



ALESSANDRA DE CAMPOS FORTES

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS LABORATORIAIS
UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS
SOLÚVEIS E AMÔNIA EM SILAGENS**

LAVRAS - MG

2017

ALESSANDRA DE CAMPOS FORTES

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS NA
DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS E AMÔNIA EM SILAGENS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

LAVRAS - MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Fortes, Alessandra de Campos.

Avaliação de métodos laboratoriais utilizados na caracterização dos processos fermentativos em silagens / Alessandra de Campos

Fortes. - 2017.

88 p. : il.

Orientador: Thiago Fernandes Bernardes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Conservação de forragens. 2. Fermentação. 3. Procedimentos analíticos. I. Bernardes, Thiago Fernandes. II. Título.

ALESSANDRA DE CAMPOS FORTES

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS NA
CARACTERIZAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS EM SILAGENS**

***EVALUATION OF LABORATORY METHODS USED IN THE DETERMINATION OF
SOLUBLE CARBOHYDRATES AND AMMONIA IN SILAGENS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de junho de 2017.

Dra. Ana Paula de Oliveira Sader	UNESP
Dr. Roberto Maciel de Oliveira	UFLA
Dra. Vânia Ribeiro Ferreira	UFLA
Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS - MG
2017**

"Desistir... eu sempre pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça" (Cora Coralina).

Aos meus pais, Cléa e José Antonio, razão do meu viver, pelo amor incondicional, pelo tempo, carinho e atenção dispendida, pelo amparo e motivação durante a caminhada, pelo exemplo de vida, meu maior bem! Meus heróis! Sem vocês não sou ninguém e, por vocês, sou tudo!

Minha irmã querida, Adriana, caçulinha de quem tenho muito orgulho, pelo carinho, pela presença e pelo apoio.

E a todos aqueles que torceram e continuam torcendo por mim.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua imensa misericórdia em minha vida, por sempre ter guiado e iluminado meus passos. À Nossa Senhora Aparecida, minha mãezinha querida, por ter sido meu amparo, ter-me carregado no colo e ter-me dado forças para chegar até aqui.

À minha família, pois tudo que faço é por ela e dela vem a minha vontade de crescer pessoal e profissionalmente. Em especial, à minha mãe, Cléa, que sempre me apoiou e rezou por mim, todas as vezes em que tive vontade de desistir, por todo carinho e amor dedicados a mim. Ao meu pai, José Antonio que, mesmo sem saber o que dizer, abraça-me e diz que me ama e que vai dar tudo certo. À minha irmã Adriana, por todo apoio e carinho. E ao meu namorado Bruno, meu melhor amigo, meu parceiro, por todo o tempo, atenção e carinho dedicados a mim.

Ao meu orientador professor Thiago Bernardes por ter acreditado e visto meu potencial durante o processo seletivo. Pela orientação, atenção e ensinamentos durante todo o curso.

Ao professor Daniel Casagrande, sempre disposto a ajudar, sem o qual, talvez, nem tivesse chegado ao término do Doutorado. E, em nome dele, agradeço a todos os professores do DZO.

Aos professores Whasley Duarte do Departamento de Biologia e Mário Guerreiro do Departamento de Química, pela pronta disponibilidade em me auxiliar e por todos os ensinamentos, essenciais ao desenvolvimento do meu projeto de Tese.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos em Forragicultura NEFOR, pela aprendizagem construída, pelas amizades, companheirismo e pelo apoio para o desenvolvimento desta tese. Agradeço, principalmente, à Jéssica Gervásio, Paula e Breno e a todos do grupo da Conservação de Forragens que, de alguma forma, estiveram presentes no desenvolvimento dos experimentos.

Aos queridos amigos, que Lavras me trouxe, sem os quais minha estadia aqui seria ainda mais difícil, obrigada Josiane, Isabella, Fernanda, Leilane, Otília Tamele, Luciana e a tantos outros. Vou levá-los sempre no meu coração.

Ao IFRR *Campus* Amajari, em nome do professor Diretor Geral George Sterfson Barros, pela acolhida e apoio para que eu conseguisse estar sempre em Lavras finalizando meu projeto. Um agradecimento especial à minha amiga irmã, professora Camila Moraes, que sempre me apoiou, possibilitando meu afastamento do trabalho para execução das atividades do meu doutoramento.

Aos meus queridos alunos do Curso Técnico em Agropecuária do IFRR, pelo respeito, amizade e carinho que me motivam a cada dia e me reforçam a certeza das minhas escolhas e me dão forças para seguir amando o que faço sempre mais.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq) pela concessão da bolsa de estudos o auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento do projeto.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

A conservação de forragem via ensilagem é um processo bem conhecido e, disseminado, no mundo todo. Entretanto os métodos laboratoriais para avaliar silagens apresentam distinções entre os grupos de pesquisa. Nesse contexto, foram comparados procedimentos utilizados para avaliar carboidratos solúveis em água (CSA) e, também, métodos para determinar nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em silagens, com o objetivo de otimizar a rotina analítica em laboratórios de conservação de forragens. As amostras utilizadas foram coletadas em diferentes silos, constituindo quatro classes de silagens com diferentes perfis de fermentação: milho ($n = 20$), amendoim forrageiro ($n = 20$), capim elefante ($n = 20$) e cana-de-açúcar ($n = 20$). No primeiro experimento, as silagens foram submetidas à avaliação dos CSA por meio dos seguintes métodos: fenol ácido sulfúrico (FAS), antrona e fenol com extração em água (FEA). No segundo experimento, elas foram submetidas à determinação de N-NH₃, por meio dos seguintes métodos: eletrodo íon seletivo de amônia (ISE), fenol-hipoclorito (FH), kit comercial ureia 500 (marca: doles) e AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t Student a 10% de probabilidade. Os métodos antrona e FAS apresentaram valores semelhantes ($P > 0,10$) de CSA em todas as amostras avaliadas. Contudo o método FAS mostrou-se mais prático e preciso (coeficiente de variação médio: CVM = 0,07%), o qual também apresentou menor custo por amostra na determinação dos CSA das silagens avaliadas em relação ao método da antrona (R\$ 3,80 no FAS e R\$ 5,16 na antrona). O método FEA superestimou ($P < 0,10$) os valores de CSA, nas amostras de silagem de amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar, mas não houve diferença ($P > 0,10$) nos valores de CSA das silagens de milho. Portanto, para esta classe de silagem, o método FEA pode ser utilizado em substituição ao FAS pois, no método FEA, a extração dos CSA é realizada apenas em água, gerando economia de reagente (menos R\$ 0,47 por amostra em relação ao FAS, que utiliza extração em etanol 80%). Quanto aos valores de N-NH₃, o método utilizado como padrão foi o ensaio de FH, pois se mostrou mais prático, preciso (CVM = 1,58%) e econômico (R\$ 0,05 por amostra). O método AOAC apresentou valores semelhantes ($P > 0,10$) ao FH, mas foi menos prático, de menor precisão (CVM = 5,85%) e maior custo (R\$ 2,46 por amostra). O método ISE seria ainda mais prático que o FH, entretanto superestimou ($P < 0,10$) os valores de N-NH₃ das amostras e mostrou-se oneroso (R\$ 2,27 por amostra). Sendo assim, no presente estudo, verificou-se que os métodos mais indicados, para determinar CSA e N-NH₃ em silagens de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana de açúcar, seriam, respectivamente: FAS e FH, visto que são métodos de maior precisão e eficácia, baixo custo e de fácil execução de protocolo, otimizando a rotina laboratorial na determinação dessas duas variáveis de extrema importância na avaliação da qualidade da fermentação no silo.

Palavras-chave: Conservação de forragens. Fermentação. Procedimentos analíticos.

GENERAL ABSTRACT

The forage conservation by ensilage is a well-known process, widespread throughout the world. However, laboratory methods for evaluating silages present differences between research groups. In this context, procedures used to evaluate water soluble carbohydrates (WSC) and methods to determine ammonia nitrogen (N-NH₃) were compared with the objective of optimizing the analytical routine in forage conservation laboratories. The samples used were collected from different silos, constituting four classes of silages with different fermentation profiles: corn silage ($n = 20$), forage peanut silage ($n = 20$), elephant grass silage ($n = 20$) and sugarcane silage ($n = 20$). In the first experiment, the samples were submitted to WSC evaluation, using the following methods: phenol-sulfuric acid (PSA), anthrone and phenol with water extraction (PWE). In the second experiment, the samples were submitted to N-NH₃ determination, using the following methods: ammonia ion-selective electrode (ISE), phenol-hypochlorite (PH), doles® commercial kit and AOAC (Association of Official Analytical Chemists). The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Student t test at 10% of probability. The anthrone and PSA methods presented similar values ($P > 0.10$) for WSC in all the samples evaluated. However, the PSA method proved more practical and precise (mean coefficient of variation: MCV = 0.07%). This method also presented the lowest cost per sample for the determination of WSC in the evaluated silages, when compared to anthrone (R\$ 3.80 in the FAS e R\$ 5.16 in the anthrone). The PWE method overestimated ($P < 0.10$) the WSC values in the samples of forage peanut, elephant grass and sugarcane silages. However, there was no difference in the WSC values ($P > 0.10$) of corn silages. Therefore, for this silages class, the PWE method can be used in substitution for PSA, given that, for the PWE method, the extraction of WSC is done only in water, generating reagent economy (R\$ 0.47 less per sample in relation to PSA, which uses 80% ethanol extraction). Regarding the values for N-NH₃, the standard method was the PH method, given its practicality, precision (MCV = 1.58%) and economy (R\$ 0.05 per sample). The AOAC method presented values similar ($P > 0.10$) to the PH method, but was less practical, less precise (MCV = 5.85%) and with higher cost per sample (R\$ 2.46). The ISE method would be even more practical than PH, however, it overestimated ($P < 0.10$) the N-NH₃ values of the samples e proved to be expensive (R\$ 2.27 per sample). Thus, in the present study, it was verified that the methods most indicated to determine WSC and N-NH₃ in corn, forage peanut, elephant grass and sugarcane silage were respectively: PSA and PH methods, given that they present greater precision and efficacy, low cost, and have easier protocols execution, optimizing the laboratory routine for the determination of these two variables of extreme importance in the evaluation silo fermentation quality.

Keywords: Analytical procedures. Fermentation. Forage conservation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Classificação dos carboidratos das plantas. 26

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Tubos de Kjeldahl após extração das amostras utilizadas para mensuração de carboidratos solúveis em água. 51

Figura 2 - Filtragem das amostras após extração dos carboidratos solúveis em água. 51

Figura 3 - Curva de calibração feita a partir de solução de glicose utilizando fenol. 51

Figura 4 - Placa de acrílico utilizada para leitura com amostras resultantes da reação com fenol ácido sulfúrico. 52

Figura 5 - Curva de calibração feita a partir de glicose utilizando antrona. 53

Figura 6 - Placa de acrílico utilizada para leitura com amostras resultantes da reação de antrona. 53

Figura 7 - Extração de CSA, segundo Hall (2014). 54

Figura 8 - Conteúdo de CSA (%MS) de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos Antrona (DERIAZ, 1967) e FAS (DUBOIS et al., 1956). 58

Figura 9 - Conteúdo de CSA (%MS) de silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos FAS (DUBOIS et al., 1956) e FEA (HALL, 2014). 59

Figura 10 - Conteúdo de CSA (%MS) de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos Antrona (DERIAZ, 1961) e FEA (HALL, 2014). 59

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Aparelho Multiparâmetro (ORION STAR A 214) com eletrodo íon seletivo para amônia. 72

Figura 2 - Reação das amostras em meio com fenol-hipoclorito. 73

Figura 3 - Conteúdo de nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total (N-NH₃/NT em %MS) de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos FH (WEATHERBURN, 1967) e ISE (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983). 80

Figura 4 - Conteúdo de nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total (% N-NH ₃ /NT) com base na MS de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar, avaliadas pelos métodos FH (WEATHERBURN, 1967) e Kit comercial (doles).....	81
Figura 5 - Conteúdo de nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total (% N-NH ₃ /NT) com base na MS de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar, avaliadas pelos métodos FH (WEATHERBURN, 1967) e AOAC (1980).....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Breve descrição do princípio, vantagens e desvantagens dos principais métodos para determinação de Carboidratos Solúveis.	31
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Características químicas e perfil fermentativo das silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar.	50
Tabela 2 - Comparação dos valores de CSA (%MS) de silagens de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar, analisadas pelos métodos antrona, fenol ácido sulfúrico (FAS) e fenol com extração em água (FEA).	56
Tabela 3 - Coeficiente de variação (CV) entre as repetições das amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar avaliadas para teor de CSA nos métodos antrona, FAS (fenol-ácido sulfúrico) e fenol com extração em água (FEA).	57
Tabela 4 - Custo com reagentes por amostra das análises para determinar CSA pelos métodos FAS, antrona e FEA.	57

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Características químicas e perfil fermentativo das silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar.	71
Tabela 2 - Comparação dos valores de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH ₃ /NT em %MS) de silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar analisadas pelos métodos ISE (eletrodo íon seletivo), fenol-hipoclorito (FH), Kit comercial (doles) e AOAC (Association of Official Analytical Chemists).	78
Tabela 3 - Coeficiente de variação (CV) entre as repetições das amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar avaliadas para teor de N-NH ₃ nos métodos ISE (eletrodo íon seletivo), FH (fenol-hipoclorito), Kit comercial (doles Uréia 500) e AOAC (Association of Official Analytical Chemists).	79

Tabela 4 - Custo com reagentes por amostra das análises para determinar N-NH ₃ pelos métodos ISE (eletrodo íon seletivo) para amônia, FH (fenol-hipoclorito), kit comercial e AOAC.....	79
--	----

LISTA DE SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CSA	Carboidratos solúveis em água (water-soluble carbohydrates = WSC)
BAL	Bactérias ácido-láticas
CV	Coefficiente de variação
CVM	Coefficiente de variação médio (medium coefficient of variation = MCV)
ISE	Eletrodo íon seletivo
FAS	Fenol ácido sulfúrico (phenol-sulfuric acid= PSA)
FEA	Fenol com extração em água (phenol with water extraction = PWE)
FDA	Fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	Fibra insolúvel em detergente neutro
FH	Fenol hipoclorito (phenol-hypochlorite = PH)
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
NO ₃ ⁻	Nitrato
NT	Nitrogênio total
PB	Proteína bruta
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Ensilagem e perfil de fermentação de diferentes espécies forrageiras.....	19
2.2	Avaliação da fermentação em silagens.....	23
2.3	Métodos para determinar carboidratos solúveis em água em forragens.....	25
2.3.1	Método da Antrona (DERIAZ, 1961)	29
2.3.2	Método do Fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956)	29
2.3.3	Método do Fenol com extração em água (HALL, 2014).....	30
2.3.4	Descrição do princípio, vantagens e desvantagens das técnicas.....	31
2.4	Métodos para determinar nitrogênio amoniacal em silagens (N-NH₃).....	32
2.4.1	Método do fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967).....	35
2.4.2	Eletrodo íon seletivo (ISE).....	36
2.4.3	Método de destilação e titulação (AOAC, 1980).....	38
2.4.4	Método do Kit Comercial Ureia 500 (marca: doles®).....	38
	REFERÊNCIAS	39
	CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA EM SILAGENS.....	46
1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1	Local do experimento, obtenção e preparo das amostras	49
2.2	Método do fenol ácido sulfúrico (FAS; proposto por DUBOIS et al., 1956).....	50
2.3	Método da Antrona (DERIAZ, 1961)	52
2.4	Método do fenol com extração em água (FEA; proposto por Hall, 2014)	53
2.5	Cálculo do custo de reagentes por análise	54
2.6	Análises estatísticas.....	54
3	RESULTADOS	56
4	DISCUSSÃO.....	60
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIAICAL EM SILAGENS	66
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
2.1	Local do experimento, obtenção e preparo das amostras	70
2.2	Extração de nitrogênio amoniacal das silagens	71
2.3	Método eletrodo ISE de amônia proposto por Canale et al. (1983).....	71
2.4	Método do fenol-hipoclorito (FH, proposto por Weatherburn, 1967).....	72
2.4.1	Preparo dos reagentes e padrão	72
2.4.2	Procedimentos.....	73
2.4.3	Curva Padrão.....	73
2.4.4	Cálculos.....	74
2.5	Método do kit comercial ureia 500 (Método da urease modificada).....	74
2.5.1	Reagentes	74
2.5.2	Procedimentos.....	74
2.5.3	Cálculos.....	74
2.6	Método AOAC (1980).....	75

2.6.1	Reagentes	75
2.6.2	Procedimentos.....	75
2.7	Cálculo do custo de reagentes por análise	75
2.8	Análises estatísticas.....	76
3	RESULTADOS.....	78
4	DISCUSSÃO.....	83
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A produção de silagem baseia-se na conservação de forragens e/ou de grãos, mediante o uso da ensilagem. Esse processo ocorre a partir da fermentação láctica espontânea, que se instala em um ambiente anaeróbio, denominado de silo, em que os principais agentes fermentadores são as bactérias lácticas (BAL) que metabolizam os açúcares, prevalecendo a produção de ácido láctico (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Em suma, os principais fatores responsáveis pela preservação da massa são a manutenção da anaerobiose e a queda do pH (DRIEHUIS; ELFERINK; VAN WIKSELAAR, 1999; PAHLOW et al., 2003).

As silagens têm sido produzidas por séculos, mas apenas recentemente técnicas têm sido desenvolvidas para avaliar os efeitos da ensilagem sobre a qualidade da cultura e, conseqüentemente, sobre o desempenho animal (CHERNEY; CHERNEY, 2003). Segundo esses mesmos autores, o desenvolvimento de técnicas, para avaliar a qualidade da silagem está envolvido com diversos processos, incluindo: i) o desenvolvimento de melhores equipamentos para colheita e processamento, ii) o desenvolvimento de métodos e estruturas de estocagem, e iii) a constante mudança na dieta dos animais de criação para melhorar o potencial de produção.

Sendo assim, análises acuradas do processo de fermentação no silo e qualidade da silagem são essenciais para otimizar o uso de forragens ensiladas na alimentação animal, pois o conjunto de nutrientes existentes em cada cultura ou alimento interagem de forma particular, durante a ensilagem, resultando em uma qualidade de silagem diferente daquela apresentada pela forrageira fresca, antes de ser ensilada (CHERNEY; CHERNEY, 2003; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Nesse contexto, alguns parâmetros destacam-se como principais na determinação da qualidade da fermentação, dentre eles, os teores de carboidratos solúveis. Esses compostos serão metabolizados pelas bactérias lácticas, gerando produção de ácido láctico, responsável pela rápida queda do pH da massa ensilada e conservação da forragem. Portanto a concentração de carboidratos solúveis em água (CSA), os quais correspondem, principalmente, aos monossacarídeos glicose e frutose e ao oligossacarídeo sacarose, em plantas de clima tropical, é de fundamental importância para que o processo fermentativo em silagens se desenvolva de forma eficiente (BUXTON; O'KIELY, 2003; ROOKE; HATFIELD, 2003).

Além disso, os CSA também têm relevância durante a etapa de desabastecimento do silo e fornecimento da silagem aos animais, pois a sua concentração pode determinar o quanto os microrganismos deterioradores, tais como leveduras e fungos filamentosos são capazes de se desenvolver na massa na presença de oxigênio (PAHLOW et al., 2003).

Diferentes métodos para a análise de CSA têm sido propostos (CHERNEY; CHERNEY, 2003) e a quantificação por colorimetria é o mais utilizado. As técnicas mais conhecidas são o método da antrona (DERIAZ, 1961) e o método em que se utiliza o fenol (DUBOIS et al., 1956). Por outro lado, os métodos cromatográficos oferecem alta especificidade e sensibilidade à determinação de carboidratos de baixo peso molecular e são livres da interferência negativa de reagentes, entretanto apresentam custo mais elevado (BACH KNUDSEN, 1997; HALL, 2003, 2007).

Outra variável importante que serve de medida da qualidade fermentativa em silagens é a concentração de nitrogênio amoniacal em razão do nitrogênio total (N-NH₃) (CHERNEY; CHERNEY, 2003). A presença de amônia se torna um indicativo da atuação de bactérias do gênero *Clostridium*, principalmente, aquelas com atividade proteolítica, uma vez que esse composto é produzido em pequenas quantidades por outros gêneros que estejam presentes na massa (BAL; Enterobactérias) (PAHLOW et al., 2003).

As bactérias do gênero *Clostridium* são consideradas indesejáveis, pois competem com as BAL por substrato e causam perdas físicas e nutricionais. É por isso que, tradicionalmente, a determinação do nitrogênio amoniacal torna-se um importante parâmetro indireto que indica a presença desses microrganismos, apresentando-se como uma análise de grande relevância para aqueles que estudam forragens conservadas.

