

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JUAHIL MARTINS DE OLIVEIRA JÚNIOR



**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEDIDA LINEARIZADA DA CAPACIDADE
TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS**

CURITIBA

2009

JUAHIL MARTINS DE OLIVEIRA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEDIDA LINEARIZADA DA CAPACIDADE
TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marson Bruck Warpechowski

CURITIBA

2009


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEDIDA LINEARIZADA DA CAPACIDADE TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS" apresentada pelo Mestrando JUAHIL MARTINS DE OLIVEIRA JUNIOR, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou o candidato Apto para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Produção Animal.

Curitiba, 18 de fevereiro de 2009


Prof. Dr. Marson Bruck Warpechowski
Presidente/Orientador


Prof. Dr. Martin Gierus
Membro


Prof. Dr. João Ricardo Dittrich
Membro

Dedico este trabalho àqueles que sempre estiveram presentes e deram apoio durante toda a minha caminhada, Juahil Martins de Oliveira e Rose Mary Buffara de Camargo Vianna

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Marson Bruck Warpechowski, pela oportunidade, apoio e cobranças, que tiveram indiscutível influência ao teor desta humilde obra, e que transmitiu conhecimentos que indubitavelmente serão úteis para toda a minha carreira profissional.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, que também contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná, sem os quais não seria possível a conclusão do trabalho.

Agradeço também, à minha noiva Daniele de Campos Richter, fundamental e importante em todos os momentos de meus estudos, pela sua permanente presença e incentivo.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver."

(Martin Luther King)

RESUMO

O método de linearização das curvas de titulação foi avaliado na determinação da capacidade tamponante (CT) da fibra em detergente neutro (FDN) de alimentos (Capítulo 2). No Capítulo 3 foi avaliado a repetibilidade e a aditividade do método proposto no Capítulo 2 e de diferentes medidas da capacidade tamponante da fibra de alimentos. No Capítulo 2 foram utilizados 13 materiais, utilizando dados individuais não publicados de dois experimentos. No Experimento 1 utilizou-se a fibra de amostras de aveia branca, aveia preta, azevém, trevo branco e trevo vermelho e no Experimento 2 milho, farelo de soja, palha de trigo e cinco misturas destes alimentos. No Capítulo 3 foram utilizados como materiais experimentais fibra do farelo de soja (FS), milho duro (M), casca de soja (CS) e farelo de trigo (FT), e a mistura composta com 65% M + 35% FS, e esta mistura diluída em 10 e 20% CS, 10 e 20% FT, além de uma mistura com mesma proporção de FS, M, FT e CS. As titulações foram realizadas partindo-se do pH inicial da solução até pH 2,0. A nova medida proposta, taxa linear de tamponamento (TLT) foi determinada a partir das titulações, sendo obtida como inverso da inclinação da regressão linear entre a medida linearizada do pH, calculada como EXP (1/pH), e a adição acumulada de HCl em cada intervalo. No Capítulo 2 a acidez titulável (AT) foi medida como a quantidade de HCl necessária (mEq H⁺/g de FDN) para redução do pH inicial da solução até o pH 4,0, 3,0 e 2,0. No Capítulo 3 a AT foi obtida conforme o Capítulo 2, como também partindo-se do pH padronizado em 8,0 (ATP). A medida CT foi calculada pela razão entre a ATP e o intervalo de pH. No capítulo 3 as análises foram repetidas no tempo separadas em Experimentos 1 e 2. Para avaliação no Capítulo 3 da repetibilidade do método foi utilizada a amplitude entre replicatas dos dados obtidos. A aditividade dos métodos foi avaliada pela diferença entre os valores medidos e calculados expressos em percentagem dos valores medidos, como também pelas comparação das diferenças brutas encontradas em relação à zero. No Capítulo 2 a transformação resultou em ajuste satisfatório à regressão linear para todos os materiais estudados, com r² maior que 0,85 e erro padrão residual menor que 0,059. Também houve correlação alta e positiva entre a AT e a TLT medidas nas diferentes faixas de pH. No capítulo 3 a amplitude entre replicatas foi elevada e variou entre 18,53 para a medida TLT no Experimento 1 e 12,39 para CT no Experimento 2, o que indica a necessidade de maior número de replicatas para a obtenção de valores mais precisos. A Média da diferença bruta obtida dos diferentes métodos e dos intervalo de confiança (95%) e teste de t foram -0,0273 +/-0,1123 para AT (p>0,56), -0,0400 +/-0,1370 para ATP (p>0,49), -0,0083 +/-0,0194 para CT (p>0,32) e -0,0502 +/-0,2425 para TLT (p>0,62). Os resultados obtidos do teste de aditividade para todos os métodos apresentaram exatidão e precisão aceitáveis, com o método proposto TLT obtendo maior probabilidade em relação aos demais, demonstrando melhor exatidão quanto à aditividade.

ABSTRACT

A method for linearization of titration curves and its application to determining the buffering capacity (BC) of neutral detergent fiber (NDF) from 13 feed and its mixtures was evaluated. (Chapter 2). In Chapter 3 was assessed the additivity and repeatability of the method proposed in Chapter 2 and different measures of buffering capacity of fiber feeds. In Chapter 2 were used 13 materials, Individual unpublished data from 2 experiments, including samples of white oats, oat, ryegrass, red clover and white clover (Experiment 1), and samples of corn, soybean meal, wheat straw and mixtures of these five feeds (Experiment 2). In Chapter 3 were used as experimental material fiber of soybean meal (S), corn wheat (C), soybean hulls (SH) and wheat bran (W) and the mixture with 65% C + 35% S, and this mixture diluted with 10 and 20% SH, 10 and 20% W, and the other mixture with the same proportion of S, C, W and SH. Titration was performed just to the pH 2,0. The new measure proposed as the rate linear buffer (LB) was determined from the titrations and is obtained as the inverse slope of the linear regression between the linearized measurement of pH, calculated as EXP (1/pH) and cumulative addition of HCl in each range. In Chapter 2 the titratable acidity (TA) was measured as the amount of HCl needed (mEq/g NDF) to reduce the solution initial pH until the pH 4.0, 3.0 and 2.0. In Chapter 3 TA was obtained as Chapter 2, but based on the standard in pH 8.0 (TAS). The BC measure was calculated by the ratio between TAS and the range of pH. In Chapter 3 the tests were repeated in time and separate experiments 1 and 2. For evaluation in Chapter 3, the repeatability of the method was used to scale the data obtained between replicates. The additivity of the methods was assessed by the difference between the calculated and measured values expressed as a percentage of the measured values, but also by comparing the differences found compared to zero. In Chapter 2 the transformation presented satisfactory fitting to linear regression for all materials evaluated, with r^2 higher than 0,85 and standard error residual lower than 0,059. Positive correlation between TA and LB evaluated in the different ranges of pH were obtained. In Chapter 3 the range between replicates was high and ranged from 18.53 to LB measured in Experiment 1 and 11.39 for BC in Experiment 2, indicating the need for greater numbers of replicates to obtain more accurate values. The mean difference obtained in different methods and the confidence interval (95%) and the t test was -0.0273 +/-0.1123 to TA ($p>0.56$), -0.0400 +/-0.1370 to TAS ($p>0.49$), -0.0083 +/-0.0194 to BC ($p>0.32$) and, -0.0502 +/-0.2425 to LB ($p>0.62$). The results of the test of additivity for all methods had acceptable accuracy and precision, the method proposed TLT getting more likely than the other, showing better accuracy on the additivity.

