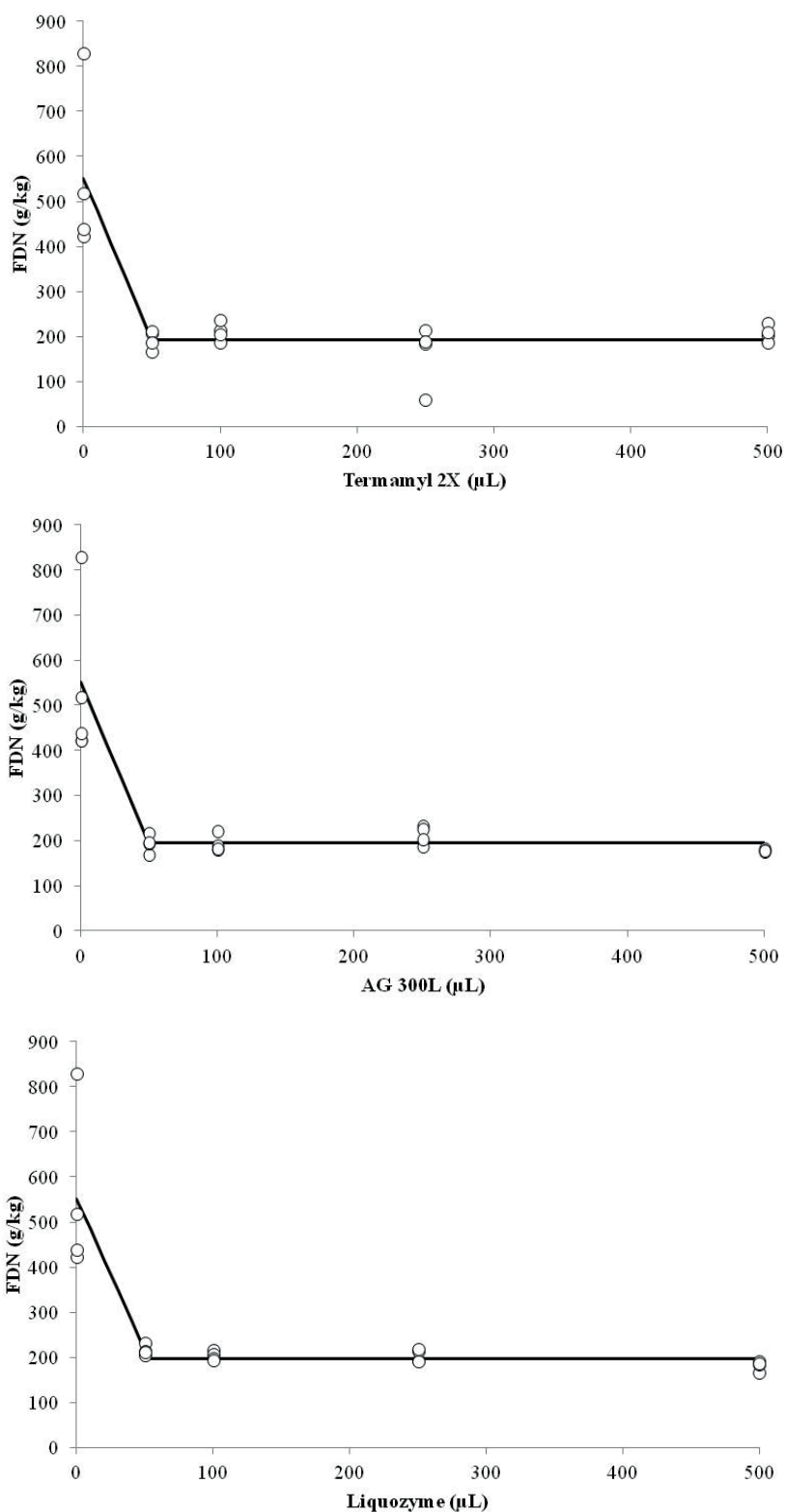
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 1. Vícios médios de recuperação de celulose (mg/amostra) para os diferentes tipos e volumes de enzima considerando as concentrações de amido de 500 e 1000 g/kg em amostras simuladas.