Dentre os métodos utilizados para determinar N-NH₃ em silagens, destacam-se: a) os métodos colorimétricos, tais como fenol-hipoclorito (FH) (WEATHERBURN, 1967); b) métodos enzimáticos (geralmente utilizados na forma de kit comercial, tais como Kit ureia 500 doles®); c) método da destilação seguida de titulação (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 1980); e d) método potenciométrico ISE (eletrodo íon seletivo) para amônia (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983).

Com base no exposto, a comunidade científica tem se empenhado em caracterizar silagens a partir de diferentes procedimentos analíticos, porém não existe um consenso entre os grupos de pesquisa sobre quais métodos são mais práticos, precisos e de menor custo, especialmente, na determinação de carboidratos solúveis em água e amônia em silagens, importantes parâmetros utilizados na avaliação da qualidade da silagem.

Sendo assim, no presente estudo, métodos laboratoriais para determinação de CSA e N-NH₃ foram avaliados com o objetivo de otimizar a rotina laboratorial na análise desses dois importantes parâmetros indicadores da qualidade de silagens. Para isso, foram utilizadas amostras de silagens com diferentes padrões de fermentação: milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar, permitindo aumentar o intervalo de trabalho dos métodos empregados. Segundo Currie (1999), esse intervalo corresponde à faixa de maior ao menor nível que o analito possa ser detectado de forma precisa e acurada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ensilagem e perfil de fermentação de diferentes espécies forrageiras

Ensilagem é uma forma de conservação de forragem que vem sendo utilizada há séculos (YANG et al., 2006). Entretanto, apesar de ser um processo antigo, o interesse pela técnica de conservação difundiu-se pela Europa apenas no século XIX, o que estimulou os pesquisadores a realizarem estudos mais aprofundados, ainda naquele período (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

É uma técnica que vai desde o corte da forragem, picagem, compactação e correta alocação da cultura no interior de uma estrutura denominada silo, na qual a vedação irá proporcionar a combinação entre um ambiente anaeróbico e um pH ácido, fundamental para evitar atividade microbiana indesejável, conservando a massa e obtendo o produto final, denominado de silagem (PAHLOW et al., 2003).

A combinação do ambiente anaeróbico com a acidez protege a forragem da proliferação de bactérias deterioradoras e fungos, em virtude da produção de ácido lático (FILYA, 2003; YANG et al., 2001). Em um processo natural, as bactérias do ácido lático fermentam os carboidratos solúveis em água (CSA) presentes na cultura, principalmente, a ácido lático, que reduz o pH por volta de 4 e acompanhando a fermentação dos CSA; outras atividades bioquímicas acontecem pelas enzimas das plantas e dos microrganismos (OHSHIMA; MCDONALD, 1978). Segundo esses mesmos autores, imediatamente após o corte, as enzimas das plantas ainda estão ativas e juntamente com o crescimento microbiano aeróbio, continuam até que se desenvolva um ambiente anaeróbico no silo e o pH da massa ensilada reduza, tornando-se ácido.

Merry, Lowes e Winters (1997) descrevem o processo de ensilagem como sendo composto por quatro fases: 1) a primeira é denominada de *fase aeróbica* e, em geral, tem duração de poucas horas. Quanto maior o teor de oxigênio residual, no interior do silo, maior será a respiração celular, aumentando, assim, o tempo em que as bactérias aeróbias estarão presentes no ambiente. Uma vez que o silo estará vedado, ocorre restrição à entrada de oxigênio e, em paralelo, o processo de respiração aeróbia das plantas juntamente com o da microbiota epífita aeróbia, que serão responsáveis por consumir o oxigênio presente; 2) conforme o oxigênio vai se tornando escasso, ou seja, quando há o esgotamento da maior parte do oxigênio presente, inicia-se a *fase de fermentação*, pois o ambiente encontra-se com concentração reduzida de oxigênio, cessando a respiração pela planta, inibindo o crescimento dos microrganismos aeróbios e criando condições favoráveis para as bactérias lácticas epífitas,

ou adicionadas como inoculante, produzirem ácido lático. Durante essa fase anaeróbica da ensilagem, as bactérias do ácido lático (BAL) baixam o pH pela conversão de carboidratos em ácidos orgânicos, principalmente, ácido lático (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Segundo Hammes e Hertel (2003), ocorre uma sucessão de gêneros das BAL na fermentação da silagem: no estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, sendo substituídas por *Leuconoctoc*, depois por *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas; 3) na fase de *estabilidade*, caso não ocorra a entrada de oxigênio no silo, o material ensilado não sofrerá mudanças significativas. Os baixos valores de pH fazem com que a atividade das bactérias anaeróbicas sejam reduzidas, entretanto alguns microrganismos ácido tolerantes podem sobreviver a esta fase em estado de inatividade ou na forma de esporos (tais como fungos filamentosos, e bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*) (ELFERINK; KROONEMAN; GOTTSCHAL, 2001); 4) a fase de deterioração aeróbia, ou fase de alimentação, inicia-se logo que o silo é aberto e o material ensilado fica exposto ao ar. A deterioração do material começa com a degradação dos ácidos orgânicos por leveduras e, ocasionalmente, por bactérias acéticas. A silagem, quando exposta ao ar atmosférico, pode sofrer aumento de temperatura e de pH, podendo, ainda, ocorrer perdas de carboidratos e dos produtos finais da fermentação, o que contribui para reduzir a qualidade da silagem e sua digestibilidade pelo animal (WOOLFORD, 1990). O último estágio desta fase inclui a atividade de outros microrganismos aeróbios deterioradores, como fungos filamentosos e enterobactérias (ELFERINK; KROONEMAN; GOTTSCHAL, 2001).

Assim, de acordo com o exposto, o processo de fermentação no silo envolve inúmeros processos bioquímicos, que podem afetar a qualidade do produto final, pois, durante a ensilagem, pode ocorrer redução do valor nutritivo pela respiração, fermentação aeróbia, processos de decomposição ou perdas por efluentes (VAN SOEST, 1994). Dessa forma, para que se possa intervir no processo, fornecendo condições para uma boa fermentação, é preciso que se conheça o perfil de fermentação da cultura a ser ensilada (ÁVILA et al., 2003).

O milho apresenta-se como uma das melhores opções para o processo de ensilagem, visto que possui elevado teor de carboidratos solúveis para fermentação, elevada produção de matéria seca por unidade de área, pequena capacidade tamponante e elevado valor nutritivo (ALLEN; COORS; ROTH, 2003; FERRARI JÚNIOR et al., 2005; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

No entanto, para se obter uma silagem de milho de boa qualidade, é necessário seguir adequadamente os procedimentos técnicos e os princípios já estabelecidos pelas pesquisas

científicas. E, dentre estes vários princípios, o teor de matéria seca ideal no momento da colheita faz toda a diferença na qualidade da silagem, sendo o ponto ideal de colheita da cultura de milho para a ensilagem um teor de matéria seca da planta toda entre 30 e 35%, ou seja, de cada 100 g da forragem 65 a 70 g é água e 30 a 35 g é matéria seca (NUSSIO; CAMPOS; DIAS, 2001). Entretanto, segundo Oliveira (2011), o valor nutritivo da silagem de milho, também, está relacionado com algumas características como a porcentagem de grãos presente na massa total colhida (característica relacionada com o valor nutricional do híbrido), o tipo de endosperma presente no grão e a qualidade da fibra.

Oliveira (2001) destaca que silagens de milho são consideradas de boa qualidade, quando possuem valores entre 6 e 8% de ácido lático na MS, enquanto McDonald (1981) considera necessária uma concentração superior a 3% na matéria seca. Com relação ao ácido butírico, ele deve estar sempre em pequena quantidade, porque sua presença revela intensa degradação de proteínas e sua concentração está relacionada à fermentação indesejável, produto, principalmente, do trabalho de bactérias do gênero *Clostridium* (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Segundo Silveira (1975), a concentração desse ácido na MS da silagem deve ser inferior a 0,2%. Ferreira (2001) preconiza, para silagens de milho e sorgo, concentração inferior a 0,1% na MS.

Com relação às leguminosas, elas geralmente apresentam maior concentração de proteína bruta, baixa concentração de carboidratos solúveis e alta capacidade tampão, que faz com que essas forrageiras sejam mais susceptíveis à proteólise no silo (CONTRERAS-GOVEA; ALBRECHT; MUCK, 2006). Segundo Paulino et al. (2009), o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) destaca-se dentre as leguminosas, pois apresenta uma boa produção de massa seca, um alto valor nutricional, persistência, habilidade para estabelecer e introduzir nitrogênio dentro do sistema planta-solo, excelente cobertura de solo, adaptação para solos com baixo pH e fertilidade média e a possibilidade de ser consorciado com vários capins em um sistema de integração em pastagens.

Além disso, o amendoim forrageiro pode ser usado para produção de silagem com resultados nutricionais satisfatórios, tais como o alto conteúdo de proteína (21,60 % PB) e baixo conteúdo de fibra (45,09% de FDN e 39,00% de FDA), contribuindo, geralmente, como aditivo para silagens com menor proteína bruta (PAULINO et al., 2009). Entretanto esses autores, também, destacam que relatos de leguminosas tropicais para o processo de ensilagem são escassos na literatura e eles evidenciam o alto teor de proteína bruta, o baixo conteúdo de carboidratos solúveis e a alta capacidade tampão, como restritivos à obtenção de silagens com boas características fermentativas e nutricionais. Sendo assim, de acordo com Evangelista,

Resende e Maciel (2003), ao ensilar leguminosas, não se podem esperar silagens com características fermentativas semelhantes às silagens de milho.

A silagem de capim vem surgindo como uma alternativa às culturas tradicionais, apresentando como principal vantagem as características de uma cultura perene, possibilidade de manutenção de elevadas taxas de lotação na propriedade e permitir grande flexibilidade em termos de manejo na tomada de decisões (WILKINS; SYRJÄLÄ-QVIST; BOLSEN, 1999). Todavia a conservação de gramíneas tropicais apresenta limitações como: maior concentração de componentes de parede celular e, conseqüentemente, menores teores de carboidratos fermentescíveis quando comparada às de clima temperado (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Nas gramíneas, os teores de carboidratos solúveis são influenciados pela espécie, cultivar, níveis de fertilização e estágio de crescimento, e plantas com maior idade fisiológica apresentam aumento na proporção de haste e, com isso, redução no teor de carboidratos solúveis (ÁVILA et al., 2003).

Segundo Woolford (1984), os teores mínimos de carboidratos solúveis indicados para uma boa fermentação devem estar na faixa de 8 a 10% na matéria seca. Bergamaschine et al. (1998) observaram uma concentração de 3,07% de CSA, em silagens de capim-tanzânia colhido aos 60 dias, entretanto, apesar de estar abaixo do recomendado, os autores afirmam que a silagem apresentava-se bem conservada.

Quanto ao teor de proteína bruta, Paulino et al. (2009) destacam que silagens de capins, em média, apresentam baixo teor proteico, entre 4,0 % a 7,0 %.

Segundo Rigueira et al. (2013), silagens de capim dos gêneros *Panicum* e *Brachiaria decumbens* têm constituído as duas principais forrageiras utilizadas em confinamentos no Brasil. Contudo ainda existem poucos estudos com silagens de capim, principalmente, no que diz respeito ao manejo de corte, pois, quando ensilados com um maior teor de matéria seca, reduz-se o risco de fermentações indesejáveis no silo, como, por exemplo, a clostridial, porém a silagem será de baixo valor nutritivo (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Em contrapartida, se o capim for ensilado com baixo teor de matéria seca, isto é, alto teor de umidade, acaba gerando um ambiente propício para o desenvolvimento dos clostrídios que, dentre outras atividades, irão exercer proteólise, produzindo principalmente amônia, dentre outros compostos nitrogenados, que geram perda de matéria seca e diminuem a qualidade da forragem conservada (WOOLFORD, 1984).

Por isso, vem sendo estudado o uso de aditivos ou de ingredientes, para reduzir a umidade no capim ensilado, proporcionando aumentar a matéria seca e utilizar capins com um

melhor valor nutritivo para produção de silagens. Schmidt, Souza e Bach (2014) afirmam que o uso de aditivos sequestrantes de umidade possibilita a ensilagem de plantas forrageiras cortadas com baixo teor de matéria seca, permitindo maior controle sobre as fermentações indesejáveis, que ocorrem em ambiente com alta umidade.

A cana-de-açúcar também tem destaque, pois é uma das principais forrageiras usadas na alimentação animal em regiões tropicais e subtropicais, e um dos fatores que proporciona utilizá-la na forma de silagem é o fato de essa cultura ser rica em carboidratos, favorecendo a fermentação natural no silo (CARVALHO et al., 2014). Essa característica, no entanto, também apresenta-se como umas das principais dificuldades durante a conservação da forragem, pois pode gerar alta perda de matéria seca (KUNG JUNIOR; STANLEY, 1982) causada, primeiramente, por leveduras (PEDROSO et al., 2005).

A atividade metabólica das bactérias do ácido lático inicia um papel fundamental, durante a fermentação da silagem e é responsável, principalmente, pela qualidade geral da silagem (ÁVILA et al., 2009; DUNIÈRE et al., 2013). Mas, em silagens de cana, a queda na concentração de carboidratos durante a ensilagem, ocorre rapidamente e aumenta a presença de etanol, composto indesejável nas silagens, pois indica o crescimento de leveduras e perdas de matéria seca (CARVALHO et al., 2014).

Embora as bactérias heterofermentativas também produzam etanol, as principais responsáveis pela presença desse composto na silagem de cana são as leveduras (PEDROSO et al., 2005), que, em seu processo metabólico, levam a perdas de, aproximadamente, 49% do substrato e contribuem para a deterioração aeróbia das silagens (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A cana-de-açúcar pode liberar até 90% de carboidratos solúveis em água, apresentam aumento de 44% de fibra em detergente ácido (FDA) e alcançam 15% de etanol na matéria seca durante a ensilagem (ALLI; BAKER; GARCIA, 1982; KUNG JUNIOR; STANLEY, 1982).

2.2 Avaliação da fermentação em silagens

O potencial de uma espécie forrageira para ensilagem é dependente do teor de umidade, teor de carboidratos solúveis e capacidade tampão no momento do corte (MCCULLOUGH, 1977; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Espécies e maturidade da cultura, assim como a presença de grãos, afetam a qualidade da silagem (CHERNEY; CHERNEY, 2003). O processo de fermentação é complexo e altera a quantidade de energia e proteína na cultura ensilada, geralmente reduzindo a quantidade e

qualidade deste alimento (PITT, 1990). Por isso, é muito importante a análise acurada da fermentação e da qualidade da silagem para otimizar o uso de forragens conservadas por esse método.

De acordo com Rigueira (2007), o termo qualidade da silagem geralmente não é usado para designar o seu valor nutritivo, mas, sim, a extensão pela qual o processo fermentativo no silo se desenvolveu. Portanto, falando mais especificamente sobre qualidade da fermentação no silo, três variáveis são as mais utilizadas para este fim, que são: pH, carboidratos solúveis em água (CSA) e nitrogênio amoniacal em função do nitrogênio total ($N-NH_3/NT$) (SANTOS et al., 2010). Esses autores destacam, ainda, que os valores de pH estão relacionados às concentrações de carboidratos solúveis na forragem a ser ensilada, as quais contribuem, para a produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido lático, que são importantes para obtenção de uma boa silagem.

Segundo Tomich et al. (2003), a acidez atua diminuindo a atividade proteolítica ocasionada por enzimas da própria planta e, ainda, controlando ou inibindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e também da própria atividade das bactérias produtoras de ácido lático. Além disso, a presença de nitrogênio amoniacal é uma característica importante na avaliação da silagem, pois contribui para a elevação do pH, sendo, por isso, indicativo de fermentação indesejável, visto que é uma medida indireta da atividade de clostrídeos proteolíticos na massa ensilada (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Em uma revisão sobre avanços metodológicos, na avaliação da qualidade das forragens conservadas, Jobim et al. (2007) destacam que há uma constante busca no desenvolvimento de métodos, especialmente nas pesquisas realizadas por pesquisadores brasileiros, ficando evidente o crescimento no uso de novos protocolos analíticos na avaliação de silagens, visando avaliar variáveis que eram consideradas de pouca relevância. Afirmam, também, que os recursos metodológicos disponíveis atualmente permitem não somente quantificar, mas também qualificar perdas ocorridas no processo de conservação, exposição aeróbia e oferta dos volumosos aos animais.

Sendo assim, na sequência, serão apresentados métodos comumente utilizados para determinar CSA e $N-NH_3$ em silagens.

2.3 Métodos para determinar carboidratos solúveis em água em forragens

Nas forrageiras, os carboidratos constituem cerca de 60 a 80% da matéria seca, sendo a principal fonte de energia para os seres vivos compreendidos nos primeiros níveis tróficos (FERNANDES et al., 2003). De acordo com Van Soest (1994), os carboidratos solúveis em água existentes nas forragens representam a parte mais rapidamente digestível dos carboidratos de armazenamento ou não estruturais das plantas, e os dois termos não são sinônimos, porque *armazenamento* inclui amidos que são geralmente solúveis em água fria e não podem ser removidos inteiramente com água quente; já o termo *carboidrato solúvel em água*, geralmente, relaciona-se com compostos solúveis em água fria ou em conteúdos gastrointestinais e incluem monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e alguns polissacarídeos.

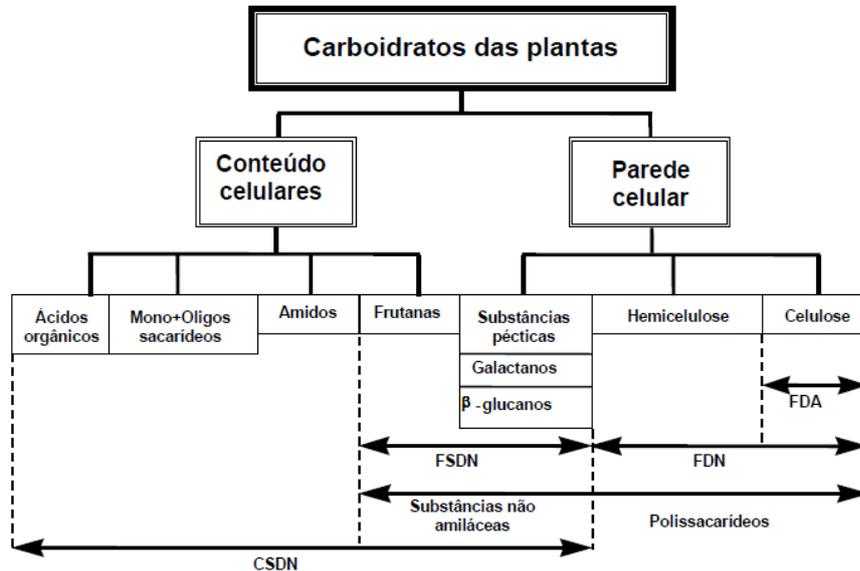
Van Soest (1994), também, afirma que a sacarose, principal açúcar da seiva vegetal, serve como veículo primário para o transporte de energia e, em algumas plantas, ocorre a conversão de sacarose em formas poliméricas de armazenamento. As gramíneas temperadas armazenam frutanas nas folhas e caules e amido nas sementes. Em contraste, as gramíneas tropicais e a maior parte das plantas de folhas largas armazenam apenas amido.

Embora não correspondam estritamente às mesmas frações químicas, em diversas publicações científicas, as unidades para designar a fração de carboidratos solúveis das forragens são, ainda, consideradas como sinônimos sem clara distinção, havendo confundimento entre carboidratos solúveis em água (CSA) e carboidratos não estruturais (CNE) (HALL, 2000).

Nas plantas forrageiras, a soma dos açúcares simples e a frutose representam a fração CSA, por outro lado, o amido é considerado como um polímero insolúvel sendo o principal carboidrato de reserva das leguminosas temperadas. Estas duas frações (CSA e amido) são classificadas como carboidratos não estruturais (CNE) e encontram-se associadas ao conteúdo celular (DE VISSER, 1993; CHESSON; MONRO, 1982).

Segundo Hall (2003), os CNE são aqueles carboidratos que podem ser digeridos pelas enzimas dos mamíferos e incluem ácidos orgânicos, açúcares e amido. A fração dos carboidratos não fibrosos (CNF), contudo é uma fração muito heterogênea e inclui qualquer carboidrato solúvel em detergente neutro, entre eles: 1) carboidratos associados ao conteúdo celular: açúcares, amido; 2) fibra solúvel em detergente neutro (FSDN): substâncias pécticas, fructosanas e beta glucanas além de ácidos orgânicos e compostos associados (FIGURA 1).

Figura 1 - Classificação dos carboidratos das plantas.



Fonte: Adaptado de Hall (2003).