Key words: buffering capacity, titratable acidity, linear measure, pH, physico-chemical property

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DAS MEDIDAS DE pH INICIAL, ACIDEZ TITULÁVEL, TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO E DO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO E DO ERRO PADRÃO RESIDUAL DAS REGRESSÕES LINEARES AJUSTADAS ÀS CURVAS DE TITULAÇÃO DA FDN NO INTERVALO ATÉ O PH 4,0... 18	18
TABELA 2.2. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DAS MEDIDAS DE ACIDEZ TITULÁVEL, TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO E DO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO E DO ERRO PADRÃO RESIDUAL DAS REGRESSÕES LINEARES AJUSTADAS ÀS CURVAS DE TITULAÇÃO DA FDN NO INTERVALO ATÉ O PH 3,0... 19	19
TABELA 2.3. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DAS MEDIDAS DE ACIDEZ TITULÁVEL, TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO E DO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO E DO ERRO PADRÃO RESIDUAL DAS REGRESSÕES LINEARES AJUSTADAS ÀS CURVAS DE TITULAÇÃO DA FDN NO INTERVALO ATÉ O pH 2,0... 20	20
TABELA 2.4. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS pH INICIAL, ACIDEZ TITULÁVEL E TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO NOS INTERVALOS ATÉ O pH 4,0, 3,0 e 2,0 23	23
TABELA 3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (VALORES ANALISADOS) DOS INGREDIENTES E MISTURAS 32	32
TABELA 3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FDN SEPARADA DOS MATERIAIS EXPERIMENTAIS 33	33
TABELA 3.3. AMPLITUDE DAS MEDIDAS pH INICIAL, ACIDEZ TITULÁVEL, CAPACIDADE TAMPONANTE E PELA TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO 34	34
TABELA 3.4. VALORES MÉDIOS DAS MEDIDAS pH INICIAL, ACIDEZ TITULÁVEL, CAPACIDADE TAMPONANTE E TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO 35	35
TABELA 3.5. DIFERENÇA ENTRE VALORES DAS MEDIDAS ACIDEZ TITULÁVEL E ACIDEZ TITULÁVEL PADRONIZADA MEDIDOS E CALCULADOS NA FIBRA DE MISTURAS DE ALIMENTOS (EM PERCENTAGEM DA MÉDIA E DIFERENÇA BRUTA), DESVIO PADRÃO DA DIFERENÇA, COEFICIENTE DE REGRESSÃO E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO 39	39
TABELA 3.6. DIFERENÇA ENTRE VALORES DAS MEDIDAS CAPACIDADE TAMPONANTE E TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO MEDIDOS E CALCULADOS NA FIBRA DE MISTURAS DE ALIMENTOS (EM PERCENTAGEM DA MÉDIA E DIFERENÇA BRUTA), DESVIO PADRÃO DA DIFERENÇA, COEFICIENTE DE REGRESSÃO E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO 39	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AT – acidez titulável
ATP – acidez titulável padronizada
CT – capacidade tamponante
CS – casca de soja
TLT – taxa linear de tamponamento
FB – fibra bruta
FDA – fibra em detergente ácido
FDN – fibra em detergente neutro
FS – farelo de soja
FT – farelo de trigo
LIG – lignina
M – milho
MS – matéria seca
PB – proteína bruta
RM – resíduo mineral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVO GERAL.....	12
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. LINEARIZAÇÃO DE CURVAS DE TITULAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS EM FAIXAS AMPLAS DE PH.....	13
2.2. Introdução.....	15
2.3. Materiais e Métodos.....	16
2.4. Resultados e Discussão.....	18
2.5. Conclusão.....	25
2.6. Referências.....	25
3. COMPARAÇÃO DE MEDIDAS DA CAPACIDADE TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS.....	27
3.2. Introdução.....	29
3.3. Material e Métodos.....	30
3.4. Resultados e Discussão.....	32
3.5. Conclusão.....	40
3.6. Referências.....	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

As frações fibrosas dos alimentos de origem vegetal apresentam propriedades físico-químicas importantes que afetam os processos digestivos em ruminantes e monogástricos. Dentre as propriedades físico-químicas importantes, a capacidade tamponante (CT) dos alimentos se destaca por afetar a oscilação do pH da digesta.

A CT tem sido avaliada em alimentos integrais e na fibra dos alimentos de origem vegetal, utilizando para tanto as curvas de titulação. Entretanto, as curvas de titulação apresentam comportamento não linear, especialmente em faixas de pH abaixo de 4,0, o que pode resultar em não aditividade da medida, ou seja, não permite estimar a CT de misturas a partir dos valores obtidos de seus componentes. Desta maneira, é necessário uma avaliação adequada da CT de ingredientes, misturas e dietas e de suas frações fibrosas, para a obtenção de medida mais aditiva e o entendimento dos fatores que possuem influência sobre esta medida.

Existem diversas medidas utilizadas na nutrição animal para a determinação da CT, dentre as principais podemos citar a acidez titulável (AT) e a CT. Entretanto, neste trabalho é proposto nova medida (taxa linear de tamponamento, TLT), a qual busca linearizar as curvas de titulação pela transformação dos dados de pH, e avaliá-la utilizando parâmetros das curvas de titulação, em que a CT é calculada como o inverso da inclinação da regressão linear obtida entre o pH (Y) e a quantidade adicionada de ácido ou base (X). Com a avaliação medida conforme proposto neste trabalho, sugere-se que a medida avaliada como TLT analisada na fibra do alimento possa avaliar melhor o efeito em todo trato digestório e em diferentes momentos da digestão, e permite a obtenção de uma taxa linear única que explica a CT em ampla faixa de pH, de maneira que atenda aos interesses de formulação para diferentes espécies e momentos da digestão e fermentação no trato gastrointestinal.