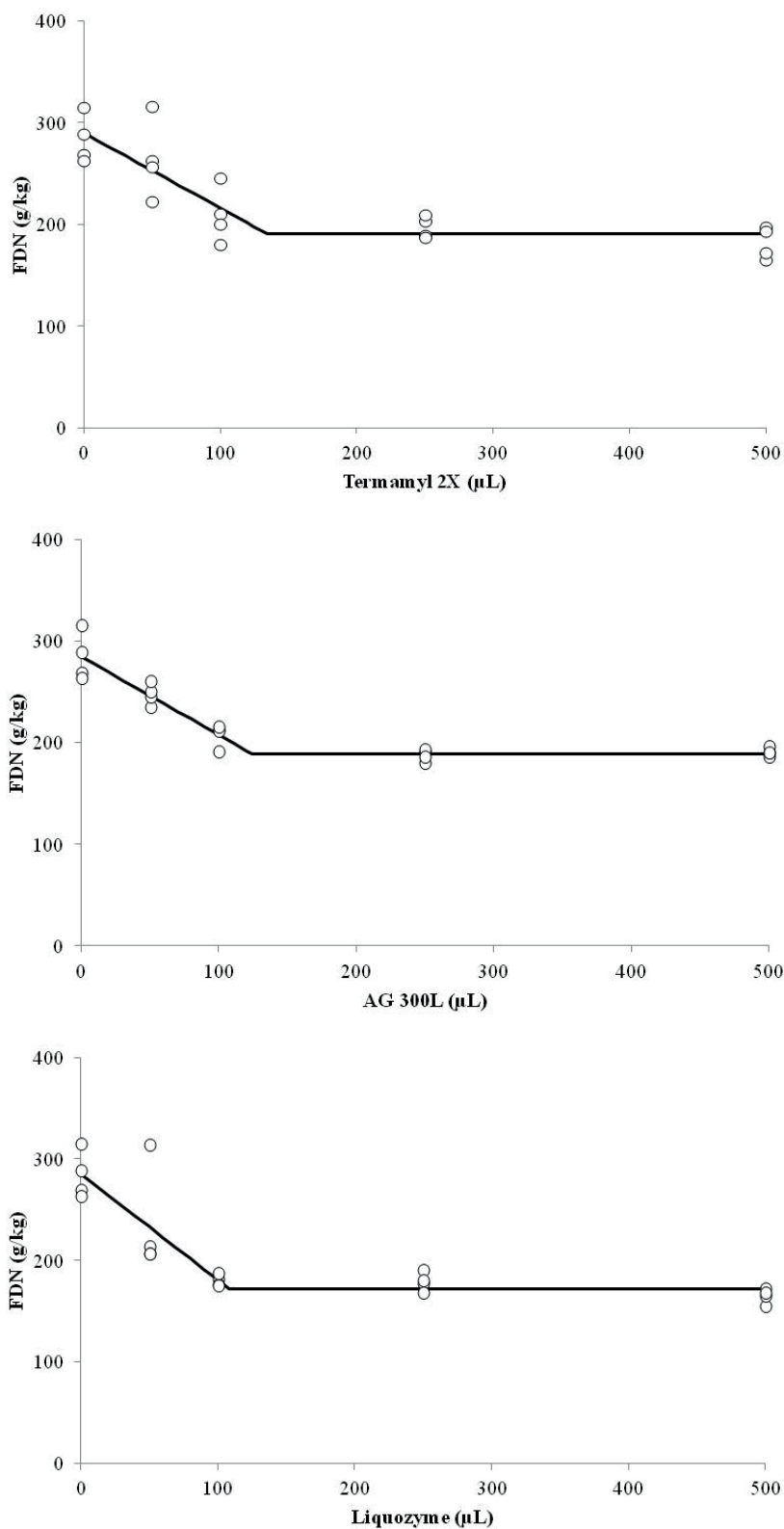
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Estimativas da concentração de fibra em detergente neutro (FDN) em milho de acordo com os diferentes tipos e volumes de enzimas (detalhes das funções ajustadas são mostrados nas Equações 1 e 2 e na Tabela 4).



Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 3. Estimativas da concentração de fibra em detergente neutro (FDN) em sorgo de acordo com os diferentes tipos e volumes de enzimas (detalhes das funções ajustadas são mostrados nas Equações 1 e 2 e na Tabela 4).



Fonte: Elaboração dos autores.

Discussão

A completa hidrólise e solubilização do amido presente nas amostras permite a quantificação correta dos componentes fibrosos dos alimentos (DETMANN; VALADARES FILHO, 2010; VALENTE et al., 2011a), além da separação acurada entre fibra insolúvel e conteúdo celular (VAN SOEST, 1994).

Os métodos disponíveis para avaliação dos teores dos carboidratos incluem análises empíricas e não empíricas. Nas análises não empíricas obtêm-se compostos específicos (e.g., glicose). Por outro lado, nas análises empíricas o método empregado define o material medido, que é o caso da FDN. Para adoção das análises empíricas é essencial que o método estabelecido seja seguido precisamente ou os resultados não descreverão o que se pretende medir (HALL, 2007).

Os resíduos correspondentes à fibra insolúvel devem estar isentos de contaminantes, como o amido. A contaminação por amido ocorre devido à sua gelatinização em meio neutro em temperaturas de 90 a 100°C (HALL, 2007), as quais são atingidas na avaliação de FDN. Com a gelatinização, o amido precipita em conjunto com os componentes da FDN, sendo erroneamente contabilizado como fibra (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991; VALENTE et al., 2011a).

As amostras simuladas com concentração de amido menor ou igual a 300 g/kg não apresentaram contaminação significativa por amido para nenhuma das enzimas ou volume de enzimas avaliado, o que pode ser comprovado pela ausência de vício ($P > 0,01$) de recuperação da celulose nestas amostras (Tabela 2). Nesta situação, a massa proporcional de amido pode ter sido adequadamente solubilizada pela solução de detergente com auxílio da hidrólise das cadeias propiciada pela ação conjunta das enzimas (Tabela 3).

A avaliação da FDN passou por várias alterações ao longo do tempo com o intuito de reduzir as interferências causadas pela presença de amido

(VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Apesar da presença de componentes adjuvantes na solução detergente (e.g., trietilenoglicol), a principal modificação se baseou na utilização de α -amilase. Entretanto, algumas α -amilases avaliadas inicialmente continham outras atividades enzimáticas, como atividades hemicelulolítica e proteolítica (MASCARENHAS-FERREIRA; KERSTENS; GAST, 1983). Posteriormente, enzimas produzidas por *Bacillus subtilis* foram utilizadas; mas, além de apresentar atividade hemicelulolítica, a enzima era rapidamente inativada em temperaturas elevadas (100°C). Além disso, as enzimas com atividade de clivagem das ligações α -1,6 eram cálcio-sensíveis, sendo inativadas na presença de EDTA (componente da solução de detergente neutro; VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Portanto, fazia-se necessário a utilização de enzima estável em temperaturas elevadas, eficiente em solubilizar o amido das amostras (CHERNEY; PATTERSON; CHERNEY, 1989; VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991; MERTENS, 2002) e que apresentasse alta especificidade, ou seja, sem a possibilidade de hidrólise de componentes não desejados.

O uso de uma α -amilase termoestável na avaliação da FDN tem sido indicado pela AOAC como procedimento padrão para promover a solubilização do amido em amostras de alimentos (MERTENS, 2002). Dessa forma, para a quantificação exata da fibra insolúvel é imprescindível a adição de α -amilase ou os resultados se mostrarão positivamente viesados devido à gelatinização do amido (VALENTE et al., 2011a). Neste contexto, de acordo com os resultados do presente estudo, as três enzimas avaliadas parecem constituir alternativas igualmente efetivas para avaliação de FDN considerando-se a informação gerada a partir de amostras simuladas com baixas concentrações de amido (≤ 300 g/kg; Tabelas 2 e 3).