Com exceção da cana-de-açúcar, as silagens provenientes de forragens de ciclo fotossintético C4, tais como o sorgo e milho, em geral, apresentam baixos teores de CSA quando comparadas com as forragens de clima temperado (ADESOGAN, 2009). De acordo com McCullough (1977), existe relação inversa entre o teor de açúcares solúveis e o conteúdo de matéria seca da forragem. Assim, plantas colhidas com teores de CSA acima de 80 g kg^{-1} e umidade próxima de 700 g kg^{-1} são ideais, para garantir uma adequada fermentação durante a ensilagem. Essa relação descrita por McCullough (1977) pode ser relevante no processo fermentativo em silagens de cana-de-açúcar pelo alto teor de açúcares da forragem fresca em relação à matéria seca original, favorecendo a presença de leveduras que contribuem às perdas de matéria seca (MS) e nutrientes durante a abertura do silo (SCHMIDT, 2009).

Conforme destacado anteriormente, o perfil de carboidratos pode diferir, consideravelmente, dependendo da cultura ensilada, o que sugere métodos específicos de preparo e extração da fração solúvel de acordo com as características das amostras. Além disso, os sistemas enzimáticos das plantas, logo após o corte e os microrganismos presentes na forragem, podem rapidamente modificar a concentração de carboidratos solúveis das amostras e, conseqüentemente, alterar os valores destes carboidratos em amostras de alimentos destinados para animais. Nesse contexto, a escolha dos diferentes métodos, para análise das frações de carboidratos solúveis, deve ser definida depois de respondidas as

seguintes perguntas: 1) qual a natureza da molécula ou fração química a quantificar? 2) o ensaio fornece uma medida acurada? 3) qual o propósito do ensaio? (Exemplo: fermentação da silagem); 4) são aceitáveis as medidas de variabilidade e acurácia obtidas com base no método escolhido? 5) o ensaio é robusto? (HALL, 2007).

Água destilada, tampões e soluções alcoólicas têm sido utilizados para a extração de carboidratos solúveis (CS) em amostras de forragens. Segundo o Sistema de Carboidratos Solúveis em Detergente Neutro (SCSDN), proposto na Universidade da Flórida (HALL, 2003), os procedimentos comuns na preparação de amostras para a extração de carboidratos de baixo peso molecular em extrato alcoólico, são: 1) secagem (determinação de matéria seca), 2) moagem, 3) extração com etanol 80%. Assim, os açúcares são medidos diretamente no extrato alcoólico e o amido no resíduo insolúvel e tanto os ácidos orgânicos e a fração de polissacarídeos não amido são quantificados por diferença gravimétrica. Nesse sentido, a determinação de carboidratos solúveis em extrato alcoólico (CSOH), determinado no SCSDN, implica que as amostras frescas precisam estar secas. Porém, durante a secagem, somente é desejável que aconteça a desidratação com o intuito de minimizar os outros processos que naturalmente contribuem à perda de qualidade da amostra (DEINUM; MAASSEN, 1994).

É importante, também, destacar que a solubilidade da proteína e outras interferências, presentes na fração solúvel das plantas, podem superestimar o teor de carboidratos solúveis, daí a importância da extração por meio do uso de soluções alcoólicas, as quais podem reduzir essas interferências (WISEMAN; MALLACK; JACOBSON, 1960), pois os mono e dissacarídeos são separados por sua solubilidade em álcool 80% (ASP, 1993).

De acordo com Hall (2000), alguns fatores podem influenciar na quantificação dos açúcares e contribuir nas variações destas medidas, como, por exemplo: 1) o fator de diluição da amostra; 2) o número de repetições; 3) as concentrações consideradas na construção da curva padrão; 4) a forma de aplicação dos reagentes; 5) as absorvâncias dos diferentes açúcares.

Os principais métodos utilizados para análise de Carboidratos Solúveis (CS) são:

a) os que se baseiam em colorimetria (reações coloridas), a partir de técnicas de condensação de produtos de degradação de açúcares em ácidos fortes com compostos orgânicos: **Método do Fenol-sulfúrico** (DUBOIS et al., 1956) e **Método da Antrona** (DERIAZ, 1961);

b) os que se baseiam nas propriedades redutoras do grupo carbonila: **Método dos Açúcares Redutores** (LEVER, 1973; SHAFER; SOMOGYI, 1933; WEINBACH; CALVIN, 1935).

c) **Métodos Cromatográficos** (Cromatografia em Papel, Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida).

Os métodos cromatográficos permitem que os carboidratos sejam separados e determinados individualmente. Essa separação pode basear-se em coeficiente de partição, polaridade e/ou tamanho (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Atualmente, dentre as técnicas cromatográficas para determinação de carboidratos, vem sendo muito utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE; ou do inglês HPLC).

Embora apresente custo mais elevado, os métodos cromatográficos apresentam inúmeras vantagens, quando comparados com os demais métodos de determinação de carboidratos solúveis, tais como a alta especificidade e sensibilidade na mensuração de carboidratos de baixo peso molecular e a não interferência negativa de reagentes (BACH KNUDSEN, 1997; HALL, 2003, 2007).

A cromatografia é aplicada na determinação de mono e oligossacarídeos de alimentos destinados aos humanos e aos animais e permite não apenas quantificar os carboidratos totais, mas também separar, identificar e quantificá-los individualmente. Contudo, para forragens, ainda existem poucos trabalhos publicados, com destaque para Hall (2014). Nesse estudo, a autora objetivou determinar qual das duas análises de determinação empírica comumente utilizadas seriam mais apropriadas para detecção de CSA, baseado na equivalência dos resultados de cromatografia líquida de alta performance iônica com detecção em pulso amperométrico (HPIC) mais análise de amido solúvel de extrato aquoso. As análises empíricas usadas foram: um ensaio de açúcar redutor (RSA) que usou como reagente base hidrazida ácida p-hidroxibenzoica com padrões 50:50 glicose:frutose e um ensaio de fenol-ácido sulfúrico (PSA) com padrões de sacarose. A autora verificou que este último foi o método que mais se aproximou dos valores encontrados em HPIC.

Na sequência, são apresentados os métodos utilizados neste estudo, para estimar e/ou determinar carboidratos solúveis em alimentos para animais.

A quantificação por colorimetria tem sido reconhecida como válida em estudos de qualidade das forragens e dos grãos durante muitos anos, sem ser modificada, consideravelmente, desde a década de cinquenta. As técnicas mais conhecidas são o método da antrona (DERIAZ, 1961) e o método em que se utiliza o fenol (DUBOIS et al., 1956).

Várias reações, no entanto, que produzem cor, são seletivas para determinados tipos de carboidratos, podendo as técnicas apresentarem variabilidade na acurácia quanto à especificidade na medição do açúcar padrão utilizado nas leituras, especialmente, na análise de soluções mistas de açúcares (FOURNIER, 2001). A quantidade de açúcar presente na

alíquota é determinada mediante comparação das leituras de absorvência das amostras de interesse em relação a uma curva de calibração estabelecida no espectrofotômetro e construída a partir de concentrações conhecidas do açúcar padrão.

2.3.1 Método da Antrona (DERIAZ, 1961)

A técnica descrita por Deriaz (1961) determina os carboidratos solúveis em água, por meio da espectrofotometria, realizada após a formação de um complexo azul esverdeado, gerado pelo aquecimento desses compostos em solução de antrona fortemente ácida. A reação de antrona se baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico concentrado sobre os carboidratos. Quando a reação é levada a efeito com carboidratos com ligações glicosídicas, estas são hidrolisadas e os açúcares simples desidratados para furfural ou hidroximetilfurfural. Estas substâncias se condensam com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno), dando um produto de coloração azul esverdeada, que é quantificado colorimetricamente a 620 - 630 nm. (VILLELA; BACILA; TASTALDI, 1973). Em suma, baseia-se na extração dos carboidratos solúveis e na determinação colorimétrica, comparando-a com uma curva obtida a partir do açúcar padrão utilizado.

Segundo Silva e Queiroz (2002), utilizando esse processo os carboidratos totais serão subestimados, uma vez que as ligações α -1,6 não são hidrolisadas durante a digestão, portanto o método, talvez, seja o mais adequado para gramíneas de clima temperado, em que as reservas são, principalmente, frutanas e menos para as de clima tropical, em que as reservas estão mais na forma de amido. Esses autores também destacam a função dos reagentes utilizados nesse método: na solução da antrona, o ácido sulfúrico concentrado tem a função de desidratar a glicose, formando hidroximetil-furfural, uma vez que a antrona só tem condições de se complexar com esta forma, para que haja desenvolvimento de cor. A tiourea, também presente na solução de antrona, catalisa essa reação, permitindo que o composto fenólico seja complexado com hidroximetil-furfural, tornando-o de coloração verde, para posterior leitura colorimétrica.

2.3.2 Método do Fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956)

O método do fenol-sulfúrico, proposto por Dubois et al. (1956), baseia-se na carbonização dos açúcares pelo ácido sulfúrico e posterior complexação dos produtos pelo fenol, formando compostos coloridos e bastante estáveis. A quantidade de açúcares que estarão presentes na amostra será responsável pela coloração final da solução, quanto maior a massa destes compostos, tanto mais intensa será a coloração obtida na solução final. É, por isso, um método usado para a determinação dos carboidratos totais.

Essa técnica dispensa hidrólise da amostra, uma vez que utiliza ácido sulfúrico concentrado; o limite de detecção é de 50 mg e, para obter a quantidade padrão, pode-se diluir 1:200 uma solução de glicose a 1g/100 mL armazenada a frio (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013). O sistema de reação compreende 1 ml de amostra ou de padrão e 1 ml de fenol, ao qual se adicionam, rapidamente, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Como a reação é exotérmica, resfriar à temperatura ambiente, antes de fazer a leitura da absorbância a 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

Nas reações de condensação de carboidratos, compostos fenólicos e ácidos fortes são utilizados na mensuração de carboidratos (HALL, 2003). Fenol reage com a maioria dos carboidratos, embora cada um forneça uma curva padrão diferente, e hexoses tem um comprimento de onda de absorbância máxima diferente do que pentoses ou ácidos urónicos (DUBOIS et al., 1956).

É importante destacar, também, que outras classes de carboidratos, como alguns polissacarídeos, podem ser determinadas, o que acaba se tornando uma desvantagem, pois este método pode superestimar a real concentração de CSA da amostra (HALL, 2007).

2.3.3 Método do Fenol com extração em água (HALL, 2014)

Hall (2014) comparou métodos empíricos de determinação de CSA: Método Fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e Método do açúcar redutor (AOAC, 2002) com HPIC (Cromatografia iônica com pulso amperométrico) em amostras de alimentos utilizados na alimentação de ruminantes.

Entretanto foi realizada uma extração diferente da prevista para o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Em vez de utilizar extração em álcool 80%, conforme previsto pelo método original, Hall (2014) utilizou extração em água, conforme seguinte protocolo: a extração foi realizada a partir 0,2 g de amostra seca e moída, pesada em tubos Kjeldahl, adicionaram-se 35 mL de água deionizada e levou-se para o banho maria a 40 °C por 1 hora. Depois a solução foi filtrada em papel filtro Whatman (nº 54) e o extrato foi congelado, em potes plásticos identificados, em duas duplicatas, realizadas em dias diferentes, totalizando quatro replicatas por amostra. Posteriormente, para determinação de CSA, foi utilizado o método do fenol ácido-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), descrito anteriormente.

A autora verificou que o protocolo proposto apresentou uma boa recuperação com valores de CSA semelhantes ao método HPIC. Dessa forma, indica o uso de extração em água, seguido de determinação dos CSA por meio do fenol-sulfúrico para alimentos utilizados na alimentação animal.

2.3.4 Descrição do princípio, vantagens e desvantagens das técnicas

Na Tabela 1 são apresentados uma breve descrição do princípio, vantagens e desvantagens dos métodos utilizados no presente estudo, para determinação de carboidratos solúveis em água.

Tabela 1 - Breve descrição do princípio, vantagens e desvantagens dos principais métodos para determinação de Carboidratos Solúveis.

(Continua)

Método	Princípio	Vantagens	Desvantagens	Referência
Antrona	Colorimetria (hidrólise com oxalato de amônio, reação com antrona e posterior medição de absorbância em espectrofotômetro).	<ul style="list-style-type: none"> - É específica para determinar açúcares. - Baixo custo. - É um método preciso. 	<ul style="list-style-type: none"> - É uma análise muito sensível. - Pode conter interferentes, que alteram a absorbância, afetando o resultado. - É uma análise muito laboriosa, tem várias etapas. - Não permite identificar e quantificar os carboidratos individualmente. 	Deriaz (1961).
Fenol com extração em etanol 80%	Colorimetria (reação com fenol e ácido sulfúrico e posterior medição de absorbância em espectrofotômetro).	<ul style="list-style-type: none"> - É específica para determinar açúcares. - Baixo custo. - É um método preciso. - Dispensa hidrólise da amostra, pois utiliza ácido sulfúrico concentrado, assim, a metodologia tem menos etapas, é menos laboriosa. 	<ul style="list-style-type: none"> - É uma análise muito sensível. - Pode conter interferentes, que alteram a absorbância, afetando o resultado. - O fenol é cancerígeno. - Não permite identificar e quantificar os carboidratos individualmente. 	Dubois et al. (1956).

Tabela 1 - Breve descrição do princípio, vantagens e desvantagens dos principais métodos para determinação de Carboidratos Solúveis.

(Conclusão)

Método	Princípio	Vantagens	Desvantagens	Referência
Fenol com extração em água	Colorimetria (reação com fenol e ácido sulfúrico e posterior medição de absorbância em espectrofotômetro).	<ul style="list-style-type: none"> - É específica para determinar açúcares. - Custo ainda menor que no método citado anteriormente, pois não utiliza etanol para extração. - Gera maior bem-estar ao laboratorista, visto que ele não vai inalar álcool proveniente da extração, quando se volatiliza durante o banho-maria. - Dispensa hidrólise da amostra, pois utiliza ácido sulfúrico concentrado, assim, a metodologia tem menos etapas, é menos laboriosa. 	<ul style="list-style-type: none"> - É uma análise muito sensível. - Pode conter interferentes, que alteram a absorbância, afetando o resultado. - O fenol é cancerígeno. - Não permite identificar e quantificar os carboidratos individualmente. 	Hall (2014).

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

2.4 Métodos para determinar nitrogênio amoniacal em silagens (N-NH₃)

Os compostos nitrogenados das plantas forrageiras têm muitas similaridades, todavia os constituintes de N de gramíneas temperadas, tropicais e leguminosas apresentam algumas diferenças. Em ordem crescente de concentração de proteína bruta em forrageiras, temos: leguminosas têm altas concentrações de proteína bruta (150-300 g Kg⁻¹ MS), seguidas das gramíneas temperadas (100-200 g Kg⁻¹ MS) e, por fim, encontram-se as gramíneas tropicais (60-150 g Kg⁻¹ MS); diferenças entre leguminosas e gramíneas temperadas são resultado das diferentes relações folha/haste; gramíneas tropicais inerentemente têm um baixo conteúdo de proteína solúvel em relação às gramíneas temperadas (ROOKE; RATFIELD, 2003).

De acordo com esses mesmos autores citados anteriormente, os fatores: espécie forrageira, uso de fertilizantes, estágio de crescimento botânico e condições climáticas podem

gerar extensa variação na quantidade e composição de aminoácidos livres e nitrato existentes na planta, podendo variar numa proporção de 3 a 20% do N total; e é importante ressaltar, também, que a quantidade de substrato disponível para fermentação no silo é determinada pelo estado da cultura no momento do corte e pela duração da fase aeróbica no campo. Portanto esses fatores de manejo aliados aos fatores intrínsecos às espécies apresentadas anteriormente afetarão os constituintes de N no silo e, conseqüentemente, o valor nutritivo da silagem.

Após o corte, as plantas ainda mantêm atividade metabólica, ocorrendo, principalmente, a contínua respiração aeróbia de açúcares para dióxido de carbono (CO_2) e água para fornecer energia às plantas e, também, ocorre a atividade proteolítica dos vegetais, em que as proteínas são hidrolisadas a aminoácidos e peptídeos (ROTZ; MUCK, 1994).

Nesse contexto, segundo Rooke e Ratfield (2003), focando apenas no metabolismo dos compostos nitrogenados no silo, essa fase inicial de ensilagem, chamada de fase aeróbia, é marcada por degradação de proteínas a partir de proteólises; já na fase anaeróbia, como resultado da continuada proteólise, quantidades substanciais de proteínas da forragem são convertidas para aminoácidos e peptídeos. Em silagens nas quais enterobactéria e clostrídio proliferam, aminoácidos são deaminados para NH_3 e descarboxilados para aminas. Por fim, na abertura do silo, microrganismos aeróbios promovem a deterioração aeróbia. Estes organismos metabolizam açúcares, ácido láctico e outros ácidos para CO_2 , água e calor. A utilização de aminoácidos nessa fase contribui para o aumento do pH da silagem, permitindo uma sucessão de desenvolvimento de outras espécies como fungos e bacilos. Proteína é catabolizada para NH_3 que também contribui para aumentar o pH.

Assim, a proteólise durante a ensilagem é inevitável e resulta em degradação de proteínas e, conseqüentemente, mudanças nos constituintes de nitrogênio (N) da forragem ensilada, que reduz o valor nutritivo de proteína bruta na cultura ensilada comparada com a forragem fresca. Rooke e Hatfield (2003) afirmam que a degradação de proteína pode ser considerada um processo de dois estágios: 1º ocorre a hidrólise da ligação peptídica (proteólise), que resulta na formação de aminoácidos livres e peptídeos; 2º aminoácidos são degradados para uma variedade de produtos finais, incluindo NH_3 , ácidos orgânicos e aminas. Os ácidos orgânicos são mais fermentados para produção de energia, enquanto NH_3 e aminas agem como tampão para a acidificação gerada pelos ácidos.

Conforme McDonald, Henderson e Heron (1991), o conteúdo de nitrogênio amoniacal expresso como proporção do N total pode ser um indicativo da atividade de proteólise realizada por clostrídeos. Entretanto, embora seja geralmente assumido que os clostrídeos

proteolíticos são responsáveis pela formação de amônia durante a ensilagem, em muitas silagens com alto conteúdo de amônia os clostrídios não foram encontrados (HENDERSON; MCDONALD, 1984; SEALE et al., 1986), comprovando que enterobactérias são também capazes de produzir grandes quantidades de amônia durante os estágios iniciais da ensilagem (HENDERSON, 1984).

De acordo com Beck (1978), enterobactérias têm fraca atividade proteolítica, mas podem deaminar e descarboxilar alguns aminoácidos, produzem NH_3 e ácido acético, além de reduzir nitrato a nitrito e, com isso, exercer uma atividade benéfica, que é a de controlar a população de clostrídios (BOUSSET-FATIANOFF et al., 1971; KRIEG; HOLT, 1984).

Van Os, Van Wikselaar e Spoelstra (1996) detectaram que consideráveis quantidades de aminas foram formadas em silagens bem preservadas, durante os primeiros dez dias de ensilagem, que não seriam atribuídas ao clostrídio, pois, conforme exposto anteriormente, enterobactérias que proliferam nos estágios iniciais de fermentação podem ser responsáveis por esta produção de amina.

Baseados na preferência por determinado substrato, os clostrídios podem ser divididos em 3 classes: os clostrídios sacarolíticos ou fermentadores de carboidratos, os clostrídios proteolíticos e o *C. perfringens* (que exerce as duas atividades). O clostrídio de maior importância é o proteolítico, que fermenta aminoácidos livres em excesso por meio de proteólise para uma série de produtos finais (ROOKE; RATFIELD, 2003).

Assim, o N-amoniaco indica a quantidade de proteína degradada durante a fase de fermentação, demonstrando as perdas de proteína verdadeira que ocorrem decorrentes das proteólises ocasionadas pelas enzimas proteolíticas dos microrganismos e, principalmente, das plantas na fase inicial de ensilagem, apresentando-se como um dos parâmetros determinantes da qualidade da fermentação (COAN et al., 2007; FIGURINA, 1991). Dessa forma, de acordo com Benachio (1965), quanto ao teor de nitrogênio amoniacal (em % do nitrogênio total), as silagens são classificadas em muito boa, quando os valores são inferiores a 10%; aceitável, quando se mantêm entre 10 e 15%; e insatisfatória, quando acima de 20%.

McDonald, Henderson e Heron (1991) e Woolford (1984) afirmaram que a proteólise se estende, durante a fermentação, quando não ocorrem condições ácidas suficientes para que os microrganismos indesejáveis sejam inibidos. No entanto o pH não deve ser utilizado como critério exclusivo na avaliação da fermentação, pois seu efeito inibidor de microrganismos depende da velocidade de declínio da concentração iônica e do teor de umidade do material ensilado.

Portanto, com vistas a preservar a fração proteica da forragem, a atividade das proteases da planta e dos microrganismos pode ser reduzida pelo abaixamento do pH e aumento do conteúdo de matéria seca. Contudo, para a efetiva preservação, ambos os processos devem ocorrer em poucas horas após a ensilagem.

Nesse sentido, é de suma importância a utilização de aditivos que propiciem condições favoráveis ao crescimento de bactérias homoláticas, ou seja, elevação do conteúdo de carboidratos solúveis, elevação do conteúdo de MS que restringe o desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium* e, assim, a conservação dos nutrientes da planta ensilada com alterações mínimas em suas características nutricionais (REIS; SILVA, 2011).