A dissertação foi dividida em capítulos, o capítulo 2 busca avaliar o método proposto de linearização de curvas de titulação para determinação da CT da fibra de alimentos em ampla faixa de pH, e o capítulo 3 avalia a repetibilidade e a aditividade do método e de diferentes medidas da CT. No capítulo 4 estão as considerações finais pertinentes ao assunto.

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar a capacidade tamponante em frações fibrosas de alimentos utilizando diferentes metodologias de determinação e expressão.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho foram avaliar um novo método de linearização de curvas de titulação para determinação da capacidade tamponante da fibra de diferentes alimentos em faixas de pH do 8,0 ao 2,0.

Avaliar a repetibilidade e a aditividade da nova medida proposta denominada taxa linear de tamponamento e de diferentes medidas utilizadas na determinação da capacidade tamponante da fibra de alimentos.

2. LINEARIZAÇÃO DE CURVAS DE TITULAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS EM FAIXAS AMPLAS DE PH

Autor: Juahil Martins de Oliveira Júnior

Orientador: Marson Bruck Warpechowski

RESUMO

O método de linearização de curvas de titulação foi avaliado na determinação da capacidade tamponante (CT) da fibra em detergente neutro (FDN) de 13 materiais. Foram utilizados dados individuais não publicados de dois experimentos, incluindo amostras de aveia branca, aveia preta, avevém, trevo branco e trevo vermelho (Experimento 1), além de amostras de milho, farelo de soja, palha de trigo e cinco misturas destes alimentos (Experimento 2). As titulações foram realizadas do pH inicial até o pH 2,0. A acidez titulável (AT) foi medida como a quantidade de HCl necessária (mEq H⁺/g de FDN) para redução do pH inicial da solução até o pH 4,0, 3,0 e 2,0, e a medida taxa linear de tamponamento (TLT) foi obtida como inverso da inclinação da regressão linear entre a medida linearizada do pH, calculada como EXP (1/pH), e a adição acumulada de HCl em cada intervalo. A transformação resultou em ajuste satisfatório à regressão linear para todos os materiais estudados, com r^2 maior que 0,85 e erro padrão residual menor que 0,059. Houve correlação alta e positiva entre a AT e a TLT medidas nas diferentes faixas de pH. Diferentemente da AT, o método TLT permite obtenção da CT como uma taxa linear única, válida em qualquer intervalo de pH do 8,0 ao pH 2,0.

Palavras-chave: capacidade tamponante, acidez titulável, regressão linear, fibra em detergente neutro, propriedade físico-química.

2.1. LINEARIZATION OF THE TITRATION CURVES FOR DETERMINATION OF THE FEED'S FIBER BUFFERING CAPACITY IN WIDE PH RANGES

ABSTRACT

A method for linearization of titration curves and its application to determining the buffering capacity (BC) of neutral detergent fiber (NDF) from 13 feed and its mixtures was evaluated. Individual unpublished data from 2 experiments, including samples of white oats, oat, ryegrass, red clover and white clover (Experiment 1), and samples of corn, soybean meal, wheat straw and mixtures of these five feeds (Experiment 2). Titration was performed just to the pH 2.0. The titratable acidity was measured as the amount of HCl needed (mEq/g NDF) to reduce the solution initial pH until the pH 4.0, 3.0 and 2.0, and the rate linear buffer (LB) measure were determined as the inverse of the slope of the linear regression between the linearized pH, calculated as $EXP(1/pH)$, and the cumulated HCl in each interval. The transformation presented satisfactory fitting to linear regression for all materials evaluated, with r^2 higher than 0.85 and standard error residual lower than 0.059. Positive correlation between TA and LB evaluated in the different ranges of pH were obtained. Unlike TA, the method allows to obtain the LB as a single linear ratio, valuable for every pH interval from 8.0 to 2.0.

Key words: buffering capacity, titratable acidity, linear measure, pH, physico-chemical property

2.2. INTRODUÇÃO

A capacidade tamponante (CT), pode ser definida como a habilidade de um alimento ou ingrediente em suspensão aquosa em resistir a alterações de pH após adição de solução ácida ou básica (Giger-Reverdin *et al.*, 2002). Em nutrição animal, a CT dos alimentos tem sido usualmente determinada por titulação direta de amostra em solução aquosa até um valor de pH estipulado (acidez ou alcalinidade titulável, AT) (McBurney *et al.*, 1983; Warpechowski, 1996; Warpechowski *et al.* 2005; Warpechowski e Ciocca, 2006; Bockor *et al.*, 2007), ou pela razão entre a AT e o intervalo de pH utilizado (McBurney *et al.*, 1983; Gabert *et al.*, 1995; Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2007), ou ainda utilizando parâmetros das curvas de titulação, em que a CT é calculada como o inverso da inclinação da regressão linear obtida entre o pH (Y) e a quantidade adicionada de ácido ou base (X) (Giger-Reverdin *et al.*, 2002).

A avaliação da CT a partir das curvas de titulação tem sido realizada em amostras de alimento (Gabert *et al.*, 1995; Giger Reverdin *et al.*, 2002; Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2007) ou de frações do mesmo, como na fibra detergente neutro (FDN) (McBurney *et al.*, 1983; Warpechowski, 1996; Warpechowski *et al.*, 2005; Warpechowski e Ciocca, 2006). Porém, nos dois casos, as curvas de titulação apresentam comportamento não linear, especialmente em faixas de pH abaixo de 4,0 (McBurney *et al.*, 1983; Van Soest *et al.* 1991; Gabert *et al.*, 1995; Giger-Reverdin *et al.*, 2002; Warpechowski e Ciocca, 2005). Este comortamento não-linear resulta em não aditividade da medida CT em faixas de pH abaixo de 4,0, ou seja, não permite estimar a CT de misturas a partir dos valores de CT de seus componentes.

A tentativa de utilização de medidas como proposta por Van Ooijen (2002), utilizam a CT na parte linear da curva, ou seja, do pH inicial até o pH 5, de forma a serem medidas mais aditivas. Entretanto, o efeito não-linear é maior exatamente na entrada da porção assintótica inferior da curva, que ocorre a partir do pH em torno de 4 e 3,5 (McBurney *et al.*, 1983; Van Soest *et al.*, 1991; Gabert *et al.*, 1995; Warpechowski e Ciocca, 2006).