Contudo, considerando-se a informação gerada com amostras simuladas com altos teores de amido (500 e 1000 g/kg), verificou-se que ocorreram

vieses positivos sobre a recuperação do padrão de celulose, independentemente da enzima e de seu volume (Tabelas 2 e 3; Figura 1). Essa informação seria particularmente relevante, pois as matrizes amiláceas mais comuns (milho e sorgo) possuem teores de amido intermediários a estes valores (VALADARES FILHO et al., 2010).

No entanto, o comportamento obtido com amostras simuladas com elevada concentração de amido (Tabelas 2 e 3; Figura 1) deve ser interpretado de forma mais minuciosa, uma vez que várias informações podem ser retiradas simultaneamente a partir dos resultados obtidos.

Em primeiro lugar, releva-se a presença de diferenças relativas entre as enzimas, as quais não eram evidentes sob baixas concentrações de amido (Tabela 3; Figura 1). De forma geral, verificou-se que a enzima AG 300L apresenta menor eficiência para reduzir a contaminação por amido em relação à Termamyl 2X e à Liquozyme 2.2X (Figura 1). Esta diferença possivelmente se deve à diferença de ação entre essas, uma vez que a AG 300L possui atividade amiloglicolítica, ao passo que as demais possuem atividade amilolítica (Tabela 1).

A atividade amiloglicolítica possui como produto final a glicose, ou seja, constitui atividade mais complexa em relação à simples hidrólise do amido. Contudo, para evitar a interferência gravimétrica por gelatinização do amido não há necessidade de sua conversão completa em glicose, mas somente sua hidrólise em oligossacarídeos. Logo, considerando-se condições fixas de tempo de reação e de massa de amido, enzimas de ação amilolítica seriam mais eficientes em relação a enzimas amiloglicolíticas na avaliação de FDN, o que suporta os resultados obtidos com amostras simuladas (Figura 1).

Em adição, aparentemente a enzima Liquozymes 2.2X apresentou, de forma geral, vícios pouco inferiores aos obtidos com a Termamyl 2X (Figura). Contudo, isso parece refletir somente a diferença na atividade destas enzimas (Tabela 1).

Os resultados obtidos com amostras simuladas

contendo alto teor de amido (Tabela 2) aparentemente contradizem aqueles obtidos com amostras de alimentos (Tabela 4; Figuras 2 e 3). As matrizes amiláceas aqui avaliadas possuem concentração de amido superior a 500 g/kg (VALADARES FILHO et al., 2010). Logo, a estabilidade na concentração de FDN obtida a partir de determinado volume de enzima (Figuras 2 e 3) parece não condizer com a elevação dos vícios com o incremento na concentração de amido em amostras simuladas (Tabela 2).

Contudo, a técnica de simulação de amostras a partir de padrão de celulose possui algumas limitações intrínsecas, pois, mesmo possibilitando a avaliação de amostras de diferentes composições, esta não permite simular as interações físicas e químicas entre as moléculas na forma como observado em amostras integrais (VALENTE et al., 2011a; 2011b).

As moléculas de amido contidas em grãos possuem elevada interação com moléculas protéicas responsáveis pelo armazenamento dos grânulos de amido. Por outro lado, o amido utilizado em amostras simuladas é purificado. Logo, sua maior exposição poderia propiciar maior rapidez no processo de gelatinização. Em amostras integrais, a exposição do amido ocorreria de forma mais gradativa em função da solubilização das moléculas que formam a cobertura dos grânulos. Logo, o processo de gelatinização seria mais lento e a ação das amilases poderia ser realizada de forma mais gradativa. Assim, não haveria uma divergência verdadeira entre amostras simuladas e amostras reais.

Os resultados obtidos com os alimentos permitiram evidenciar que existem diferenças entre matrizes orgânicas as quais parecem refletir diferentes níveis de complexidade das moléculas de amido e das estruturas que protegem estas moléculas no grão. Isto culminou com a observação de diferenças entre milho e sorgo no tocante à redução do teor de FDN por unidade de enzima adicionada

e ao volume de enzima necessário para máxima hidrólise de amido. Portanto, a complexidade apresentada nos alimentos pode influenciar a relação enzima \times amostra (Tabela 4; Figuras 2 e 3).