Na forragem fresca, 75 a 90% do N total estão na forma de proteína, constituindo, principalmente, peptídeos, aminoácidos livres, amidas, nucleotídeos e clorofila. Durante a ensilagem, uma proteólise extensiva determina que 40 a 60% deste nitrogênio sejam solubilizados em compostos nitrogenados não proteicos. A extensão da proteólise diminui com o aumento no conteúdo de MS da silagem e com a redução do pH. Rápidas taxas de redução de pH são particularmente importantes, quando se ensilam plantas com altos teores de proteína, como a alfafa, porque a atividade das enzimas proteolíticas é inibida quando o pH reduz de 4,5 a 4,0 (JASTER, 1995; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Por fim, diante do exposto, é essencial avaliar os teores de N-NH₃ em silagens, pois quanto maior a concentração desse composto nitrogenado mais lento será o processo de fermentação, afetando diretamente o sucesso da ensilagem. Sendo assim, na sequência, são apresentados os métodos mais utilizados na determinação dessa variável.

2.4.1 Método do fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967)

Dentre os métodos colorimétricos, merece destaque o ensaio de Weatherburn (1967), chamado também de método do fenol-hipoclorito (FH). Segundo o autor, o desenvolvimento da cor, para determinar o conteúdo de amônia em amostras, é descrito por Chaney e Marbach (1962), envolvendo uma simples técnica usando dois reagentes - nitroprussiato com fenol e hipoclorito com álcali.

Reagentes similares com outras combinações foram propostas, posteriormente, tais como alcali combinado com fenol, para formar fenato alcalino, nitroprussiato e hipoclorito como soluções separadas (FAWCETT; SCOTT, 1960 citados por WEATHERBURN, 1967), ou nitroprussiato e hipoclorito misturados, antes do uso (MACFARLANE, 1964 citado por WEATHERBURN, 1967), entretanto, esse mesmo autor destaca que essas visões são contraditórias no que diz respeito à sequência essencial dos reagentes e ao tempo da sua

adição e, também, em relação às variações de condições de temperatura e tempo descritas para o desenvolvimento do método.

Nesse contexto, Weatherburn testou tudo isso em seu trabalho publicado, em 1967 e, ao final, recomenda o seguinte procedimento: 1º preparar os reagentes: reagente A (fenol + nitroprussiato de sódio) e reagente B (hipoclorito alcalino); 2º preparar o padrão de sulfato de amônio para fazer a curva padrão; 3º em um tubo de ensaio, adicionar a amostra, seguida do reagente A e, depois do reagente B, agitar com um misturador mecânico; 4º levar ao banho-maria por 20 minutos; 5º e, por fim, ler absorvância em espectrofotômetro com comprimento de ondas de 625 nm. Proceder da mesma forma para fazer a curva padrão.

O ensaio do fenol-hipoclorito tem sido empregado para medir amônia, no sangue (MURAMATSU, 1967; WEATHERBURN, 1967), fluído ruminal (BRODERICK; KANG, 1980; KOZLOSKI; RIBEIRO FILHO; ROCHA, 2000) e amostras de silagem (NSEREKO et al., 1998). Kozloski et al. (2006), comparando métodos de determinação de amônia, verificaram que o ensaio do fenol-hipoclorito é o método mais prático e específico para análise de amônia em amostras de silagem.

2.4.2 Eletrodo íon seletivo (ISE)

A potenciometria é uma técnica bem conhecida dos químicos, sendo os eletrodos íon-seletivos (ISEs) somente uma pequena parte deste campo da eletroanalítica. Os modelos de interface eletrodo-solução foram inicialmente desenvolvidos para compreender os processos que ocorrem nas técnicas voltamétricas, em que o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho (FERNANDES; KUBOTA; OLIVEIRA NETO, 2001). Estes autores também destacam que, no início do surgimento dos eletrodos potenciométricos, a comunidade científica considerou que eles eram específicos, entretanto, com o passar do tempo, os pesquisadores começaram a descobrir que a especificidade dos sensores potenciométricos não era tão grande como se pensava e o termo seletivo foi consagrado, em substituição ao específico.

Nessa perspectiva, Byrne e Power (1974), utilizando o método de análise de amônia por meio do eletrodo para medir amônia em dejetos animais, afirmam que o eletrodo é específico para amônia e vinha sendo utilizado em análises de Kjeldahl em extratos de solos e amostras aquosas (BANWART, 1972 citado por BYRNE; POWER). Aguilera et al. (1997) e Canale, Ciotti e Valente (1983) destacam o uso do eletrodo para avaliar conteúdo de nitrogênio amoniacal em extratos de silagem. Entretanto, segundo Wisk e Siberg (1973), o equipamento é caro, deve ser usado com cuidado e as medidas podem incluir outros

metabólitos como aminas e cátions, superestimando, desta maneira, o conteúdo de amônia nas amostras.

O método é simples, rápido e preciso e fornece recuperação quantitativa de amônia adicionada, gerando resultados bem semelhantes ao método de destilação e titulação, mas, para que a determinação de amônia por este método seja efetiva, um álcali precisa ser adicionado à solução, para manter um pH entre 11-13, responsável por converter os íons amônio em amônia (BYRNE; POWER, 1974).

A teoria de operação do eletrodo é a seguinte: o eletrodo de amônia utiliza membrana hidrofóbica permeável a gás, a qual separa a solução interna (de enchimento), da solução a ser analisada. Amônia dissolvida difunde-se pela membrana até que sua pressão parcial seja a mesma nos dois lados da membrana. Em uma dada solução, a pressão parcial de amônia será proporcional à sua concentração. O gás amônia difunde-se por entre a membrana, dissolvendo-se na solução de enchimento, reagindo reversivelmente e, em pequena extensão, com água:



A relação entre amônia, íon amônio e íon hidróxido é dada pela seguinte equação:

$$\frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{\text{NH}_3}$$

A solução interna contém cloreto de amônio em um nível tal que sua concentração pode ser considerada constante. Então:

$$[\text{OH}^-] = [\text{NH}_3] \cdot \text{constante.}$$

Quando amônia é dissolvida em água, reage com íon hidrogênio para produzir íons amônio:



A quantidade relativa de amônia e amônio é determinada pelo valor de pH da solução. Em solução ácida, na qual os íons hidrogênio estão muito disponíveis, teoricamente, toda

amônia é convertida a íon amônio. A pH 9,3, cerca de metade de amônia dará origem ao íon amônio (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983; MANUAL..., 2016).

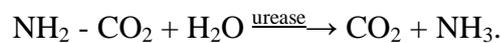
2.4.3 Método de destilação e titulação (AOAC, 1980)

Baseia-se na destilação da amostra na presença de óxido de magnésio e cloreto de cálcio, seguida de titulação com ácido clorídrico.

A destilação é realizada em tubos de Kjeldahl: ao ligar o aquecimento do aparelho destilador, conseqüentemente, aquece também a solução contendo a amostra, ocorrendo a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia. Por fim, o borato de amônia formado é dosado por titulação em bureta graduada com uma solução ácida (HCl) padronizada. Como a concentração de amônia em silagens, geralmente, é baixa, utiliza-se uma solução de ácido clorídrico menos concentrada (HCl 0,05 N).

2.4.4 Método do Kit Comercial Ureia 500 (marca: doles®)

Esse kit é um sistema enzimático para dosagem de ureia no soro, plasma e urina. A determinação enzimática da ureia ocorre de acordo com a seguinte reação:



Em meio alcalino, na presença de salicilato, nitruprussiato de sódio e hipoclorito, os íons amônio reagem dando origem a um composto cromógeno azul esverdeado. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração da ureia na amostra analisada (MANUAL..., 2017).

Entretanto, é possível adaptar o uso desse kit para determinar amônia, basta excluir a enzima urease do procedimento. Trata-se de um método rápido e prático, mas, por ser uma técnica adaptada para determinar amônia, ainda necessita de mais estudos para verificar sua repetibilidade e reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T. Challenges of tropical silage production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p. 139-154.
- AGUILERA, A. et al. Digestibility and fermentative characteristics of mango, lemon and corn stover silages with or without addition of molasses and urea. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 26, p. 87-91, 1997.
- ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. Corn silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silagem science and technology**. Madison: American Society Agronomy, 2003. p. 547-608.
- ALLI, I.; BAKER, B. E.; GARCIA, G. Studies on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 7, p. 411-417, 1982.
- ASP, N. G. Nutritional importance and classification of food carbohydrates. In: MEUSER, F.; MANNERS, D. J.; SEIBEL, W. (Ed.). **Plant polymeric carbohydrates**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 121-126.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 13th ed. Washington, 1980. 1015 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 19th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2002.
- ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar canesilage. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 6, p. 384-394, 2009.
- ÁVILA, C. L. S. et al. Perfil de fermentação das silagens de capim Tanzânia com Aditivos: teores de nitrogênio amoniacal e pH. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1144-1151, set./out. 2003.
- BACH KNUDSEN, K. E. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 67, p. 319-338, 1997.
- BECK, T. H. The microbiology of silage fermentation. In: MCCULLOUGH, M. E. (Ed.). **Fermentation of silage: a review**. Iowa: National Feed Ingredients Association, 1978. p. 61-115.
- BENACHIO, S. Niveles de melaza n silo experimental de milho crillo (*Sorghum vulgare*). **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 14, p. 291-297, 1965.
- BERGAMASCHINE, A. F. et al. Efeitos da adição de resíduo de milho e da cultura enzimbacteriana sobre a qualidade da silagem do capim tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 456-458.
- BOUSSET-FATIANOFF, N. et al. Recherche des nitrates dans les fourrages et les ensilages. **Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique**, Paris, v. 11, p. 715-723, 1971.

BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 64-75, 1980.

BUXTON, D. R.; O'KIELY, P. Preharvest plant factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 199-250.

BYRNE, E.; POWER, T. Determination of ammonium nitrogen in animal slurries by an ammonia electrode. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 5, p. 51-65, 1974.

CANALE, A.; CIOTTI, A.; VALENTE, M. E. **Metodi analitici per la valutazione della qualità di conservazione degli insilati**. Torino: Estratto da Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, 1983. 21 p.

CARVALHO, B. F. et al. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 195, p. 1-13, 2014.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 8, n. 2, p. 130-132, 1962.

CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R. Assessing silage quality. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Wisconsin: American Society of Agronomy, 2003. p. 141-198.

CHESSON, A.; MONRO, J. A. Legume pectic substances and their degradation in ovine rumen. **Journal of Science and Food Agriculture**, London, v. 33, n. 9, p. 852-859, Sept. 1982.

COAN, R. M. et al. Dinâmica fermentativa e microbiológica de silagens dos capins tanzânia e marandu acrescidas de polpa cítrica peletizada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 1502-1511, 2007. Suplemento.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006. 452 p.

CONTRERAS-GOVEA, F. E.; ALBRECHT, K. A.; MUCK, R. E. Spring yield and silage characteristics of kura clover, winter wheat, and in mixtures. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 781-787, 2006.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 127-134, 1999.

DE VISSER, H. Characterization of carbohydrates in concentrates for dairy cows. In: GARNSWORTHY, P. C.; COLE, D. J. A. (Ed.). **Recent advances in animal nutrition**. Loughborough: Nottingham University Press, 1993. p. 19-38.

- DEINUM, B.; MAASSEN, A. Effects of drying temperature on chemical composition and in vitro digestibility of forages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 46, p. 75-86, 1994.
- DERIAZ, R. E. Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 12, p. 152-160, 1961.
- DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. W. J. H. O.; VAN WIKSELAAR, P. G. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Swedish. **Proceedings...** Sweden: University of Agricultural Sciences, 1999. p. 264-265.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUNIÈRE, L. et al. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 182, n. 1/4, p. 1-15, June 2013.
- ELFERINK, S. J. W. H. O.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. C. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 125-132, Jan. 2001.
- EVANGELISTA, A. R.; RESENDE, P. M.; MACIEL, G. A. **Uso da soja (Glycine max (L.) Merrill) na forma de forragem**. Lavras: Ed. UFLA, 2003. 36 p. (Boletim de Extensão).
- FERNANDES, A. M. et al. Composição químico - bromatológica de cana-de-açúcar (*Saccharum spp L.*) com diferentes ciclos de produção (precoce e intermediário) em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 4, p. 977-985, 2003.
- FERNANDES, J. C. B. F.; KUBOTA, L. T.; OLIVEIRA NETO, G. Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão de conceitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 120-130, 2001.
- FERRARI JÚNIOR, E. et al. Características, composição química e qualidade de silagens de oito cultivares de milho. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 62, p. 19-27, 2005.
- FERREIRA, J. J. Estágio de maturação ideal para ensilagem do milho e do sorgo. In: CRUZ, J. C. et al. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2001. p. 405-428.
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 3575-3581, 2003.
- FOURNIER, E. Colorimetric quantification of carbohydrates mono and oligosaccharides: unit E1.1. In: _____. **Current protocols in food analytical chemistry**. Washington: J. Wiley, 2001. v. 1, p. 653-660.

- HALL, M. B. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 3226-3232, 2003.
- HALL, M. B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 359-367, 2007. Suplemento especial.
- HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 2000. 42 p. (Bulletin, 339).
- HALL, M. B. Selection of an empirical detection method for determination of water-soluble carbohydrates in feedstuffs for application in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 198, p. 28-37, Dec. 2014.
- HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes, and evolving electronic resource for the microbiological community**. New York: Springer-Verlag, 2003. p. 320-403.
- HENDERSON, A. R. Silage: biochemical and microbiological studies. **Edinburgh School of Agriculture Annual Report**, Edinburgh, p. 102-104, 1984.
- HENDERSON, A. R.; MCDONALD, P. The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies. **Research and Development in Agriculture**, Pretória, v. 1, p. 171-176, 1984.
- JASTER, E. H. Legume and grass silage preservation. In: MOORE, K. J.; KRAL, D. M.; VINEY, M. K. (Ed.). **Post-harvest physiology and preservation of forages**. Madison: American Society of Agronomy, 1995. p. 91-115.
- JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 101-119, 2007.
- KOZLOSKI, G. V. et al. Evaluation of two methods for ammonia extraction and analysis in silage samples. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 127, p. 336-342, 2006.
- KOZLOSKI, G. V.; RIBEIRO FILHO, H. M. N.; ROCHA, J. B. T. Effect of the substitution of urea for soybean meal on digestion in steers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 80, p. 713-719, 2000.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1984. v. 1.
- KUNG JUNIOR, L.; STANLEY, R. W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 54, p. 689-696, 1982.
- LEVER, M. Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. **Biochemical Medicine**, Orlando, v. 7, p. 274-281, 1973.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Brasília, DF: EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, 2013. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_85.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2017.

MANUAL do eletrodo ISE Orion Star A214®. Jundiaí: Hexis Científica®, 2016.

MANUAL do Kit comercial Ureia 500 doles®. Goiânia: Doles, 2017.

MCCULLOUGH, M. E. Silage and silage fermentation. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 49, n. 13, p. 49-52, 1977.

MCDONALD, P. **The biochemistry of silage**. Chichester: J. Wiley, 1981. 128 p.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. Washington: Scholium International, 1991. 155 p.

MERRY, R. J.; LOWES, K. F.; WINTERS, A. Current and future approaches to biocontrol in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 8., 1997, Brno. **Proceedings...** Brno, 1997. p. 17-27.

MURAMATSU, K. Direct colorimetric method for the determination of free ammonia in blood. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 31, p. 301-308, 1967.

NSEREKO, V. L. et al. Influence of protease inhibitors on nitrogen distribution in ensiled perennial ryegrass and the utilisation of silage nitrogen for growth by rumen bacteria in vitro. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 51-63, 1998.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: Ed. UEM, 2001. p. 127-145.

OHSHIMA, M.; MCDONALD, P. A review of changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 29, p. 497-505, 1978.

OLIVEIRA, J. S. **Híbridos de milho para silagem: as diferenças que fazem a diferença**. 2011. Disponível em: <<http://www.centraldapecuaria.com.br/artigos>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

OLIVEIRA, J. S. Manejo do silo e utilização da silagem de milho e sorgo. In: CRUZ, J. C. et al. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2001. p. 473-518.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

- PAULINO, V. T. et al. Silagem de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* cv. Belmonte) com diferentes aditivos. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 66, n. 1, p. 33-43, 2009.
- PEDROSO, A. F. et al. Fermentation and epiphytic microfloradynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 427-432, 2005.
- FIGURINA, G. Factores que afectan el valor nutritivo y la calidad de fermentacion de ensilajes. In: _____. **Pasturas y producción animal de áreas organaderia intensiva**. Montevideo: Instituto Nacional de Investigacion Agropecuária, 1991. p. 77-92. (Serie Tecnica, 15).
- PITT, R. E. **Silage and hay preservation**. Ithaca: NRAES-5, 1990.
- REIS, R. A.; SILVA, S. C. Consumo de forragens. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 83-114.
- RIGUEIRA, J. P. S. **Silagem de soja na alimentação de bovinos de corte**. 2007. 51 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- RIGUEIRA, J. P. S. et al. The chemical composition, fermentation profile, and microbial populations in tropical grass silages. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 42, n. 9, p. 612-621, 2013.
- ROOKE, J. A.; HATFIELD, R. D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 251-304.
- ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY JUNIOR, G. C. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: ASA, 1994. p. 828-868.
- SANTOS, R. D. et al. Características de fermentação de silagem de seis variedades de milho indicadas para a região semiárida brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1423-1429, 2010.
- SCHMIDT, P. Improved efficiency of sugar cane ensiling for ruminant supplementation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: FEALQ, 2009. p. 47-72.
- SCHMIDT, P.; SOUZA, C. M.; BACH, B. C. Uso estratégico de aditivos em silagens: quando e como usar? In: SIMPÓSIO PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014, Maringá. **Anais...** Maringá: Ed. UEM, 2014. p. 243-264.
- SEALE, D. R. et al. The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on the fermentation of lucerne silage in laboratory silos. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 61-70, 1986.
- SHAFER, P. A.; SOMOGYI, M. Copper-iodometric reagents for sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 100, p. 695-713, 1933.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2002. 235 p.

SILVEIRA, A. C. Técnicas para produção de silagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 2., 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1975. p. 156-185.

TOMICCH, T. R. et al. **Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação**. Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 2003. 20 p.

VAN OS, M.; VAN WIKSELAAR, P. G.; SPOELSTRA, S. F. Formation of biogenic amines in well fermented grass siages. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 127, p. 97-108, 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. São Paulo: Guanabara, 1973. 552 p.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 971-974, 1976.

WEINBACH, A. P.; CALVIN, D. B. The reducing powers of physiologically important carbohydrates. **Science**, New York, v. 81, p. 407-408, 1935.

WILKINS, R. J.; SYRJÄLÄ-QVIST, L.; BOLSEN, K. K. The future role of silage in sustainable animal production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999. p. 23-25.

WISEMAN, W. G. H.; MALLACK, J. C.; JACOBSON, W. C. Silage analysis, determination of sugar in silages and forages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 8, p. 78-80, 1960.

WISK, T. J.; SIEBERT, K. J. Determination of ammonia and brewery applications of specific ion electrodes. **American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v. 31, p. 26-30, 1973.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 101-116, 1990.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984. 350 p.

YANG, H. Y. et al. Effects of water-soluble carbohydrate content of silage fermentation of wheat straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, p. 232-237, 2006.
YANG, X. X. et al. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 78, p. 277-280, 2001.

CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA EM SILAGENS

RESUMO

O conteúdo de carboidratos solúveis em água (CSA) é essencial para produção de silagem, portanto necessita ser mensurado adequadamente. Entretanto, os métodos laboratoriais utilizados para determinar CSA em silagens, apresentam distinções entre os grupos de pesquisa, havendo o uso de diferentes protocolos para este fim. Nesse contexto, objetivou-se comparar os métodos fenol ácido sulfúrico (FAS), antrona e fenol com extração em água (FEA), na determinação de CSA de oitenta amostras, constituídas de quatro classes de silagens com diferentes perfis de fermentação: milho ($n = 20$), amendoim forrageiro ($n = 20$), capim elefante ($n = 20$) e cana-de-açúcar ($n = 20$), com o intuito de indicar o método mais prático, preciso e de menor custo, otimizando a rotina analítica em laboratórios de conservação de forragens. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t Student a 10% de probabilidade. Os métodos antrona e FAS apresentaram valores semelhantes ($P > 0,10$) de CSA em todas as amostras avaliadas. Todavia o método FAS mostrou-se mais prático e preciso (coeficiente de variação médio: CVM = 0,07%). Este também apresentou menor custo por amostra na determinação dos CSA de silagens de amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar em relação ao método da antrona (R\$ 3,80 no FAS e R\$ 5,16 na antrona). O método FEA superestimou ($P < 0,10$) os valores de CSA nas amostras de silagem de amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar. Mas não houve diferença nos valores de CSA ($P > 0,10$) das silagens de milho. Portanto, para esta classe de silagem, o método FEA pode ser utilizado em substituição ao FAS, pois, no método FEA, a extração dos CSA é realizada apenas em água, gerando economia de reagente (menos R\$ 0,47 por amostra em relação ao FAS, que utiliza extração em etanol 80%). Sendo assim, no presente estudo, verificou-se que o método mais indicado para determinar CSA em silagens seria o método FAS, que apresentou maior precisão e eficácia, aliadas a um baixo custo de análise por amostra e fácil execução de protocolo, otimizando a rotina laboratorial na determinação dessa variável de extrema importância na avaliação da qualidade da fermentação no silo.