Considerando a função logarítmica que dá origem à medida do pH (Van Slyke, 1922), a utilização de transformação exponencial poderia ajustar regressões lineares às curvas de titulação dentro da faixa ampla do pH fisiológico no trato

gastrintestinal (8,0 ao 2,0). Medidas da CT obtidas dessa forma poderiam ser suficientemente aditivas para uso na formulação linear, além de resultar em uma única medida que atenda os interesses de formulação para diferentes espécies e momentos da digestão e fermentação no trato gastrointestinal.

A CT dos alimentos tem importante influência nos processos de fermentação e tamponamento ruminal (Van Soest *et al.*, 1991). Em animais não-ruminantes, a CT dos alimentos pode interferir no pH da digesta no trato gastrointestinal (Penz, 1991). Esta atividade pode ser especialmente importante para leitões recém-desmamados, que apresentam baixa capacidade de secreção de HCl, o que resulta em pH gástrico elevado, predispondo o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis (Gabert *et al.*, 1995; Lawlor *et al.*, 2005). A CT dos alimentos tem sido considerada importante modulador do pH em suínos (Penz, 1991) e ruminantes (Van Soest *et al.*, 1991).

O objetivo deste trabalho foi avaliar um método de linearização de curvas de titulação para determinação da CT da fibra de diferentes alimentos em faixas de pH do 8,0 ao 2,0.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados dados individuais não publicados das curvas de titulação da FDN de diferentes alimentos, provenientes de dois trabalhos distintos, a saber: Experimento 1: amostras de aveia branca, aveia preta, azevém, trevo branco e trevo vermelho, obtidas em segundo corte de canteiros experimentais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná durante o inverno de 2007, em Curitiba, PR (Warpechowski *et al.*, não publicado); Experimento 2: amostras de milho, farelo de soja, palha de trigo e as misturas compostas por 65% do milho + 35% do farelo de soja, e desta mistura diluída em 7,5%, 15%, 22,5% e 30 % com a palha de trigo, utilizados no trabalho publicado por Warpechowski e Ciocca (2006).

A fibra dos alimentos utilizada para a determinação da CT no Experimento 1 foi obtida de acordo com a metodologia adotada por Warpechowski e Silva (2006), a partir do resíduo da análise de FDN restante no cadinho de vidro sinterizado, após secagem em estufa de ar forçado a 65°C por uma noite. O teor de MS da FDN dessas amostras foi estimado pela análise de duplicatas, que foram secas em estufa

de ar forçado a 105°C por uma noite, de acordo com procedimento adotado por Warpechowski e Silva (2006). Os resultados do Experimento 1 foram obtidos de duas diferentes parcelas (blocos) colhidas no mesmo dia, enquanto que para o material do Experimento 2 foram analisadas replicatas da mesma amostra.

A separação da FDN dos alimentos provenientes do Experimento 2 foi realizada conforme técnica descrita por McBurney *et al.* (1983), com as modificações descritas por Warpechowski e Ciocca (2006).

Para todos os materiais estudados, a determinação das curvas de titulação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por McBurney *et al.* (1983), utilizando-se 0,4000 a 0,5000 g de amostra suspensa em 50 ml de água destilada e deionizada, de acordo com modificações adotadas por Warpechowski e Ciocca (2006). O pH inicial (pHi) foi determinado em todas as amostras e, para o Experimento 1, foi utilizada solução de NaOH 0,050 N para elevar o pH da mistura até 8,0. Em seguida a mistura foi titulada com HCl até o pH 2,0, sendo utilizado HCl 0,050 N no início da titulação e de 0,100 N até o pH final, enquanto no Experimento 2 foi utilizado apenas HCl com 0,100 N em toda a titulação. No Experimento 1, o pH foi medido após 60 s de estabilização após cada adição de HCl, com volume variável de forma a se obter intervalos de aproximadamente 0,2 pontos de pH. No Experimento 2 foi utilizada adição de volumes fixos de 0,01 ml de HCl, e medição do pH após 30 s de estabilização após cada adição. Os volumes de HCl adicionados foram expressos em mEq/g MS de FDN.

A AT (mEq/g de FDN) nos diferentes intervalos foi obtida como a quantidade de ácido necessária para redução do pH inicial (pHi) da solução até o pH 4,0 (AT₄), 3,0 (AT₃) e 2,0 (AT₂). Em seguida os dados de pH foram transformados através da função $Y = \text{EXP}(1/\text{pH})$, de forma a linearizar a sua relação da concentração de H⁺ em solução, e a medida denominada taxa linear de tamponamento (TLT) foi calculada como o inverso da inclinação da regressão linear entre a medida transformada de pH, como variável dependente, e a quantidade de ácido adicionada, como variável independente. Para a comparação da TLT em diferentes intervalos de pH, a medida foi calculada utilizando as curvas até os pontos de pH 4,0 (TLT₄), 3,0 (TLT₃) e 2,0 (TLT₂).

O coeficiente de determinação ajustado (r^2) e erro padrão residual (EPR) das regressões lineares foram utilizados para avaliar a adequação do método de

linearização das curvas de titulação dos diferentes materiais nos intervalos de pH analisados.

Os resultados de AT e TLT foram submetidos à análise de variância utilizando-se 2 repetições por tratamento, considerando os diferentes materiais, e agrupados pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5 %. Também foi realizada análise de correlação linear entre as diferentes medidas realizadas.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos das medidas pHi, AT e TLT na fibra dos materiais estudados e o r^2 e EPR das regressões lineares ajustadas às curvas de titulação nos diferentes intervalos de pH avaliados estão apresentados nas TABELAS 2.1, 2.2 e 2.3.