A recomendação de um volume específico de enzima para cada tipo de matriz amilácea seria interessante do ponto de vista técnico, mas poderia comprometer a rusticidade do método devido à ampla variação que iria ser exigida para este parâmetro da análise. Neste sentido, há de ser ressaltado que o uso de amilase em excesso é melhor do que o uso em quantidades restritas (MERTENS, 2002). Assim, considerando-se os resultados aqui obtidos e as peculiaridades exibidas pelas amostras de milho e sorgo (Tabela 4; Figuras 2 e 3), a recomendação de uso de enzimas deve ser nivelada pela maior demanda, neste caso, aquela determinada pela amostra de sorgo (aproximadamente 130 μ L/amostra). Considerando-se os valores avaliados neste estudo, a aproximação superior para 130 μ L corresponderia à recomendação de utilização de 250 μ L de enzima por amostra, o que poderia representar certa margem de segurança caso matrizes amiláceas de maior resistência à hidrólise sejam analisadas.

Adicionalmente, o uso de excesso de enzima deve ser evitado, pois, caso ocorra, pode ser observada retrogradação da hidrólise do amido. Assim, a quantidade de enzima a ser utilizada não deve ultrapassar em cinco vezes o mínimo necessário para hidrólise do amido da amostra (MERTENS, 2002). Considerando-se as demandas observadas para a amostra de milho (aproximadamente 50 μ L), a recomendação de 250 μ L seria considerada adequada.

Conclusões

A avaliação dos teores de FDN recomenda-se o uso das enzimas α -amilases Termamyl 2X e Liquozyme 2.2X com atividades de 240 e 300 KNU/g, respectivamente, em volumes de 250 μ L para amostras de massa variando de 0,7 a 1,0 g.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao apoio financeiro dado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal.

Referências

- CHERNEY, D. J. R.; PATTERSON, J. A.; CHERNEY, J. H. Use of 2-ethoxyethanol and α -amilase in the neutral detergent fiber method of feed analysis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 72, n. 11, p. 3079-3084, 1989.
- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E. S.; PIMENTEL, P. S.; QUEIROZ, A. C., MIZUBUTI, I. Y. (Ed.). *Novilhas leiteiras*. Fortaleza: Graphiti, 2010. p. 253-302.
- DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. (Ed.). *Métodos para análise de alimentos*. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214 p.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n. 4, p. 980-984, 2010.
- FERREIRA, G.; MERTENS, D. R. Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdã, v. 133, n. 3, p. 335-340, 2007.
- HALL, M. B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 36, p. 359-367, 2007. Suplemento.
- MASCARENHAS-FERREIRA, A.; KERSTENS, J.; GAST, C. H. The study of several modifications of the neutral detergent fibre procedure. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdã, v. 9, n. 1, p. 19-28, 1983.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.
- UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THIEX, N. *Forage analyses procedures*. Omaha: National Forage Testing Association, 1993. 139 p.
- VALADARES FILHO, S. C.; MACHADO, P. A. S.; CHIZZOTTI, M. L.; AMARAL, H. F.; MAGALHÃES,

- K. A.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CAPELE, E. R. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos CQBAL 3.0*. 3. ed. Viçosa: DZO-UFV, 2010. 502 p.
- VALENTE, T. N. P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F.; FIGUEIRAS, J. A.; SOUZA, M. A. Simulation of variations in the composition of samples in the evaluation of neutral detergent fiber contents by using cellulose standard in filter bags made from different textiles. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 40, n. 7, p. 1596-1602, 2011a.
- VALENTE, T. N. P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; SAMPAIO, C. B.; GOMES, D. I. Avaliação dos teores de fibra em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes bovinas moídas em diferentes tamanhos e em sacos de diferentes tecidos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 40, n. 5, p. 1148-1154, 2011b.
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. S. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds, IV, determinations of plant cell wall constituents. *Journal of the Association of Analytical Chemistry*, Arlington, v. 50, n. 1, p. 50-55, 1967.