Palavras-chave: Açúcares. Forragem conservada. Procedimentos analíticos.

ABSTRACT

The content of water-soluble carbohydrates (WSC) is essential for silage production, therefore, it must be adequately measured. However, the laboratory methods used to determine WSC in silages present distinctions among research groups, with the use of different protocols for this purpose. In this context, the objective with this study was to compare the phenol sulfuric acid (PSA), anthrone and phenol with water extraction (PWE) methods for determining the WSC of eighty samples, constituted of four classes of silage with different fermentation profiles: corn ($n = 20$), forage peanut ($n = 20$), elephant grass ($n = 20$) and sugarcane ($n = 20$) silages, to indicate the most practical, precise and least expensive method, optimizing the analytical routine in forage conservation laboratories. The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by Student t test at 10% probability. The anthrone and PSA methods presented similar values ($P > 0.10$) of WSC in all evaluated samples. However, PSA method was more practical and precise (mean coefficient of variation: $MCV = 0.07\%$). It also presented lower cost per sample in the determination of WSC of forage peanut, elephant grass and sugarcane silages in relation to the anthrone method (R\$ 3.80 in PSA and R\$ 5.16 in antrona). The PWE method overestimated ($P < 0.10$) WSC values in the samples of forage peanut, elephant grass and sugarcane silages. However, there was no difference in WSC values ($P > 0.10$) of corn silages. Therefore, for this class of silage, the PWE method can be used in substitution of the PSA method. For the PWE method, WSC extraction is done only in water, generating savings on reagents (R\$ 0.47 less per sample when compared to PSA, which uses 80% ethanol extraction). Thus, in the present study, it was verified that the most indicated method to determine WSC in silages would be the PSA method, since it presented greater precision and efficacy, allied to low analysis cost per sample and easy protocol execution, optimizing the laboratory routine for determining this extremely important variable in the evaluation of the fermentation quality in silo.

Keywords: Analytical procedures. Conserved forage. Sugars.

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de ensilagem, a concentração de carboidratos solúveis em água (CSA) é fator essencial, para o desenvolvimento das bactérias lácticas, responsáveis pela queda de pH da massa ensilada e conservação da forragem. O interesse por determinar esses compostos tem aumentado bastante, com o intuito de melhorar as características fermentativas e, conseqüentemente, o valor nutritivo da silagem a ser ofertada para os ruminantes. Entretanto, ainda não existe padronização quanto ao uso dos métodos, de forma que cada grupo de pesquisa e/ou laboratório utiliza ensaios diferentes para determinar os CSA das silagens.

Alguns utilizam métodos colorimétricos, tais como antrona (DERIAZ, 1961) e fenol ácido-sulfúrico (FAS) (DUBOIS et al., 1956), outros utilizam o método dos açúcares redutores (LEVER, 1973; SHAFER; SOMOGYI, 1933; WEINBACH; CALVIN, 1935) e, mais recentemente também, vem sendo utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (HALL, 2014).

A HPLC é mais precisa e permite quantificar e qualificar cada açúcar individualmente, fato que nos outros métodos não é possível. Equipamentos e reagentes, porém são de custo mais elevado e, para manuseá-los, há a necessidade de mão de obra qualificada, enquanto os demais métodos, principalmente os colorimétricos, são de baixo custo e mais práticos de serem executados.

Hall (2014) destaca que também não há um consenso quanto à forma de extração dos carboidratos, etapa que antecede a detecção (podendo ser em etanol 80% ou em água destilada). Segundo essa mesma pesquisadora, o método FAS adaptado com uma prévia extração em água (em vez de etanol 80%, conforme propõe o método original) gera valores que se assemelham aos encontrados por meio de HPLC, apresentando-se como um excelente método para análise de CSA em alimentos para animais.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o método FAS posterior à extração em etanol 80% (DUBOIS et al., 1956) ou em água, FEA (extração proposta por Hall (2014), frente ao método da antrona (DERIAZ, 1961), com o intuito de indicar o protocolo analítico mais preciso, prático, e de menor custo para determinar CSA em silagens, otimizando a rotina laboratorial. E, fundamentando-se na teoria de melhorar o limite de detecção do analito e aumentar o intervalo de trabalho dos métodos que foram empregados, proporcionando melhor precisão (CURRIE, 1999), foram utilizadas silagens com quatro padrões de fermentação (milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de açúcar).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento, obtenção e preparo das amostras

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios dos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Oitenta amostras, provenientes de silagens de milho planta inteira ($n = 20$), amendoim forrageiro ($n = 20$), capim-elefante ($n = 20$) e cana-de-acúcar ($n = 20$), obtidas de diferentes silos e submetidas a diferentes manejos (tais como: diferentes épocas de corte, uso de aditivos benzoato, sorbato, cal virgem para cana, dentre outros), foram utilizadas no estudo.

Amostras contendo cerca de 4 Kg foram homogeneizadas e divididas em duas porções. A primeira porção foi congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e destinada, posteriormente, às determinações de pH (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983), nitrogênio amoniacal (WEATHERBURN, 1967), ácidos orgânicos (lático, acético, butírico e propiônico) e etanol (ÁVILA et al., 2009).

A segunda porção foi seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e depois moída em moinho tipo Willey com malha de 1 mm e, por fim, foi destinada à determinação da concentração de matéria seca (MS) e nitrogênio total (NT) (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1995) e carboidratos solúveis em água (conforme técnicas descritas posteriormente). Os valores de proteína bruta (PB) foram obtidos a partir do seguinte cálculo ($\text{PB} = \text{NT} \times 6,25$).

As análises de MS, N total, N-NH_3 , pH, ácidos orgânicos e etanol foram realizadas em duplicata, com o objetivo de caracterizar as amostras e são apresentadas na Tabela 1.

As análises de carboidratos solúveis em água foram realizadas com o objetivo de comparar os métodos avaliados, portanto cada amostra foi analisada em quatro repetições, sendo duas replicatas em dois dias diferentes.

Tabela 1 - Características químicas e perfil fermentativo das silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar.

Variáveis	Silagens			
	Milho	Amendoim	Capim	Cana-de-açúcar
MS (%)	35,45±4,3	30,62±21,2	21,97±3,0	28,36±3,1
PB (%MS)	5,94±0,7	15,09±0,9	7,27±2,3	3,40±0,9
pH	3,97±0,2	5,61±0,7	4,27±0,4	3,68±0,2
N-NH ₃ / NT (%MS)	4,98±1,1	11,60±5,2	8,61±8,1	4,50±1,6
Ácido láctico (%MS)	4,97±2,2	0,60±0,3	6,06±4,0	6,75±0,4
Ácido acético (%MS)	1,64±0,6	2,81±1,2	0,70±0,4	0,70±0,3
Ácido propiônico (%MS)	0,18±0,1	0,47±0,3	0,13±0,1	0,07±0,1
Ácido butírico (%MS)	0,20±0,2	0,00	0,00	0,00
Etanol (%MS)	1,85±0,9	2,89±1,0	3,45±0,4	3,60±1,1

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

*MS - matéria seca; PB - proteína bruta; N-NH₃ - nitrogênio amoniacal.

2.2 Método do fenol ácido sulfúrico (FAS; proposto por DUBOIS et al., 1956)

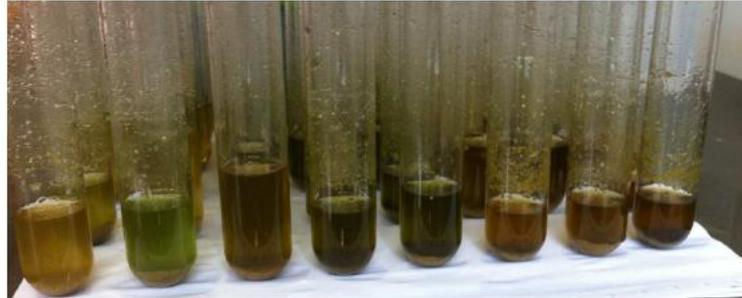
Foi realizada uma extração etanólica em tubos de digestão Kjeldahl. Em cada tubo foi adicionada uma alíquota de 0,1 g de amostra pré-seca, previamente triturada em peneira com crivos de 1 mm. Em seguida, foram adicionados 30 mL de etanol (80% v/v) e mantidos em banho de água em ebulição por 30 minutos (FIGURA 1). O extrato foi filtrado em papel filtro Whatman (nº 54) e o volume corrigido para 30 mL com a adição de água destilada (FIGURA 2).

Para reação colorimétrica, foram utilizados 0,5 mL do extrato, 0,5 mL de fenol (5% m/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Em paralelo, seguindo os mesmos procedimentos utilizados para as amostras, preparou-se o branco e, também, duas curvas de calibração: a primeira com padrão de glicose (FIGURA 3), utilizada para as silagens de milho, amendoim forrageiro e capim e a segunda com padrão de sacarose foi utilizada para cana-de-açúcar. Os padrões foram preparados em solução de ácido benzoico 0,2%, para preservação dos açúcares (HALL, 2014).

Os CSA foram quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 490 nm (FIGURA 4) utilizando um leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). A concentração de carboidratos foi mensurada por comparação com as concentrações conhecidas estabelecidas nas respectivas curvas de calibração. Para isso, foi preparada uma solução padrão de glicose 0,1 mg/mL com as seguintes concentrações em cada ponto de curva de calibração (em mg/mL): P1 = 0,01; P2 = 0,02; P3 = 0,03; P4 = 0,04; P5 = 0,05; P6 = 0,06; P7 = 0,07; P8 = 0,08; P9 = 0,09; P10 = 0,10.

Procedeu-se da mesma forma na curva de calibração, para as silagens de cana-de-açúcar, em que a solução padrão utilizada foi sacarose 0,1 mg/mL.

Figura 1 - Tubos de Kjeldahl após extração das amostras utilizadas para mensuração de carboidratos solúveis em água.



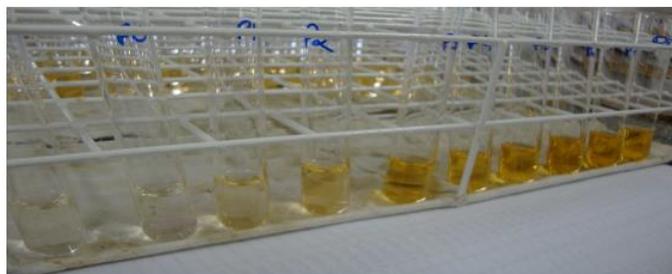
Fonte: Da autora (2017).

Figura 2 - Filtragem das amostras após extração dos carboidratos solúveis em água.



Fonte: Da autora (2017).

Figura 3 - Curva de calibração feita a partir de solução de glicose utilizando fenol.



Fonte: Da autora (2017).

Figura 4 - Placa de acrílico utilizada para leitura com amostras resultantes da reação com fenol ácido sulfúrico.



Fonte: Da autora (2017).

2.3 Método da Antrona (DERIAZ, 1961)

Para determinação de CSA por meio do ensaio de Deriaz (1961), foi realizada uma extração etanólica em erlenmeyer, utilizando 1 g de amostra seca, previamente triturada em peneira com crivos de 1 mm, com adição de 100 mL de etanol (80% v/v) por 1 hora em banho de água em ebulição.

Após repouso de 15 horas, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman (nº 54) e adicionados 60 mL de álcool 95%, levado a uma chapa aquecedora até reduzir o volume para 5 mL, o qual foi diluído em 50 mL de água deionizada.

No momento da determinação, foram adicionados em tubos de ensaio, 2 mL de solução de antrona e 1 mL do extrato da silagem que foram mantidos em banho de água em ebulição durante 10 minutos.

Em paralelo, seguindo os mesmos procedimentos utilizados para as amostras, preparou-se o branco e, também, duas curvas de calibração: a primeira com padrão de glicose (FIGURA 5), utilizada para as silagens de milho, amendoim forrageiro e capim, e a segunda com padrão de sacarose foi utilizada para cana-de-açúcar. Os padrões foram preparados em solução de ácido benzoico 0,2%, para preservação dos açúcares (HALL, 2014).

Por fim, os carboidratos solúveis em água foram quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620 nm (FIGURA 6), utilizando um leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland).

A concentração de carboidratos foi mensurada por comparação com as concentrações conhecidas estabelecidas na curva de calibração. Para isso, foi preparada uma solução padrão de glicose 0,1 mg/mL com as seguintes concentrações em cada ponto de curva de calibração

(em mg/mL): P1 = 0,01; P2 = 0,02; P3 = 0,03; P4 = 0,04; P5 = 0,05; P6 = 0,06; P7 = 0,07; P8 = 0,08; P9 = 0,09; P10 = 0,10.

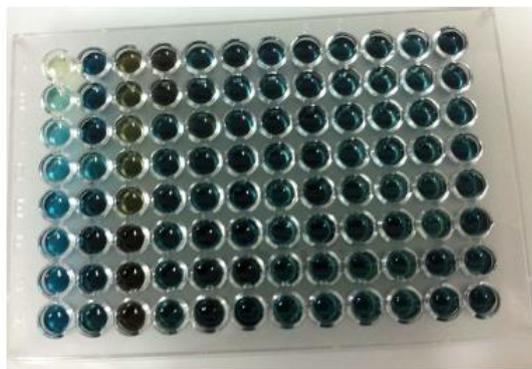
Procedeu-se da mesma forma na curva de calibração, para as silagens de cana-de-açúcar, em que a solução padrão utilizada foi sacarose 0,1 mg/mL.

Figura 5 - Curva de calibração feita a partir de glicose utilizando antrona.



Fonte: Da autora (2017).

Figura 6 - Placa de acrílico utilizada para leitura com amostras resultantes da reação de antrona.



Fonte: Da autora (2017).

2.4 Método do fenol com extração em água (FEA; proposto por Hall, 2014)

A extração foi realizada, a partir de 0,2 g da amostra seca e moída, pesada em tubo de ensaio, adicionaram-se 35 mL de água deionizada e levado para o banho maria a 40 °C por 1 hora (FIGURA 7). Depois, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman (nº 54) e o extrato congelado, em potes plásticos identificados, em duas duplicatas, realizadas em dias diferentes, totalizando quatro replicatas de cada amostra. Posteriormente, para determinação dos CSA, foi utilizado o método do fenol ácido-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), conforme Item 2.2.

Figura 7 - Extração de CSA, segundo Hall (2014).



Fonte: Da autora (2017).

2.5 Cálculo do custo de reagentes por análise

Para calcular os custos com reagentes inerentes a cada protocolo analítico, primeiramente foi verificado o custo médio de cada reagente. Posteriormente, a partir da quantidade utilizada de cada reagente dentro de cada método, para analisar uma única amostra, calculou-se o custo proporcional de cada reagente. Ao final, eles foram somados em cada método, indicando o custo de reagentes por análise em cada amostra.

2.6 Análises estatísticas

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial com quatro culturas (silagem de milho, silagem de amendoim forrageiro, silagem capim elefante, silagem de cana-de-açúcar), submetidas a três métodos de determinação de CSA (Antrona, FAS, FEA), com 20 repetições em cada tipo de amostra e quatro replicatas de cada amostra por método. Foi escolhida a matriz de covariância utilizando o critério de informação Akaike do SAS baseado em Wolfinger (1993). As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste t Student, a 10% de probabilidade, utilizando procedimento PROC MIXED do software estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2002). O modelo estatístico utilizado para análise dos dados foi:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} = valor observado de CSA referente à k-ésima repetição da combinação do i-ésimo nível do tipo de cultura (silagem de milho, silagem de amendoim forrageiro, silagem de capim elefante, silagem de cana-de-açúcar) com o j-ésimo nível de método (Antrona, FAS, FEA).

μ = constante geral (média da população).

α_i = efeito do i-ésimo nível de cultura (silagem de milho, silagem de amendoim forrageiro, silagem de capim elefante, silagem de cana de açúcar) no valor observado Y_{ijk} .

β_j = j-ésimo nível de método (Antrona, FAS, FEA) no valor observado Y_{ijk} .

$\alpha\beta_{ij}$ = efeito da interação do i-ésimo nível do fator cultura como i-jésimo nível do fator método.

e_{ij} = erro associado a observação Y_{ijk} .

Para verificar a relação entre os métodos e, conseqüentemente, a possibilidade de um substituir o outro, foram realizadas estimativas de modelos identidade (TEDESCHI, 2006), comparando os métodos dois a dois. Os modelos consistem em uma equação de primeiro grau do tipo $Y = \beta_0 + \beta_1x$ com as seguintes hipóteses: $H_0: \beta_0 = 0$ e $H_0: \beta_1 = 1$. Neste caso, as análises foram realizadas pelo PROC REG no SAS (2002).

A fim de verificar repetibilidade das amostras e, também, a amplitude dos valores obtidos dentro de cada classe de silagem, foi utilizado o programa Microsoft Excel (2010), para calcular as funções: desvio padrão da média (DP), valores mínimo e máximo e coeficiente de variação (%CV). Foi calculado também o coeficiente de variação médio (%CVM), que é a média dos coeficientes de variação de cada classe de silagem quando submetidos a determinado método.

3 RESULTADOS

Na Tabela 2, é possível verificar a comparação entre os métodos utilizados para determinar carboidratos solúveis em água nas silagens das diferentes culturas avaliadas. Houve interação cultura X método ($P = 0,0003$), ou seja, os valores de CSA das culturas foram afetados pelo método utilizado, com exceção para silagem de milho, pois não houve diferença significativa ($P > 0,10$) do teor de CSA dessas silagens nos diferentes métodos avaliados.

Entretanto, para as silagens de amendoim e cana, os valores de CSA obtidos nos métodos antrona e FAS foram significativamente semelhantes ($P > 0,10$), mas, em média, de duas a três vezes menores do que no método FEA.

Nas silagens de capim, em cada método foi verificado um valor diferente de CSA ($P < 0,10$), sendo o maior quando se utilizou o método FEA e o menor quando se utilizou o método FAS.

Tabela 2 - Comparação dos valores de CSA (%MS) de silagens de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar, analisadas pelos métodos antrona, fenol ácido sulfúrico (FAS) e fenol com extração em água (FEA).

Silagens	Métodos			EPM ⁽¹⁾	Valor de P		
	Antrona	FAS	FEA		MET ⁽²⁾	CUL ⁽³⁾	MET*CUL
Silagem de milho	2,30a (1,54-7,18)	1,96a (1,20-7,16)	2,05a (1,17-7,05)	0,1968	<0,0001	<0,0001	0,0003
Silagem de amendoim	0,50b (0,24-0,61)	0,45b (0,26-0,98)	1,41a (1,04-2,13)				
Silagem de capim	0,88ab (0,41-1,69)	0,67b (0,05-1,19)	1,23a (0,62-2,60)				
Silagem de Cana	5,63b (2,64-8,64)	5,91b (3,05-10,06)	6,98a (2,47-19,44)				

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

⁽¹⁾ EPM - Erro padrão da média. ⁽²⁾ MET - método; ⁽³⁾ CUL - cultura.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,10$).

Valores entre parênteses abaixo das médias indicam os valores mínimo e máximo de CSA de cada classe de silagem avaliada.

Os coeficientes de variação (CVM) são apresentados na Tabela 3. Os maiores CV entre as quatro replicatas de cada amostra foram verificados pelo método FEA: 0,23%; 0,13%; 0,29%; 0,15%, respectivamente para silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana. Enquanto pelos métodos antrona e FAS, os coeficientes de variação apresentaram

valores entre 0,07 e 0,17%, sendo este maior valor de CV obtido entre as amostras de capim elefante no método antrona.

Tabela 3 - Coeficiente de variação (CV) entre as repetições das amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar avaliadas para teor de CSA nos métodos antrona, FAS (fenol-ácido sulfúrico) e fenol com extração em água (FEA).

Tipo de silagem	n	Antrona	FAS	FEA
Milho planta inteira	20	0,07	0,08	0,23
Amendoim forrageiro	20	0,11	0,07	0,13
Capim-elefante	20	0,17	0,07	0,29
Cana-de-açúcar	20	0,07	0,07	0,15
CVM	80	0,10	0,07	0,20

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

n = número de amostras (repetições). CVM = coeficiente de variação médio.