TABELA 2.1. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO (DP) DAS MEDIDAS DE pH INICIAL (pHi), ACIDEZ TITULÁVEL (AT₄), TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT₄¹) E DO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO (R₄²) E DO ERRO PADRÃO RESIDUAL (EPR₄) DAS REGRESSÕES LINEARES AJUSTADAS ÀS CURVAS DE TITULAÇÃO DA FDN NO INTERVALO ATÉ O pH 4,0¹

FDN dos Alimentos	pHi ± DP	AT ₄ ² ± DP (mEq H ⁺ /g FDN)	TLT ₄ ² ± DP (mEq H ⁺ /g FDN)	r ₄ ²	EPR ₄
Trevo branco	7,34 ± 0,161	0,379 ^a ± 0,04	2,978 ^a ± 0,38	0,941	0,010
Trevo vermelho	7,85 ± 0,170	0,299 ^{bc} ± 0,00	2,089 ^{bc} ± 0,29	0,940	0,011
Aveia preta	7,09 ± 0,004	0,382 ^a ± 0,08	2,937 ^a ± 0,69	0,857	0,017
Aveia branca	7,45 ± 0,167	0,353 ^{ab} ± 0,02	2,602 ^{ab} ± 0,16	0,939	0,011
Azevém	7,47 ± 0,173	0,253 ^c ± 0,01	1,808 ^c ± 0,30	0,954	0,011
Milho (M)	6,89 ± 0,318	0,091 ^d ± 0,00	0,724 ^d ± 0,02	0,992	0,004
Farelo de soja (FS)	7,62 ± 0,141	0,253 ^c ± 0,01	1,910 ^c ± 0,06	0,987	0,005
Palha de trigo (PT)	7,45 ± 0,120	0,094 ^d ± 0,01	0,806 ^d ± 0,02	0,989	0,004
M + FS	7,38 ± 0,078	0,138 ^d ± 0,01	1,092 ^d ± 0,03	0,994	0,003
MFS + 7,5% PT	7,39 ± 0,078	0,119 ^d ± 0,00	0,993 ^d ± 0,06	0,988	0,004
MFS + 15% PT	7,51 ± 0,049	0,127 ^d ± 0,01	0,911 ^d ± 0,02	0,987	0,005
MFS + 22,5% PT	7,42 ± 0,078	0,111 ^d ± 0,00	0,878 ^d ± 0,04	0,989	0,004
MFS + 30% PT	7,31 ± 0,049	0,100 ^d ± 0,01	0,789 ^d ± 0,05	0,986	0,004
CV%		13,37	16,07		

¹TLT = 1/b, sendo b a inclinação da regressão linear entre o EXP(1/pH) e a adição de ácido.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância.

O pHi da FDN dos alimentos variou no Experimento 1, de 7,85 para o trevo vermelho à 7,09 para a aveia preta, e no Experimento 2, de 7,62 para farelo de soja à 6,89 para o milho (TABELA 2.1). Os resultados obtidos de pHi apresentaram valores elevados (todos acima de 7,0 com exceção do milho). O pHi médio da fração de FDN do milho e do farelo de soja foram mais elevados que os registrados na literatura para amostras integrais desses materiais (Giger-Reverdin *et al.*, 2002;

Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2008). Possivelmente o pH elevado para os materiais analisados está atribuído à contaminação de solução detergente neutro presente no resíduo de FDN avaliado. Conforme registrado por Bockor *et al.* (2008), avaliando amostras integrais de diferentes alimentos, subprodutos e dietas, a fibra do milho foi menor que da fibra dos demais materiais avaliados, semelhante ao ocorrido no presente estudo.

TABELA 2.2. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO (DP) DAS MEDIDAS DE ACIDEZ TITULÁVEL (AT_3), TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT_3^1) E DO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO (R^2_3) E DO ERRO PADRÃO RESIDUAL (EPR_3) DAS REGRESSÕES LINEARES AJUSTADAS ÀS CURVAS DE TITULAÇÃO DA FDN NO INTERVALO ATÉ O PH 3,0¹

FDN dos Alimentos	$AT_3^2 \pm DP$ (mEq H ⁺ /g FDN)	$TLT_3^2 \pm DP$ (mEq H ⁺ /g FDN)	r^2_3	EPR_3
Trevo branco	0,671 ^a ± 0,01	2,557 ^a ± 0,59	0,975	0,012
Trevo vermelho	0,659 ^a ± 0,16	2,649 ^a ± 0,00	0,948	0,017
Aveia preta	0,595 ^{ab} ± 0,03	2,563 ^a ± 0,64	0,941	0,019
Aveia branca	0,609 ^a ± 0,13	2,268 ^{ab} ± 0,26	0,978	0,013
Azevém	0,540 ^{ab} ± 0,19	2,184 ^{ab} ± 0,66	0,955	0,018
Milho (M)	0,171 ^d ± 0,03	0,660 ^d ± 0,06	0,993	0,007
Farelo de soja (FS)	0,416 ^{bc} ± 0,01	1,567 ^{bc} ± 0,04	0,982	0,011
Palha de trigo (PT)	0,181 ^d ± 0,02	0,639 ^d ± 0,03	0,982	0,012
M + FS	0,256 ^{cd} ± 0,01	0,914 ^{cd} ± 0,02	0,989	0,009
MFS + 7,5% PT	0,219 ^d ± 0,01	0,835 ^d ± 0,02	0,989	0,009
MFS + 15% PT	0,212 ^d ± 0,01	0,809 ^d ± 0,02	0,991	0,008
MFS + 22,5% PT	0,205 ^d ± 0,01	0,762 ^d ± 0,01	0,992	0,008
MFS + 30% PT	0,185 ^d ± 0,02	0,695 ^d ± 0,04	0,988	0,008
CV%	21,14	21,21		

¹TLT = 1/b, sendo b a inclinação da regressão linear entre o EXP(1/pH) e a adição de ácido.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância.

A fibra dos materiais avaliados formou grupos similares quanto a AT, com a fibra das forragens apresentando AT maior que a dos outros materiais nas diferentes faixas de pH ($p < 0,05$), com exceção do azevém e farelo de soja que apresentaram valores de AT da fibra próximos e com valor intermediário entre os demais materiais (TABELAS 2.1, 2.2 e 2.3).

Os dados demonstrados neste trabalho apresentaram concordância com os obtidos por Warpechowski e Ciocca (2006) e Bockor *et al.* (2008), os quais observaram que soja obteve valor de AT significativamente maior que de cereais e subprodutos. Nos resultados apresentados de AT, a ordem numérica dos materiais se altera entre as análises realizadas em diferentes intervalos, o que também ocorre em trabalho utilizando dados de AT de alimentos integrais até o pH 4,0 e 3,0, publicado por Lawlor *et al.* (2005), provavelmente devido a não linearidade das

curvas e/ou à presença de componentes com sítios ativos com constante de dissociação iônica (pK) abaixo do pH 4,0.