Na Tabela 4, são apresentados os custos com reagentes por amostra utilizados na determinação de CSA pelos métodos FAS, antrona e FEA. Verificou-se que o método mais econômico foi FEA, seguido de FAS e antrona. Este último apresentou custos em torno de 64,5% e 73,6% maiores, respectivamente, em relação aos métodos FEA e FAS.

Tabela 4 - Custo com reagentes por amostra das análises para determinar CSA pelos métodos FAS, antrona e FEA.

Método	Custo com análise por amostra (R\$)*
FAZ	3,80
Antrona	5,16
FEA	3,33

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

* Foi levado em consideração apenas o custo com reagentes para análise de cada amostra.

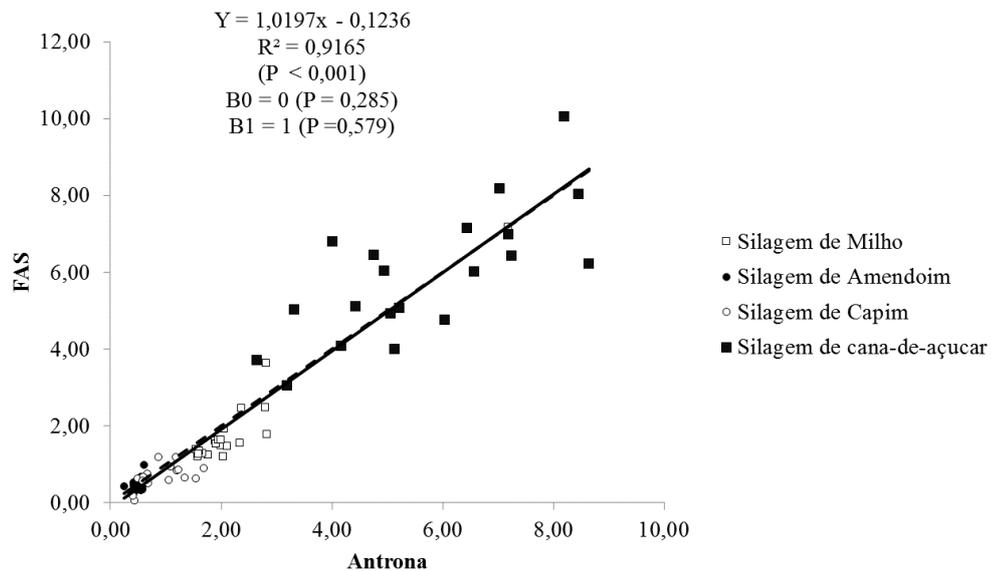
CSA = carboidratos solúveis em água. FAS = fenol ácido-sulfúrico. FEA = fenol ácido-sulfúrico com extração em água.

A comparação entre os valores de CSA obtidos nos métodos também é apresentada nas Figuras 8, 9 e 10. Os métodos foram confrontados dois a dois, com objetivo de verificar a equivalência de valores entre os métodos e a dispersão dos dados entre eles nas diferentes culturas.

Na Figura 8, a equação identidade ($P < 0,001$) que melhor ajustou os teores de CSA obtidos entre os métodos antrona e FAS foi $y = 1,0197x - 0,1236$ ($R^2 = 0,9165$), apresentando uma alta correlação entre os valores de CSA obtidos em ambos ($r = 96\%$). As hipóteses $H_0: \beta_0 = 0$ e $H_0: \beta_1 = 1$ não foram rejeitadas ($P = 0,285$ e $0,579$, respectivamente). Então, os valores

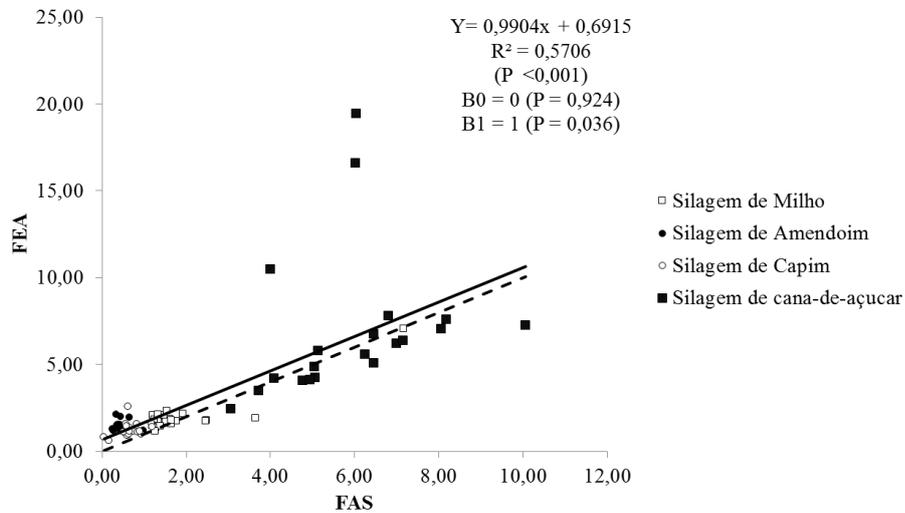
de CSA obtidos nos métodos são similares e, desta forma, ambos os métodos poderiam estimar o conteúdo de CSA em silagens.

Figura 8 - Conteúdo de CSA (%MS) de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos Antrona (DERIAZ, 1967) e FAS (DUBOIS et al., 1956).



Em contrapartida, a equação identidade ($P < 0,001$), apresentada na Figura 9, que melhor ajustou a comparação dos teores de CSA entre os métodos FAS e FEA foi $y = 0,9904x + 0,6915$ ($R^2 = 0,5706$), denotando uma correlação (r) entre métodos de 76% e um ajuste menos fino entre o modelo predito e o estimado para FAS e FEA.

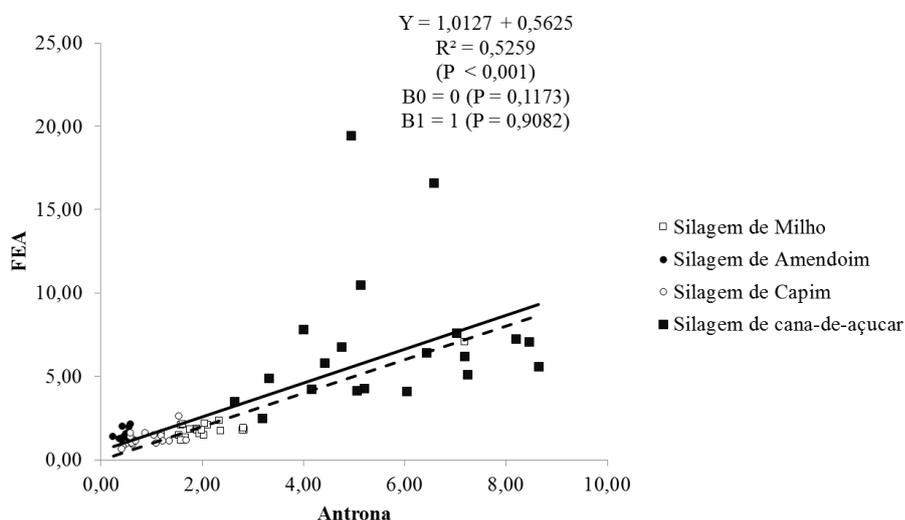
Figura 9 - Conteúdo de CSA (%MS) de silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos FAS (DUBOIS et al., 1956) e FEA (HALL, 2014).



Quando foram comparados os métodos FEA e Antrona (FIGURA 10), a equação identidade ($P < 0,001$) que melhor ajustou os teores de CSA obtidos entre os métodos foi $y = 1,0127 + 0,5625x$ ($R^2 = 0,5259$), com uma correlação (r) entre os métodos de apenas 73%. Assim, quando comparamos FAS e antrona com FEA (respectivamente, Figuras 9 e 10), verificamos que os valores de CSA obtidos (no método FEA) são maiores que os preditos (FAS e Antrona).

Os valores mais altos e mais dispersos de CSA, em todos os métodos, foram verificados nas amostras de silagem de cana (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 10 - Conteúdo de CSA (%MS) de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos Antrona (DERIAZ, 1961) e FEA (HALL, 2014).



4 DISCUSSÃO

Dentre os métodos avaliados, cada um apresenta suas peculiaridades e limitações. A primeira delas é comum aos três, que é o fato de serem métodos colorimétricos, os quais são mais sensíveis e qualquer interferência irá afetar a cor da solução e, conseqüentemente, a absorbância obtida no espectrofotômetro.

Outro fator que dificulta indicar um ensaio em detrimento do outro é o fato de cada um apresentar métodos de extração diferentes. O método FEA (HALL, 2014) segue o mesmo protocolo do método FAS proposto por Dubois et al. (1956) para determinação de CSA, a diferença é que neste a extração dos carboidratos, etapa que antecede a determinação, é feita em etanol 80%, enquanto no método FEA, Hall (2014) propõe a extração em água.

Entre os ensaios antrona e FAS há diferença tanto em relação à extração quanto à determinação. Ainda assim, os valores de CSA das silagens de milho foram semelhantes nos três métodos, portanto, para essa classe de silagens, os três métodos seriam indicados.

Para as outras classes de silagem (amendoim, capim e cana), antrona e FAS apresentaram valores de CSA semelhantes e, também, foram os métodos que melhor se ajustaram graficamente, relacionando-os em uma regressão linear. No método FEA, os valores de CSA encontrados para essas silagens foram superestimados em relação aos valores encontrados nos métodos FAS e antrona.

Quando foram calculados os custos para analisar cada amostra em cada método avaliado (custo calculado com base nos reagentes utilizados nos protocolos analíticos), o método FAS foi o mais econômico. O preço dos equipamentos não foi levado em consideração, partindo do princípio de que os laboratórios utilizem os recursos já disponíveis, otimizando a rotina laboratorial a um menor custo.

Sendo assim, é preciso avaliar a disponibilidade de recursos no laboratório e, principalmente, o perfil de carboidratos da cultura que se pretende avaliar no momento da escolha do método. Smith (1973) afirmou que cada categoria de forragem difere no tipo de CSA que acumulam, diferindo, também, na mensuração desses carboidratos (HALL, 2013).

No presente estudo, os diferentes perfis de fermentação apresentados nas silagens avaliadas, proporcionou também maior dispersão dos valores de CSA encontrados. Os maiores valores foram da silagem de cana (5,63 a 6,98%), seguidas das de milho (1,96 a 2,30%), e os menores foram das silagens de amendoim (0,45 a 1,41%) e capim (0,67 a 1,23%).

E, além dessa diferença natural das culturas, dentro de cada classe de alimento (silagens de milho, amendoim, capim e cana), foram coletadas 20 amostras de silos e propriedades diferentes, num total de 80, justamente para gerar uma maior variabilidade nos valores de CSA encontrados. De acordo com Currie (1999) e Reis et al. (2015), a escolha dos alimentos com diferentes concentrações de açúcares solúveis possibilita avaliar melhor o limite de detecção das técnicas testadas. Além disso, cada amostra passou ainda por análise em quadruplicata, em cada ensaio, para verificação da repetibilidade dos dados.

A maior dispersão de dados observada nas amostras de silagem de cana pode estar relacionada com a diluição das amostras. A diluição realizada, antes da determinação, fez-se necessária nessa classe de alimento, pois silagem de cana apresenta alto teor de CSA inerentes à cultura ensilada, que, no presente estudo, variaram em média entre 5 a 6%.

Sendo assim, sem a diluição prévia, os valores de absorvância ultrapassaram a capacidade do espectrofotômetro, conforme também observado por Reis et al. (2015), portanto foi necessária a diluição das amostras dessa classe de silagens. Mas, apesar de necessária, quando se utiliza diluição, uma nova etapa é inserida ao protocolo e, desta forma, se a pipetagem não for realizada com muita cautela, erros sistemáticos podem ser embutidos nos valores encontrados posteriormente, gerando maior CV entre as replicatas e menor precisão nos dados.

Diante do exposto, verificando praticidade, precisão e custo, o uso do método do fenol-ácido sulfúrico com extração em água (FEA) proposto por Hall (2014), para determinar CSA em silagens de milho é satisfatório. Entretanto, para as demais culturas avaliadas, os teores de CSA foram superestimados, quando se utilizou este método. Wiseman, Mallack e Jacobson (1960) destacam que a proteína solúvel e outras interferências, presentes na fração solúvel das plantas, podem superestimar o teor de carboidratos solúveis, daí a importância da extração por meio do uso de soluções alcoólicas, as quais podem reduzir essas interferências.

Assim, analisando os dados do presente estudo, o método mais indicado para determinar CSA em silagens, seria o método do FAS com extração em etanol 80%. Segundo Hall (2007), em extratos analisados com o ensaio do FAS, um amplo espectro de análises que pode detectar carboidratos poliméricos e monoméricos detecta todos os carboidratos no extrato. A extração de amostras com 80% de etanol extrai açúcares, assim como os oligossacarídeos maiores, por meio de polissacarídeos, que deve permanecer em grande parte não extraído (ASP, 1993).

O ensaio do FAS apresentou maior precisão e baixo custo entre as medições realizadas em cada amostra. Corroborando com Cândido, Ioshii e Nascimento (1995), ao afirmarem que o

método do FAS é mais sensível, preciso, exato e não sofre interferência de matriz. Esses mesmos autores, também, ressaltam que este ensaio não requer hidrólise prévia da amostra, é economicamente acessível e de fácil execução.

Conforme Masuko et al. (2005), entre os muitos métodos colorimétricos para determinação de carboidratos solúveis, o ensaio FAS é o mais prático e mais confiável para medir açúcares neutros em oligossacarídeos, proteoglicanos, glicoproteínas, e glicolipídeos, apresentando-se como o método mais usado amplamente por sua sensibilidade e simplicidade.

Fato também verificado por Hall (2013, 2014) que afirma que o ensaio do FAS é preferido para detecção dos CSA e destaca que, para qualquer método, é recomendado que o carboidrato usado para produzir a curva padrão seja representativo dos carboidratos mensurados, porque as reações colorimétricas não são estequiométricas e diferentes carboidratos apresentam diferentes respostas em absorbância. Sendo assim, selecionar um padrão que melhor expresse a composição do CSA principal na amostra, pode melhorar a acurácia. No presente estudo, seguindo essas recomendações, foi utilizado padrão de glicose para análise dos CSA das silagens de milho, amendoim e capim, já, para as silagens de cana, o padrão utilizado foi sacarose.

5 CONCLUSÕES

- a) A avaliação de silagens com diferentes perfis de fermentação proporcionou verificar as diferentes respostas de cada tipo de amostra submetida à avaliação dos teores de CSA utilizando protocolos diferentes para este fim;
- b) Dentre os métodos avaliados, o mais indicado para determinar CSA em silagens de milho, amendoim, capim e cana seria o método FAS com extração prévia em etanol 80%, pois é mais sensível, prático, preciso e de baixo custo quando comparado com o método antrona (custo por amostra = R\$ 3,80 no FAS e R\$ 5,16 no antrona);
- c) Mas, se o objetivo for avaliar apenas silagens de milho, o uso de extração em água prévia à detecção com fenol ácido-sulfúrico (FEA), conforme proposto por Hall (2014), também pode ser utilizado. Além dos benefícios já destacados do FAS para detecção, com a extração em água ocorre, também, economia de reagentes, gerando redução dos custos da análise por amostra (FEA foi R\$ 0,47 mais econômico que o método FAS).

REFERÊNCIAS

- ASP, N. G. Nutritional importance and classification of food carbohydrates. In: MEUSER, F.; MANNERS, D. J.; SEIBEL, W. (Ed.). **Plant polymeric carbohydrates**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 121-126.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1995.
- ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, p. 384-394, 2009.
- CANALE, A.; CIOTTI, A.; VALENTE, M. E. **Metodi analitici per la valutazione della qualità di conservazione degli insilati**. Torino: Estratto da Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, 1983. 21 p.
- CÂNDIDO, L. M.; IOSHII, S. H.; NASCIMENTO, A. J. Estudo comparativo de métodos para determinação de carboidratos em produtos dietéticos. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 55-67, jan./jun. 1995.
- CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 127-134, 1999.
- DERIAZ, R. E. Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 12, p. 152-160, 1961.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- HALL, M. B. Efficacy of reducing sugar and phenol-sulfuric acid assays for analysis of soluble carbohydrates in feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 185, p. 94-100, 2013.
- HALL, M. B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 359-367, 2007. Suplemento especial.
- HALL, M. B. Selection of an empirical detection method for determination of water-soluble carbohydrates in feedstuffs for application in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 198, p. 28-37, Dec. 2014.
- LEVER, M. Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. **Biochemical Medicine**, Orlando, v. 7, p. 274-281, 1973.
- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 339, p. 69-72, 2005.
- REIS, C. C. et al. Comparação entre técnicas para determinação de açúcares solúveis em alimentos utilizados na nutrição de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 401-408, jan./fev. 2015.

SHAFER, P. A.; SOMOGYI, M. Copper-iodometric reagents for sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 100, p. 695-713, 1933.

SMITH, D. Influence of drying and storage conditions on nonstructural carbohydrate analysis of herbage tissue: a review. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 28, p. 129-134, 1973.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Procedures guide for computers**. Version 9.0. Cary, 2002.

TEDESCHI, L. O. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agricultural Systems**, Essex, v. 89, p. 225-247, 2006.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 971-974, 1967.

WEINBACH, A. P.; CALVIN, D. B. The reducing powers of physiologically important carbohydrates. **Science**, New York, v. 81, p. 407-408, 1935.

WISEMAN, W. G. H.; MALLACK, J. C.; JACOBSON, W. C. Silage analysis, determination of sugar in silages and forages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 8, p. 78-80, 1960.

WOLFINGER, R. D. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics Simulation and Computation**, Ontario, v. 22, n. 4, p. 1079-1106, 1993.

CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL EM SILAGENS

RESUMO

A presença de nitrogênio amoniacal em silagens ($N-NH_3$) indica a existência de proteólises que, conseqüentemente, levarão à perda de matéria seca da silagem e redução do seu valor nutritivo. Afeta, ainda, a queda de pH, importante para fermentação adequada e conservação da massa, pois apresenta ação tamponante. Sendo assim, é essencial avaliar o conteúdo de amônia na silagem, porém não existe uma análise padrão. Nesse contexto, foram comparados procedimentos utilizados para determinar $N-NH_3$ em silagens, com o objetivo de otimizar a rotina analítica em laboratórios de conservação de forragens, indicando o método mais prático, preciso e de menor custo. As amostras utilizadas foram coletadas em diferentes silos, constituindo quatro classes de silagens com diferentes perfis de fermentação: milho ($n = 20$), amendoim forrageiro ($n = 20$), capim elefante ($n = 20$) e cana-de-açúcar ($n = 20$), as quais foram submetidas à determinação de $N-NH_3$ pelos seguintes métodos: eletrodo íon seletivo de amônia (ISE), fenol-hipoclorito (FH), kit comercial ureia 500 (marca: doles) e AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t Student a 10% de probabilidade. Os métodos FH e AOAC apresentaram valores semelhantes ($P > 0,10$) de $N-NH_3$, mas o primeiro foi mais prático e mais preciso que o segundo (coeficiente de variação médio: CVM = 4,63% para FH e 5,85% para AOAC). O método ISE seria o mais prático dentre os métodos avaliados, entretanto superestimou ($P < 0,10$) os valores de $N-NH_3$ de todas as silagens avaliadas. Logo com os dados obtidos, por meio deste estudo, não podemos indicá-lo. Quando se utilizou o kit comercial, foram verificados ($P < 0,10$) valores subestimados de $N-NH_3$, com exceção para as silagens de milho. Para essa classe de silagem, não houve variação significativa ($P > 0,10$) entre os valores de $N-NH_3$ encontrados pelos métodos FH, Kit comercial e AOAC. Quanto ao custo de análise por amostra, foram obtidos os valores de R\$ 2,27 para ISE, R\$ 0,05 para FH, R\$ 0,40 para o kit comercial e R\$ 2,46 para AOAC. Sendo assim, o método FH é o mais indicado para determinar amônia em silagens, pois apresentou maior precisão e eficácia, menor custo por amostra e, além disso, é de fácil execução, otimizando a rotina laboratorial na determinação dessa variável de extrema importância na avaliação da qualidade da fermentação no silo.

Palavras-chave: Compostos nitrogenados. Ensaio. Forragens conservadas.

ABSTRACT

The presence of ammonia nitrogen in silages (N-NH₃) indicates the existence of proteolysis, which will, consequently, lead to the loss of silage dry matter and reduction of its nutritive value, in addition to affecting pH drop, important for proper fermentation and conservation of the mass, since it has a buffering effect. Thus, it is essential to evaluate the levels of ammonia in the silage. However, there is no standard analysis. In this context, the procedures used to determine N-NH₃ in silages were compared with the objective of optimizing the analytical routine in forage conservation laboratories, indicating the most practical, precise and least expensive method. The samples were collected in different silos, constituting four classes of silages with different fermentation profiles: corn ($n = 20$), forage peanut ($n = 20$), elephant grass ($n = 20$), and sugarcane ($n = 20$) silages. They were subjected to the determination of N-NH₃ by the following methods: ammonia selective ion electrode (ISE), phenol-hypochlorite (FH), commercial kit urea 500 (brand: doles®) and AOAC (Association of Official Analytical Chemists). The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by Student t test at 10% probability. The FH and AOAC methods presented similar values ($P > 0.10$) of N-NH₃, but the first was more practical and more precise than the second (mean coefficient of variation: MCV = 4.63% for FH and 5.85% for AOAC). The ISE method was the most practical among those evaluated, however, it overestimated the N-NH₃ values of all evaluated silages, therefore, with the data obtained by this study, it cannot be indicated. When using the commercial kit, underestimated values of N-NH₃ were verified ($P < 0.10$), except in the case of corn silages, given that, for this class of silage, there was no significant variation ($P > 0.10$) between the N-NH₃ values found through the FH, the commercial kit and the AOAC methods. Regarding the analysis cost per sample, the values of R\$ 2.27 for ISE, R\$ 0.05 for FH, R\$ 0.40 for commercial kit and R\$ 2.46 for AOAC were obtained. Thus, FH is the most suitable method for the determination of ammonia in silages, since it presented greater precision and efficiency, lower cost per sample and is easy to execute, optimizing the laboratory routine in the determination of this extremely important variable in the evaluation of the fermentation quality in the silo.

Keywords: Assay. Conserved forages. Nitrogen compounds.

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de ensilagem no silo, logo após a vedação, as enzimas das plantas e de microrganismos aeróbios apresentam intensa atividade até que o oxigênio residual se torne ausente no meio. Durante essa fase inicial (aeróbia), ocorrem proteólises que levam à perda de MS e à redução do valor nutritivo da silagem. E essa quebra de proteínas leva à produção, principalmente, de aminoácidos e, também outros compostos nitrogenados, tais como nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) e aminas, essas últimas em menor quantidade (ROOKE; RATFIELD, 2003).

Quando o oxigênio se torna escasso no meio, atinge-se a anaerobiose, proporcionando o crescimento da população das bactérias do ácido lático as quais produzem, principalmente, o ácido lático, responsável pela rápida queda de pH no silo. Conseqüentemente, ocorre inibição do crescimento dos microrganismos e a massa se torna estável, conservando a forragem (OSHIMA; MCDONALD, 1978).

Dessa forma, o conteúdo de amônia é um dos parâmetros utilizados para verificar qualidade da fermentação no silo, quanto maior a concentração presente na massa ensilada pior é a qualidade da silagem. Esse parâmetro também é utilizado como medida indireta da presença de clostrídios proteolíticos no processo de fermentação, pois eles são os principais microrganismos responsáveis pela produção de amônia na forragem no silo (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Entretanto, embora seja geralmente assumido que os clostrídeos proteolíticos são responsáveis pela formação de amônia durante a ensilagem, em muitas silagens com alto conteúdo de amônia, os clostrídios não foram encontrados (HENDERSON; MCDONALD, 1984; SEALE et al., 1986). De acordo com Beck (1978), enterobactérias têm fraca atividade proteolítica, mas podem deaminar e descarboxilar alguns aminoácidos, produzindo amônia e ácido acético.

Existem vários métodos utilizados para determinar $N-NH_3$ em silagens, não havendo padronização entre laboratórios, o que impede, muitas vezes, uma comparação mais acurada de valores obtidos entre diferentes grupos de pesquisa. Nessa lógica, objetivou-se avaliar o método colorimétrico do fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967), frente ao uso do eletrodo íon seletivo para amônia (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983), Kit comercial de ureia (Ureia 500 doles®) adaptado para determinar amônia e, por fim, o método da destilação com óxido de magnésio e cloreto de cálcio, seguida de titulação (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1980), com o intuito de indicar o método

mais preciso, prático e de menor custo para determinar amônia, otimizando a rotina laboratorial.

E, fundamentando-se na teoria de Currie (1999), para melhorar o limite de detecção do analito e aumentar o intervalo de trabalho dos métodos empregados, proporcionando melhor precisão, foram utilizadas silagens com quatro padrões de fermentação (milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de açúcar).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento, obtenção e preparo das amostras

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios dos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Oitenta amostras, provenientes de silagens de milho planta inteira ($n = 20$), amendoim forrageiro ($n = 20$), capim-elefante ($n = 20$) e cana-de-acúcar ($n = 20$), obtidas de diferentes silos e submetidas a diferentes manejos (tais como: diferentes épocas de corte, uso de aditivos benzoato, sorbato, cal virgem para cana, dentre outros) foram utilizadas neste estudo.

Amostras contendo cerca de 4 Kg foram homogeneizadas e divididas em duas porções. A primeira porção foi congelada a -20°C e destinada, posteriormente, às análises de pH (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983) e nitrogênio amoniacal (conforme métodos descritos posteriormente).

Já a segunda porção foi seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e depois moída em moinho tipo Willey com malha de 1 mm e, por fim, foi destinada à determinação da concentração de matéria seca (MS), nitrogênio total e proteína bruta (AOAC, 1995), carboidratos solúveis em água (DUBOIS et al., 1956) e ácidos orgânicos (lático, acético, butírico e propiônico) e etanol (ÁVILA et al., 2009). Os valores de proteína bruta (PB) foram obtidos a partir do seguinte cálculo ($\text{PB} = \text{NT} \times 6,25$).

As análises de MS, N total, CSA, pH, ácidos orgânicos e etanol foram realizadas em duplicata e tiveram o objetivo de caracterizar as amostras (TABELA 1).

As análises de nitrogênio amoniacal foram realizadas com o objetivo de comparar os métodos avaliados, assim, cada amostra foi analisada em triplicata.

Tabela 1 - Características químicas e perfil fermentativo das silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar.

Variáveis	Silagens			
	Milho	Amendoim	Capim	Cana-de-açúcar
MS (%)	35,45±4,3	30,62±21,2	21,97±3,0	28,36±3,1
PB (%MS)	5,94±0,7	15,09±0,9	7,27±2,3	3,40±0,9
pH	3,97±0,2	5,61±0,7	4,27±0,4	3,68±0,2
CSA (%MS)	1,96±0,1	0,45±0,03	0,67±0,05	5,91±0,3
Ácido láctico (%MS)	4,97±2,2	0,60±0,3	6,06±4,0	6,75±0,4
Ácido acético (%MS)	1,64±0,6	2,81±1,2	0,70±0,4	0,70±0,3
Ácido propiônico (%MS)	0,18±0,1	0,47±0,3	0,13±0,1	0,07±0,1
Ácido butírico (%MS)	0,20±0,2	0,00	0,00	0,00
Etanol (%MS)	1,85±0,9	2,89±1,0	3,45±0,4	3,60±1,1

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

*MS - matéria seca; PB - proteína bruta; CSA - carboidratos solúveis em água.

2.2 Extração de nitrogênio amoniacal das silagens

Trinta gramas de silagem fresca foram pesadas, adicionados 270 mL de água deionizada e passaram por homogeneização por quatro minutos no aparelho *Stomacher* (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983). Logo após, o extrato foi filtrado com gaze sobre um funil e coletado e armazenado em potes plásticos de polietileno identificados.

Os extratos obtidos foram todos congelados, para posteriores análises de determinação do nitrogênio amoniacal, pelos métodos: ISE, FH, Kit comercial e AOAC.

2.3 Método eletrodo ISE de amônia proposto por Canale et al. (1983)

Do extrato obtido anteriormente (item 2.2), foi retirada uma alíquota de 50 mL e levada a um béquer, adicionada solução ISA (solução ajustadora de força iônica, contendo metanol e hidróxido de sódio, marca: ORION®), utilizada para manter o pH entre 11 e 13 e, depois, foi inserido um eletrodo íon seletivo acoplado a um multiparâmetro com agitação (High Performance Ammonia Ion Selective - Thermo Scientific, MA, USA) (FIGURA 1).

Antes de fazer a leitura, foi realizado teste de slope e calibração direta do aparelho. A leitura da concentração de amônia em Mol/L foi feita diretamente no visor do aparelho. Para transformação da concentração de amônia em porcentagem do nitrogênio total, os cálculos foram:

- a) os resultados são dados em concentração de Mols de amônia, para o cálculo em g:
- $$\text{Molaridade (leitura do aparelho)} = m \text{ (g/L)} \div [\text{MM (g/mol)} \times V \text{ (L)}];$$

- b) considerando que nos 50 mL, utilizados para leitura, temos 5,55 g de silagem, calculamos quantas gramas de MS têm em 5,55 g e, então, quantas gramas de amônia em 100 g de MS;
- c) considerando a concentração de N total em 100g de silagem, calculamos a concentração de amônia. Os resultados foram expressos em gramas de amônia como porcentagem do N total.

Figura 1 - Aparelho Multiparâmetro (ORION STAR A 214) com eletrodo íon seletivo para amônia.



Fonte: Da autora (2017).

2.4 Método do fenol-hipoclorito (FH, proposto por Weatherburn, 1967)

Para determinar nitrogênio amoniacal a partir do método fenol-hipoclorito, primeiramente foram preparados os reagentes e padrão e, posteriormente procedeu-se as etapas inerentes a esse método, conforme descrito a seguir.

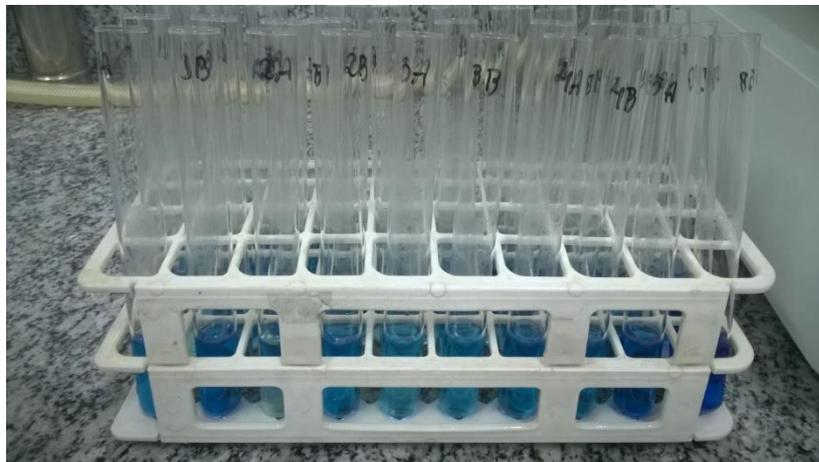
2.4.1 Preparo dos reagentes e padrão

- a) **Reagente A:** nitroprussiato de sódio 14,9 mmol e 5 g de fenol foram, respectivamente, dissolvidos em água e, posteriormente, transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e adicionada água deionizada até completar o volume;
- b) **Reagente B:** 2,5 g de hidróxido de sódio (NaOH) foi dissolvido em água, depois foram adicionados 4,2 ml de hipoclorito de sódio (5% de Cl livre), transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e adicionada água deionizada até completar o volume;
- c) **Solução padrão de sulfato de amônio** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: contendo 25 mg de N- NH_3 / L de solução.

2.4.2 Procedimentos

Em um tubo de ensaio, foram adicionados e misturados com agitador mecânico: 100 μL do extrato de amostra obtido anteriormente (item 2.2), diluído previamente de forma que suas leituras se enquadrassem na curva padrão. Depois adicionaram-se 2,5 mL de reagente A e 2,5 mL de reagente B, levou-se ao banho-maria a 37° C durante 20 minutos (FIGURA 2). E, por fim, foi realizada a leitura da absorvância em aparelho espectrofométrico em comprimento de onda de 625 nm. Em paralelo às amostras, também foram realizadas a análise do branco e a curva padrão.

Figura 2 - Reação das amostras em meio com fenol-hipoclorito.



Fonte: Da autora (2017).

2.4.3 Curva Padrão

Para a curva padrão utilizou-se solução padrão de sulfato de amônio contendo 25 mg de N-NH_3 / L de solução, conforme apresentado na sequência.

Tubo	Solução Padrão (μL)	N-NH_3 ($\mu\text{g}/\text{tubo}$)	Água (μL)	Reagente A (mL)	Reagente B (mL)	Absorvância esperada
Branco	-	-	100	2,5	2,5	-
Ponto 1	25	0,625	75	2,5	2,5	0,150
Ponto 2	50	1,250	50	2,5	2,5	0,300
Ponto 3	100	2,500	-	2,5	2,5	0,600

2.4.4 Cálculos

Relacionou-se, por regressão (utilizando o Excel), os valores de absorbância (X) da curva padrão com os de concentração de N-NH₃ em cada tubo (Y). A equação linear resultante foi utilizada, então, para calcular a concentração de N-NH₃ das amostras.

2.5 Método do kit comercial ureia 500 (Método da urease modificada)

É um método originalmente para determinar ureia, entretanto, excluindo-se o uso da enzima urease, foi possível utilizá-lo para determinar amônia.

2.5.1 Reagentes

- a) **Reagente 1:** mistura de Salicilato de Sódio 60 mmol, Nitroprussiato de Sódio 3,4 mmol e EDTA dissódico 1,35 mmol, sob forma de pó;
- b) **Reagente 2:** contém Hipoclorito de Sódio 0,120 mol/L e Hidróxido de Sódio 3,75 mol/L;
- c) **Solução padrão:** solução de sulfato de amônio contendo 25 mg de N-NH₃/ L.

2.5.2 Procedimentos

Reagente 1: o conteúdo do reagente 1 foi adicionado a um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água deionizada.

Reagente 2: o conteúdo do reagente 2 foi adicionado a um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água deionizada.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 10 µL do extrato da amostra, o reagente 1 e o reagente 2. Cada amostra foi avaliada em triplicata. E, em paralelo, foi realizada a curva padrão, utilizando-se solução padrão de sulfato de amônio contendo 25 mg de N-NH₃/ L de solução (procedeu-se à curva padrão da mesma forma que no item 2.4.3).

Os tubos que continham as amostras e os que continham os padrões foram homogeneizadas e incubados a 37°C em banho-maria, durante 5 minutos. Depois, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de 600 nm.

2.5.3 Cálculos

Relacionou-se, por regressão (utilizando o Excel), os valores de absorbância (X) da curva padrão com os de concentração de N-NH₃ em cada tubo (Y). A equação linear resultante foi utilizada, então, para calcular a concentração de N-NH₃ das amostras.

2.6 Método AOAC (1980)

Após a obtenção do extrato da silagem (conforme item 2.2), o mesmo passou por destilação com óxido de magnésio e cloreto de cálcio, seguida de titulação, conforme procedimento descrito na sequência.

2.6.1 Reagentes

- a) **Ácido bórico 4%**
- b) **Solução indicadora mista:** constituída de vermelho de metila e verde de bromocresol, diluídos em etanol 70%. O indicador misto foi incorporado à solução de ácido bórico 4% (8 mL da solução mista por litro da solução de ácido bórico 4%).
- c) **Cloreto de cálcio 25%**
- d) **Óxido de magnésio P. A.**
- e) **Ácido clorídrico (HCl) 0,05 N**

2.6.2 Procedimentos

Destilação: no dia da análise, os extratos de silagem foram descongelados, coletaram-se 25 mL e transferidos para um tubo de proteína (escala macro). Para evitar precipitação, foram adicionados 2 mL de água destilada. Logo após, foram adicionados, também, 2 g de óxido de magnésio P.A., 5 mL de cloreto de cálcio 25% e foram colocadas algumas pérolas de vidro (para ação antiespumante). Agitou-se essa solução e procedeu-se à destilação em aparelho *Kjeldahl*. Em um erlenmeyer contendo as soluções indicadoras (10 mL de solução de ácido bórico a 4% contendo solução indicadora mista), foram recolhidos 125 mL do destilado.

Titulação: o destilado contido no erlenmeyer foi retirado do aparelho e procedeu-se à titulação em bureta graduada com HCl 0,05 N.

Cálculo: $NH_3 (\%) = \frac{V \cdot N \cdot 0,014 \cdot 100}{\text{Alíquota (25 mL)}}$

Alíquota (25 mL)

Em que: V = volume.

N = normalidade do ácido utilizado na titulação (HCl).

0,014 = número de miliequivalentes do nitrogênio.

2.7 Cálculo do custo de reagentes por análise

Para calcular os custos com reagentes inerentes a cada protocolo analítico, primeiramente, foi verificado o custo médio de cada reagente. Posteriormente, a partir da quantidade utilizada de cada reagente dentro de cada método, para analisar uma única

amostra, calculou-se o custo proporcional de cada reagente. Ao final, eles foram somados em cada método, indicando o custo de reagentes por análise em cada amostra.

2.8 Análises estatísticas

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro culturas (silagem de milho, silagem de amendoim forrageiro, silagem capim elefante, silagem de cana-de-açúcar) submetidas a quatro métodos de determinação de N-NH₃ (ISE, FH, Kit comercial, e AOAC), com 20 repetições de cada tipo de silagem e três replicatas de cada amostra em cada método. Foi escolhida a matriz de covariância utilizando o critério de informação Akaike do SAS baseado em Wolfinger (1993). As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste t Student, a 10% de probabilidade, utilizando procedimento PROC MIXED do software estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2002). O modelo estatístico utilizado para análise dos dados foi:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} = valor observado de N-NH₃ referente à k-ésima repetição da combinação do i-ésimo nível do tipo de cultura (silagem de milho, silagem de amendoim forrageiro, silagem de capim elefante, silagem de cana-de-açúcar) com o j-ésimo nível de método (ISE, FH, Kit comercial, e AOAC);

μ = constante geral (média da população);

α_i = efeito do i-ésimo nível de cultura (silagem de milho, silagem de amendoim forrageiro, silagem de capim elefante, silagem de cana de açúcar) no valor observado Y_{ijk} ;

β_j = j-ésimo nível de método (ISE, FH, Kit comercial, e AOAC) no valor observado Y_{ijk} ;

$\alpha\beta_{ij}$ = efeito da interação do i-ésimo nível do fator cultura como i-jésimo nível do fator método;

e_{ij} = erro associado a observação Y_{ijk} .

Para verificar a relação entre os métodos e, conseqüentemente, a possibilidade de um substituir o outro, foram realizadas estimativas de modelos identidade (TEDESCHI, 2006), utilizando o método FH como padrão e comparando-o aos demais. Os modelos consistem em

uma equação de primeiro grau do tipo $Y = \beta_0 + \beta_1x$ com as seguintes hipóteses: $H_0: \beta_0 = 0$ e $H_0: \beta_1 = 1$. Neste caso, as análises foram realizadas pelo PROC REG no SAS (2002).

A fim de verificar repetibilidade das amostras e, também, a amplitude dos valores obtidos dentro de cada classe de silagem, foi utilizado o programa Microsoft Excel (2010), para calcular as funções: desvio padrão da média (DP), valores mínimo e máximo e coeficiente de variação (%CV). Foi calculado também o coeficiente de variação médio (%CVM), que é a média dos coeficientes de variação de cada classe de silagem, quando submetidos a determinado método.

3 RESULTADOS

Na Tabela 2 é possível verificar a comparação entre os métodos utilizados para determinar amônia em silagens das diferentes culturas avaliadas. O método ISE apresentou os maiores valores de amônia ($P < 0,10$) em todas as culturas avaliadas. Comparando-se os métodos fenol-hipoclorito (FH) e ISE, este último foi o método que gerou conteúdo de amônia, em média, 33% maior nas silagens de milho, 51% maior nas silagens de amendoim, 35% nas silagens de capim e 48% nas silagens de cana. As silagens de milho e, também, as de amendoim, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,10$) nos teores de $N-NH_3$ entre os métodos FH e AOAC. Entretanto, no método do kit comercial, verificaram-se os menores teores de amônia ($P < 0,10$) para silagens de amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar.

Tabela 2 - Comparação dos valores de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total ($N-NH_3/NT$ em %MS) de silagens de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar analisadas pelos métodos ISE (eletrodo íon seletivo), fenol-hipoclorito (FH), Kit comercial (doles) e AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Silagens	Métodos				EPM ⁽¹⁾	Valor de P		
	ISE	FH	Kit	AOAC		MET ⁽²⁾	CUT ⁽³⁾	MET*CUT
Silagem de milho	7,47 a (4,51-9,95)	4,98 b (3,11-8,25)	4,47 b (2,00-8,87)	5,52 b (3,59-8,40)	0,8106	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Silagem de amendoim	22,60 a (3,95-34,81)	11,60 b (1,85-18,45)	3,77 c (1,58-9,84)	9,95 b (1,56-16,79)				
Silagem de capim	24,30 a (9,49-61,4)	8,61 b (0,01-29,8)	3,41 c (1,20-4,85)	9,84 b (1,25-37,8)				
Silagem de cana	9,39 a (3,96-17,19)	4,50 b (1,98-7,40)	2,97c (1,91-4,85)	5,51b (2,43-7,48)				

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

⁽¹⁾ EPM - Erro padrão da média. ⁽²⁾ MET - método; ⁽³⁾ CUL - cultura.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,10$).