TABELA 2.3. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO (DP) DAS MEDIDAS DE ACIDEZ TITULÁVEL (AT_2), TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT_2)¹ E DO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO (r^2_2) E DO ERRO PADRÃO RESIDUAL (EPR₂) DAS REGRESSÕES LINEARES AJUSTADAS ÀS CURVAS DE TITULAÇÃO DA FDN NO INTERVALO ATÉ O pH 2,0¹

FDN dos Alimentos	$AT_2 \pm DP$ (mEq H ⁺ /g FDN)	$TLT_2 \pm DP$ (mEq H ⁺ /g FDN)	r^2_2	EPR ₂
Trevo branco	1,680 ^a ± 0,23	2,947 ^{ab} ± 0,49	0,973	0,025
Trevo vermelho	1,697 ^a ± 0,27	3,144 ^a ± 0,40	0,973	0,026
Aveia preta	1,500 ^{ab} ± 0,26	2,743 ^{ab} ± 0,77	0,929	0,041
Aveia branca	1,694 ^a ± 0,41	2,891 ^{ab} ± 0,76	0,961	0,032
Azevém	1,457 ^{ab} ± 0,23	2,453 ^{abc} ± 0,43	0,917	0,050
Milho (M)	0,741 ^{cd} ± 0,13	1,414 ^d ± 0,25	0,876	0,056
Farelo de soja (FS)	1,187 ^{bc} ± 0,09	2,096 ^{bcd} ± 0,07	0,954	0,033
Palha de trigo (PT)	0,669 ^d ± 0,10	1,181 ^d ± 0,13	0,895	0,052
M + FS	0,920 ^{cd} ± 0,10	1,741 ^{cd} ± 0,24	0,901	0,051
MFS + 7,5% PT	0,913 ^{cd} ± 0,09	1,613 ^{cd} ± 0,17	0,886	0,055
MFS + 15% PT	0,907 ^{cd} ± 0,11	1,643 ^{cd} ± 0,19	0,887	0,053
MFS + 22,5% PT	0,878 ^{cd} ± 0,03	1,682 ^{cd} ± 0,08	0,882	0,057
MFS + 30% PT	0,822 ^{cd} ± 0,03	1,478 ^d ± 0,036	0,868	0,057
CV%	16,22	18,34		

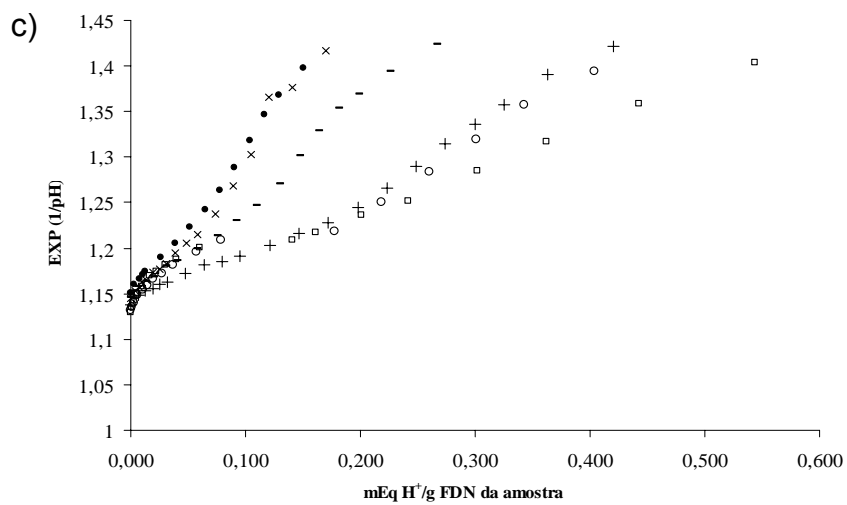
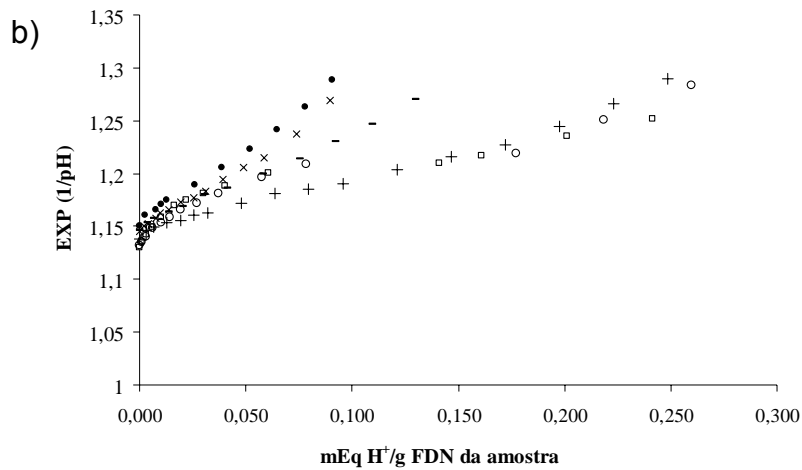
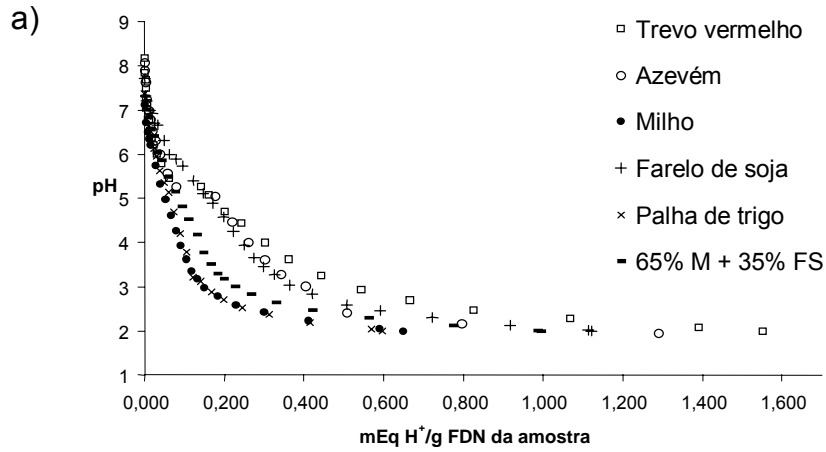
¹TLT = 1/b, sendo b a inclinação da regressão linear entre o EXP(1/pH) e a adição de ácido.

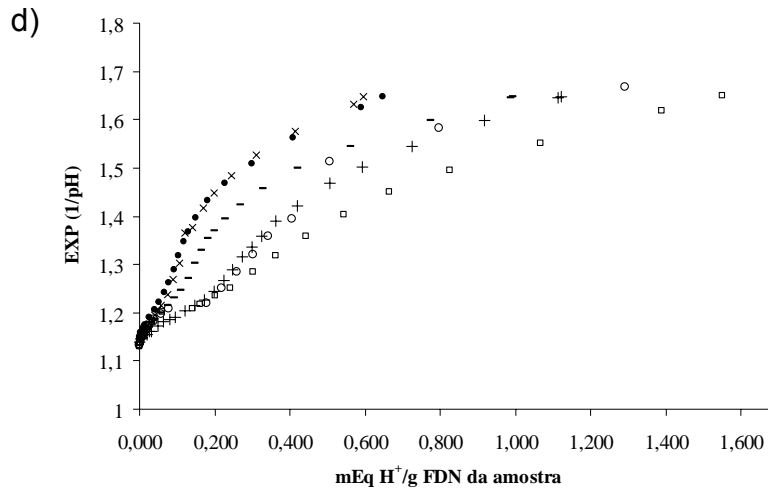
²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância.

A TLT da FDN foi avaliada neste trabalho de acordo com a inclinação da regressão linear. Conforme (Van Slyke, 1922) o pH é definido como logaritmo da concentração de hidrogênio livre em solução. Funções logarítmicas apresentam comportamento curvilíneo, porém, sabe-se que a função exponencial é o inverso do logaritmo neperiano (Steel e Torrie, 1960), dessa forma, com base na origem da função utilizada no cálculo do pH, a transformação exponencial do inverso do pH pôde ser utilizada como alternativa para a linearização. Algumas curvas de titulação no seu formato padrão e as curvas linearizadas utilizadas para cálculo da TLT estão apresentadas na Figura 2.1.

Para medida TLT assim como para a AT, a fibra das forragens apresentou maior CT que as misturas, milho e palha de trigo (TABELAS 2.1, 2.2 e 2.3). Em todos os intervalos avaliados a fibra do FS obteve resultados de TLT semelhantes ao azevém, sendo que para TLT₄ o FS apresentou diferença significativa (p<0,05) em relação aos demais materiais e misturas, para TLT₃ o FS apresentou diferença significativa (p<0,05) em relação às misturas diluídas com PT, e para TLT₂ o FS apresentou valor intermediário, porém só apresenta diferença significativa (p<0,05) em relação ao trevo vermelho (TABELAS 2.1, 2.2 e 2.3).

FIGURA 2.1. CURVAS DE TITULAÇÃO AVALIADAS ATÉ pH 2,0 (a), CURVAS LINEARIZADAS AVALIADAS ATÉ pH 4,0 (b), CURVAS LINEARIZADAS AVALIADAS ATÉ pH 3,0 (c), CURVAS LINEARIZADAS AVALIADAS ATÉ pH 2,0 (d).





O resíduo da FDN pode apresentar níveis variáveis de N e minerais (Warpechowski e Silva 2006), o que pode afetar pH do material em solução aquosa, e também sua CT. É presumível que a presença residual de N e minerais na fração de fibra obtida como FDN dependa da composição inicial do alimento analisado (Oliveira Jr *et al.*, 2008).

De acordo com Annison e Choct (1994) e McBurney *et al.* (1983), o valor de CT normalmente é alto nas pectinas e lignina, variável nas hemiceluloses e proporcionalmente mais baixo na celulose. O que provavelmente pode estar ocorrendo nos resultados apresentados no presente trabalho, onde os materiais forrageiros que possuem teores de lignina mais elevados, apresentaram valores maiores de TLT em relação aos demais materiais.

Normalmente, a fibra insolúvel de fontes leguminosas, como do feno de alfafa e do farelo de soja, apresenta maior CT que de subprodutos e grãos de cereais (McBurney *et al.*, 1986; Warpechowski e Ciocca, 2006). Entretanto, a fibra das leguminosas forrageiras presentes neste trabalho (trevos), não apresentou diferenças significativas em relação à fibra das aveias nos intervalos avaliados.

Os resultados de r^2 ajustado das regressões lineares ajustadas às curvas de titulação da FDN apresentado demonstraram excelente ajuste à regressão linear em todos os intervalos de pH avaliados (TABELAS 2.1, 2.2 e 2.3).

Para os materiais forrageiros (Experimento 1), no intervalo até pH 4,0 o azevém obteve valor médio mais alto para r^2 ajustado (r^2_4) de 0,95, com o valor mais baixo para aveia preta 0,86, ainda suficientemente alto para explicar o comportamento linear da regressão (TABELA 2.1). Para o intervalo avaliado até pH 3,0 o r^2 ajustado (r^2_3) foi maior do que nos demais intervalos, com o maior valor

obtido para aveia preta (0,98) e menor para aveia branca (0,94) (TABELA 2.2). Para o r^2 obtido no intervalo até pH 2,0 (r^2_2), os maiores valores foram para os trevos (0,97) e menor para azevém (0,92) (TABELA 2.3).

Os resultados médios de r^2 do Experimento 2 foram de 0,99 para r^2_4 em todos os materiais avaliados (TABELA 2.1). Os menores valores obtidos de r^2_3 foi para farelo de soja e palha de trigo de 0,98 (TABELA 2.2). Os dados obtidos de r^2_2 sofreram piora considerável, com o menor r^2_2 para a diluição com 30% de palha de trigo de 0,87 e maior para farelo de soja com 0,95 (TABELA 2.3).

Os resultados obtidos de EPR das regressões lineares ajustadas às curvas de titulação da FDN demonstram que o ajuste nos intervalos de pH até 4,0 e 3,0 apresentou menores valores do que o intervalo até 2,0, considerando-se que são valores absolutos (TABELAS 2.1, 2.2 e 2.3). Os maiores resultados obtidos entre os diferentes intervalos do EPR₄ foi de 0,017 para aveia preta (TABELA 2.1), de EPR₃ de 0,019 para aveia preta (TABELA 2.2), e EPR₂ de 0,057 para as diluições com elevado nível de palha (TABELA 2.3).

Considerando-se o r^2 e EPR, os ajustes às regressões lineares foi ligeiramente inferior para o intervalo até pH 2,0, sendo que os materiais com menores valores de TLT, milho, palha de trigo e misturas (Experimento 2), foram os que apresentaram piora mais evidente no r^2 entre os diferentes intervalos, provavelmente ao comportamento curvilíneo das curvas desses materiais serem mais acentuado abaixo do ponto de pH 3,0. Apesar disso, estes piores valores obtidos de r^2 e EPR ainda foram considerados bastante elevados suficientemente para explicar o comportamento linear da regressão.

Os coeficientes de correlação das medidas pH_i, AT₄, AT₃, AT₂, TLT₄, TLT₃, TLT₂ estão apresentados na TABELA 2.4.