Valores entre parênteses abaixo das médias indicam os valores mínimo e máximo de $N-NH_3$ de cada classe de silagem avaliada.

Os valores de coeficientes de variação (CV) podem ser verificados na Tabela 3. Os maiores CV entre as triplicatas de cada amostra foram verificados no método AOAC: 7,03% para silagens de milho, 5,34% para silagem de capim elefante e 8,44% para silagem de cana, com exceção das silagens de amendoim forrageiro, em que o maior valor de CV entre as replicatas foi verificado no método ISE, 4,15%. O método FH foi o ensaio que apresentou menor CV entre as replicatas de cada amostra, em todas as classes de alimentos: 1,36% para

silagem de milho, 1,14% para silagem de amendoim, 1,57% para silagem de capim e 2,25% para silagem de cana.

Tabela 3 - Coeficiente de variação (CV) entre as repetições das amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar avaliadas para teor de N-NH₃ nos métodos ISE (eletrodo íon seletivo), FH (fenol-hipoclorito), Kit comercial (doles Uréia 500) e AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Tipo de silagem	n	ISE	FH	Kit	AOAC
Milho planta inteira	20	4,59	1,36	2,38	7,03
Amendoim forrageiro	20	4,15	1,14	1,04	2,57
Capim-elefante	20	3,73	1,57	2,6	5,34
Cana-de-açúcar	20	5,50	2,25	1,77	8,44
CVM	80	4,50	4,63	1,95	5,84

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

n = número de amostras (repetições). CVM = coeficiente de variação médio.

Na Tabela 4 são apresentados os custos com reagentes por amostra, utilizados na determinação de N-NH₃, pelos métodos ISE, FH, kit comercial e AOAC. Verificou-se que o método mais econômico foi FH (R\$ 0,05), seguido do kit comercial (R\$ 0,13), enquanto ISE e AOAC apresentaram-se mais onerosos, respectivamente, R\$ 2,57 e R\$ 2,46.

Tabela 4 - Custo com reagentes por amostra das análises para determinar N-NH₃ pelos métodos ISE (eletrodo íon seletivo) para amônia, FH (fenol-hipoclorito), kit comercial e AOAC.

Método	Custo com análise por amostra (R\$)*
ISE	2,57
FH	0,05
kit comercial	0,13
AOAC	2,46

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

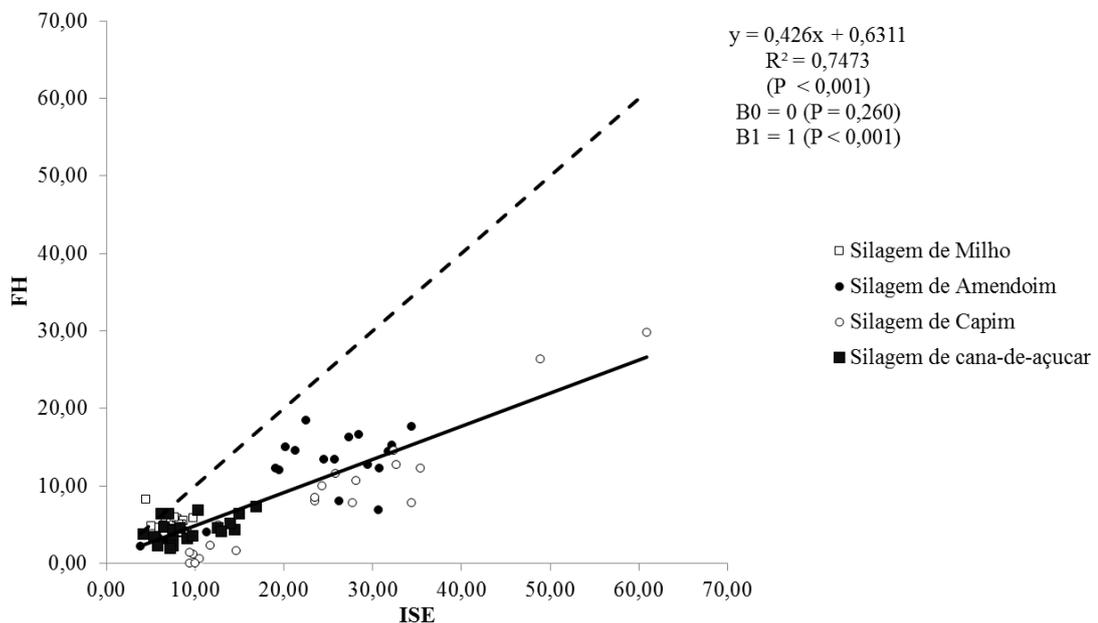
* Foi levado em consideração apenas o custo com reagentes para análise de cada amostra.

A comparação entre os valores de nitrogênio amoniacal obtidos nos métodos é apresentada nas Figuras 3, 4 e 5, em que o método FH foi utilizado como padrão. Este método, portanto indicou os valores observados e os demais métodos indicaram os valores preditos, com objetivo de avaliar a equivalência de valores entre os métodos e a dispersão dos dados entre eles nas diferentes culturas, a partir de uma regressão linear.

Os dados mais dispersos foram obtidos com as amostras de silagem de amendoim forrageiro e de capim elefante (FIGURAS 3, 4 e 5).

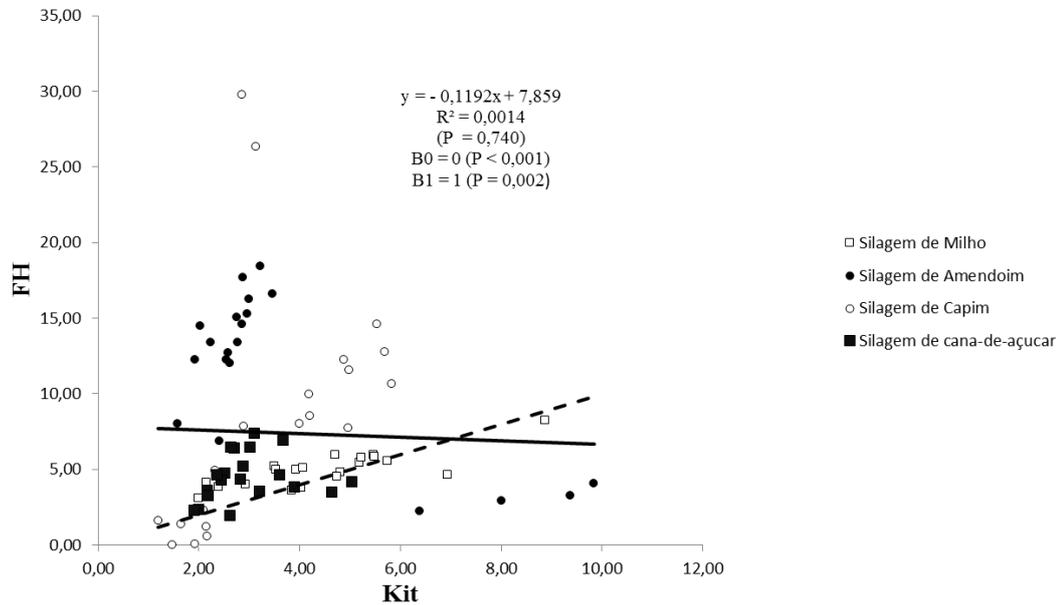
Na Figura 3, a equação identidade ($P < 0,001$) que melhor ajustou os teores de $N-NH_3/\% NT$ obtidos entre os métodos FH e ISE foi $y = 0,426x + 0,6311$ ($R^2 = 0,7473$), apresentou uma boa correlação entre os valores de $N-NH_3$ obtidos em ambos ($r = 86\%$). Contudo a hipótese $H_0: \beta_0 = 0$ não foi rejeitada ($P = 0,260$), mas $H_0: \beta_1 = 1$ foi rejeitada ($P < 0,001$). Então, o método ISE não foi efetivo em prever o $N-NH_3/\% NT$.

Figura 3 - Conteúdo de nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total ($N-NH_3/NT$ em %MS) de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar avaliadas pelos métodos FH (WEATHERBURN, 1967) e ISE (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983).



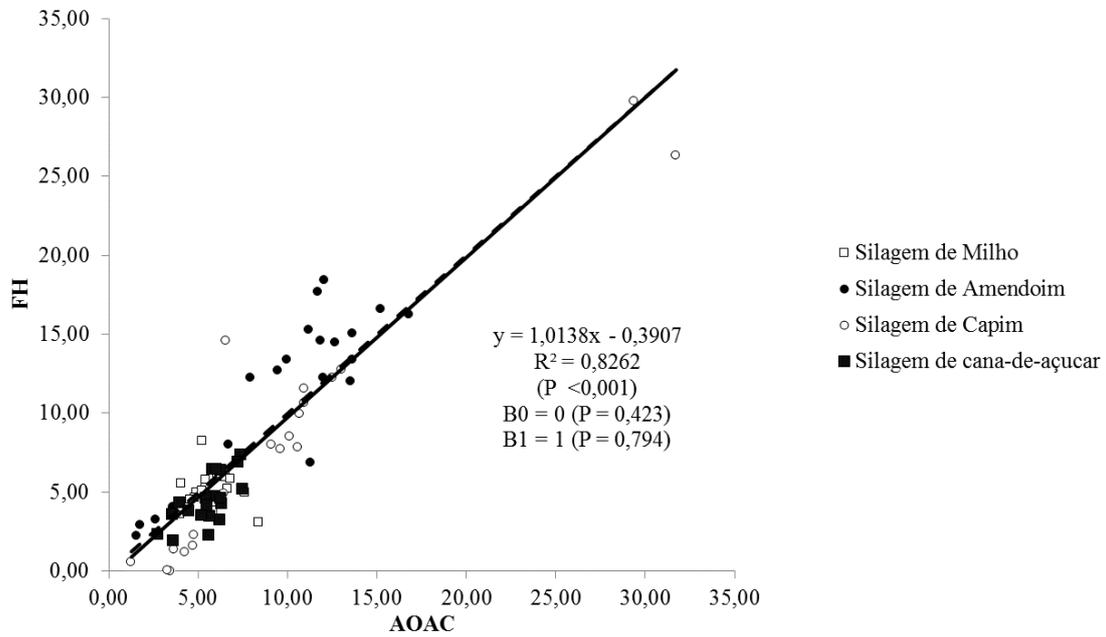
Na Figura 4, é possível verificar que não houve ajuste na equação identidade entre os métodos FH e kit comercial $y = 0,1192x + 7,859$ ($R^2 = 0,0014$), a qual não foi significativa ($P < 0,740$). Sendo assim, essa equação de regressão não deve ser usada para previsões, ou seja, o método do kit comercial não é eficaz para determinar $N-NH_3/\% NT$.

Figura 4 - Conteúdo de nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total (% N-NH₃/NT) com base na MS de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar, avaliadas pelos métodos FH (WEATHERBURN, 1967) e Kit comercial (doles).



Em contrapartida, na Figura 5, a equação identidade ($P < 0,001$) que melhor ajustou os teores de N-NH₃/NT, obtidos entre os métodos FH e AOAC, foi $y = 1,0138x - 0,3907$ ($R^2 = 0,8262$), apresentando uma boa correlação entre os valores de N-NH₃ obtidos ($r = 91\%$). As hipóteses $H_0: \beta_0 = 0$ ($P = 0,423$) e $H_0: \beta_1 = 1$ ($P = 0,794$) não foram rejeitadas. Então, os valores preditos e observados são similares, sendo assim, o método AOAC poderia estimar o N-NH₃/NT.

Figura 5 - Conteúdo de nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total (% N-NH₃/NT) com base na MS de amostras de silagem de milho, amendoim forrageiro, capim e cana-de-açúcar, avaliadas pelos métodos FH (WEATHERBURN, 1967) e AOAC (1980).



4 DISCUSSÃO

Os métodos para determinação de amônia em silagens avaliados neste estudo, apresentaram vantagens e desvantagens e/ou limitações decorrentes da própria técnica, da cultura ensilada e da interação entre ambos.

O método ISE superestimou os valores de amônia, em todas as classes de silagens avaliadas, mas na regressão linear, comparando-o com o método FH, verificou-se uma tendência em se ajustar, caso os erros não fossem aleatórios e fossem controlados, tais como algum erro relacionado à calibração e/ou contaminação de reagentes, dentre outros. Byrne e Power (1974), avaliando o uso do eletrodo para determinar amônia em dejetos animais, verificaram que em 68% das amostras avaliadas os valores de amônia obtidos no eletrodo foram maiores que os obtidos pela técnica de destilação.

O uso do eletrodo ISE para amônia é baseado na determinação dos íons amônio, após sua conversão em amônia (CANALE; CIOTTI; VALENTE, 1983; MANUAL..., 2016). E, segundo Wisk e Siebert (1973), quando se mede concentração de amônia a partir do eletrodo íon seletivo, ocorre também a medição de aminas e cátions, que são lidos como amônia, superestimando os valores obtidos. Dessa forma, esse pode ser o motivo pelo qual o método ISE possa ter gerado valores de amônia superiores, em relação aos demais métodos, pois se verifica que, durante o processo de fermentação no silo, a ação das enzimas da planta ou dos microrganismos, em ambiente anaeróbico, promove quebra de proteína bruta em aminoácidos e subsequente produção de diversos compostos como aminas e amônia (MUCK, 1988; OSHIMA; MCDONALD, 1978). No presente estudo não podemos afirmar se as aminas seriam a fonte de erro ou se haveria outros interferentes.

Os métodos FH e kit comercial são colorimétricos, entretanto possuem diferentes protocolos de execução. Mas, de acordo com o presente estudo, para a determinação de amônia em silagens de milho, ambos podem ser utilizados. Em contrapartida, para as demais silagens avaliadas, as concentrações de N-NH₃ encontradas no método kit comercial foram subestimadas em relação aos métodos FH e AOAC.

O método do FH segue um protocolo já bastante utilizado para medir amônia no sangue, em líquido ruminal e em silagens e é baseado na reação que envolve fenol e hipoclorito, na presença de agentes catalíticos, gerando uma coloração azulada, que é tão mais forte, conforme a concentração de amônia na amostra e, por fim, faz-se a leitura da absorvância em aparelho espectrofotômetro.

Com o kit comercial o princípio é semelhante, pois também é colorimétrico, porém trata-se originalmente de um método enzimático. E um fator importante a destacar é que esse kit é utilizado, para análise de ureia, contudo, neste estudo, foi adaptado para medir amônia, excluindo-se a urease. De acordo com o objetivo do Kit, a urease tem a função enzimática de reagir com os íons amônio, para produzir amônia e, como no presente estudo queríamos medir diretamente a amônia presente nas amostras, foi seguido todo o protocolo, com exceção do uso da urease. Talvez, por isso e, também, pela quantidade de amostra utilizada por essa técnica, os resultados encontrados foram subestimados quando comparados com os demais métodos.

Utilizaram-se apenas 10 µL de amostra para proceder à determinação de amônia pelo método do kit. Essa quantidade é muito pequena e pode se apresentar como uma fonte considerável de erro. Verificando o coeficiente de variação entre repetições das medidas (1,04 a 2,60%), a precisão do método do Kit foi boa, entretanto a correlação entre este método com o outro colorimétrico (FH) foi de apenas 4%, denotando menor acurácia dos valores obtidos no método do Kit, com exceção para as silagens de milho.

Sendo assim, em condições de campo, havendo a necessidade de avaliar de maneira mais rápida e precisa os teores de amônia existentes na silagem, se ela for de milho, este Kit pode ser usado, visto que neste estudo apresentou valores semelhantes aos métodos FH e AOAC.

De acordo com os valores observados, o método AOAC (1980) pode substituir satisfatoriamente o método FH, porque não houve variação entre os teores de N-NH₃ de todas as classes de amostras avaliadas nos dois métodos e ambos ainda apresentaram uma boa correlação ($r = 91\%$).

Todavia o método da AOAC é mais laborioso e de maiores custos, em razão da maior quantidade de reagentes utilizados por amostra, sem falar na própria quantidade de amostra necessária para dosagem, que varia entre 25 e 50 mL por repetição. Além disso, esse ensaio também se mostrou menos preciso, com maiores coeficientes de variação (2,57 a 8,44%) entre as repetições de cada amostra.

Isso pode ter acontecido, provavelmente, porque na titulação, mesmo quando as replicatas são realizadas pelo mesmo laboratorista, ainda assim, pode haver diferença na verificação da viragem de cor do indicador causada quando se atinge o ponto estequiométrico. E, como o volume gasto na titulação é apresentado apenas com uma casa após a vírgula, uma gota a mais de ácido que seja utilizada na titulação vai gerar maior CV entre as replicatas.

Sendo assim, diante do exposto, o método FH foi o mais preciso para determinar amônia, por isso, foi utilizado como padrão neste estudo. Entretanto, por ser um método colorimétrico também é mais sensível e mais propenso a interferências. Portanto a escolha por um ou outro método analítico depende dos recursos disponíveis e do perfil da cultura a ser analisada. Ao comparar o uso do eletrodo ISE com o ensaio FH, McCullough (1967) também observou que este último é o mais específico para análise de amônia.

Os maiores e mais dispersos valores de amônia foram verificados nas silagens de amendoim e capim e essa resposta era esperada, pois em ambas os valores de pH observados foram de 5,61 e 4,27, respectivamente. Silagens com uma boa fermentação apresentam pH abaixo de 4. Silagens com pH maior aliado a um maior teor de umidade, como é o caso da silagem de capim (média de 20 amostras = 21,97% MS), podem proporcionar o acontecimento de fermentações secundárias (BERNARDES, 2006), promovendo diminuição dos teores de ácido lático na massa ensilada e, conseqüentemente, uma queda de pH mais lenta.

Além disso, em leguminosas e capim, ocorre o efeito da alta capacidade tampão que impede uma queda de pH mais rápida. Capacidade tampão é a quantidade de ácido requerido para reduzir o pH de 6 para 4 por unidade de MS (MUCK, 1988). E, avaliando os teores de ácido lático nas silagens, verificou-se uma baixa concentração desse ácido, nas silagens de amendoim e capim, respectivamente, 0,45 e 0,67% na MS, sendo um indicativo da queda mais lenta de pH.

5 CONCLUSÕES

- a) Com base no presente estudo, o método mais indicado para determinar amônia em silagens de milho, amendoim forrageiro, capim elefante e cana-de-açúcar é o FH, pois mostrou-se mais sensível, prático, preciso e de menor custo (R\$ 0,05 por amostra);
- b) O método AOAC também é indicado para determinar N-NH₃, nas classes de silagens avaliadas, entretanto é de menor precisão e maior custo (R\$ 2,46 por amostra);
- c) Para silagens de milho, o método do kit comercial também seria uma alternativa para determinar amônia, pois mostrou-se preciso, prático e de baixo custo (R\$ 0,13 por amostra);
- d) O uso do eletrodo é a forma mais rápida e menos laboriosa para determinar amônia e, portanto, falando-se em praticidade, seria a técnica mais indicada para produtores de silagem utilizarem tanto em bancada quanto em campo. Mais estudos, porém são necessários para verificar quais seriam as interferências que poderiam estar superestimando o N-NH₃ medido pelo eletrodo ISE de amônia. Apenas com os dados do presente estudo, não é possível indicá-lo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1980. 1015 p.

ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, p. 384-394, 2009.

BECK, T. H. The microbiology of silage fermentation. In: MCCULLOUGH, M. E. (Ed.). **Fermentation of silage: a review**. Iowa: National Feed Ingredients Association, 1978. p. 61-115.

BERNARDES, T. F. **Controle da deterioração aeróbica de silagens**. 2006. 103 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BYRNE, E.; POWER, T. Determination of ammonium nitrogen in animal slurries by ammonia electrode. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 5, p. 51-65, 1974.

CANALE, A.; CIOTTI, A.; VALENTE, M. E. **Metodi analitici per la valutazione della qualità di conservazione degli insilati**. Torino: Estratto da Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, 1983. 21 p.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 127-134, 1999.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

HENDERSON, A. R.; MCDONALD, P. The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies. **Research and Development in Agriculture**, Pretória, v. 1, p. 171-176, 1984.

MANUAL do eletrodo ISE Orion Star A214®. Jundiaí: Hexis Científica®, 2016.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 297-304, Aug. 1967.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. Washington: Scholium International, 1991. 155 p.

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

OSHIMA, M.; MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.29, p.497-508, 1978.

ROOKE, J. A.; HATFIELD, R. D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 251-304.

SEALE, D. R. et al. The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on the fermentation of lucerne silage in laboratory silos. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 41, p. 61-70, 1986.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Procedures guide for computers**. Version 9.0. Cary, 2002.

TEDESCHI, L. O. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agricultural Systems**, Essex, v. 89, p. 225-247, 2006.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 971-974, 1967.

WISK, T. J.; SIEBERT, K. J. Determination of ammonia and brewery applications of specific ion electrodes. **American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v. 31, p. 26-30, 1973.

WOLFINGER, R. D. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics Simulation and Computation**, Ontario, v. 22, n. 4, p. 1079-1106, 1993.