TABELA 2.4. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS pH INICIAL (pH_i), ACIDEZ TITULÁVEL (AT) E TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT) NOS INTERVALOS ATÉ O pH 4,0 (AT₄ e TLT₄), 3,0 (AT₃ e TLT₃) e 2,0 (AT₂ e TLT₂).

	pH _i	Prob.	AT ₄	Prob.	AT ₃	Prob.	AT ₂	Prob.	TLT ₄	Prob.	TLT ₃	Prob.
AT ₄	0,15	0,453										
AT ₃	0,21	0,292	0,93	<0,001								
AT ₂	0,23	0,229	0,93	<0,001	0,96	<0,001						
TLT ₄	0,12	0,562	0,99	<0,001	0,89	<0,001	0,88	<0,001				
TLT ₃	0,19	0,363	0,94	<0,001	0,99	<0,001	0,96	<0,001	0,90	<0,001		
TLT ₂	0,21	0,292	0,89	<0,001	0,95	<0,001	0,99	<0,001	0,85	<0,001	0,94	<0,001

¹TLT = 1/b, sendo b a inclinação da regressão entre o EXP(1/pH) e a adição de ácido.

O pH_i não apresentou correlação significativa com nenhuma das variáveis estudadas ($P < 0,05$), o que está de acordo com as informações de Bockor *et al.* (2008), de que não existe correlação consistente entre o pH inicial e a CT dos alimentos (TABELA 2.4).

As variáveis AT e TLT apresentaram correlação linear positiva ($p < 0,001$) em todos os intervalos avaliados, resultando em coeficientes de correlação acima de 0,85 (TABELA 2.4).

Os coeficientes de correlação entre diferentes intervalos de pH avaliado da medida TLT entre TLT₄ e TLT₂ foi de 0,85, e entre TLT₃ e TLT₂ de 0,93. Para a medida AT, o menor valor obtido entre AT₄ e AT₂ foi de 0,93, o mesmo valor entre AT₄ e AT₃, e maior entre AT₃ e AT₂ de 0,96.

Warpechowski e Ciocca (2006), trabalhando com a CT da fibra de cinco ingredientes de dietas para monogástricos, observaram que medidas como AT podem ser potencialmente aditivas, em comparação com outras medidas como a capacidade de troca catiônica, ambas determinadas com metodologia descrita por McBurney *et al.* (1983).

Os coeficientes de correlação entre as medidas pH_i, AT e TLT demonstraram baixa correlação das medidas AT e TLT com pH_i, e alta correlação entre as medidas AT₄, AT₃, AT₂, TLT₄, TLT₃ e TLT₂.

Diferentemente do método proposto por McBurney *et al.* (1983), para a fibra de alimentos, a medida AT normalmente é determinada partindo-se do pH_i até pH desejado (Giger-Reverdin *et al.*, 2002; Bockor *et al.*, 2008). Entretanto, essa forma de medição acarreta em valores de AT dependentes de pH_i do alimento analisado. No presente trabalho o ponto inicial da análise das curvas do Experimento 1 foi fixado para todos os materiais em pH 8,0, e no Experimento 2, os valores obtidos de pH_i da fibra foram todos próximos a 7,0, o que explica a alta correlação das medidas AT e TLT. Materiais que possuam pH_i variável terão conseqüentemente variação na medida AT para qualquer ponto de pH determinado, e portanto, a alta correlação observada entre as medidas AT e TLT no presente trabalho não deve ser esperada com outros materiais. A medida AT é um valor fixo, por outro lado, a medida TLT, quando avaliada pela inclinação de regressão linear, é uma taxa que permite a estimativa desta propriedade em qualquer intervalo de pH dentro da faixa estudada (8,0 ao 2,0). Entretanto, apesar dos altos coeficientes de determinação para o método de linearização utilizado no presente trabalho, o comportamento sigmoidal

da maioria das curvas de titulação obtidas sugere que outros métodos de linearização possam ser ainda mais adequados.

2.5. CONCLUSÃO

A linearização proposta resultou em ajuste satisfatório à regressão linear para a fibra de todos os materiais estudados, permitindo a obtenção de uma taxa linear única que explica a capacidade tamponante em qualquer faixa de valores entre o pH 8,0 e 2,0.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNISON, G.; CHOCT, M. Plant polysaccharides - their physiochemical properties and nutritional roles in monogastric animals. In: Lyons, T. P.; Jacques, K. A. (Eds.). *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's Tenth Annual Symposium. Nottingham: Nottingham University Press.1994, p.51-66.*

BOCKOR, L. et al. Comparação de medidas da capacidade tamponante de matérias primas e dietas utilizadas para leitões. *Archives of Veterinary Science, Curitiba, v.12, n.3, p.71-76. 2007.*

GABERT, V. M. et al. The effect of formic acid and buffering capacity on the ileal digestibilities of amino acids and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs fed semipurified fish meal diets. *Journal of Animal Science, Canadá, v. 75, p. 615-623, 1995.*

GIGER-REVERDIN, S. et al. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology, Paris, v.96, p.83-102, 2002.*

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J.; *Forage Fiber Analyses. Agriculture Handbook nº379, 1970.*

LAWLOR, P.G.; et al.. Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. *Irish Veterinary Journal, Irlanda, v.58, p. 447-452, 2005.*

McBURNEY, M.I, et al. Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibers. *Journal of the Science of Food and Agriculture. New York, v. 34, p. 910-916, 1983.*

MORAN JR. E. T. *Comparative nutrition of fowl and swine. The gastrointestinal systems, 1982.*

OLIVEIRA Jr, J. M. et al. Predição da capacidade tamponante de alimentos a partir da composição química dos mesmos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2008, lavras, MG. *Anais...* SBZ.

PENZ Jr, A. .M. *Hipótesis que justifican el uso de acidos orgânicos en las dietas para aves y cerdos*. *Avicultura profesional*, v.9, n.1,p.46-51, 1991.

STEEL R. G. D.; TORRIE, J. H.; *Principles and procedures of statistics*. Mcgraw-Hill Book Company, INC. New York, Toronto, London. 1960.

VAN SLYKE, D. D. On the measurement of buffer value to the dissociation constant of the buffer and the concentration and reaction of the buffer solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 1922. v.57, p.525-570.

VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber and nonstarch polyssacchaides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991. Savoy, v.74, p.3583-3597.

VAN OOIJEN. Quais os efeitos do Calprona – P adicionado a ração? *Boletim técnico*. Editora Verdugt. Porto Alegre. 2000.

WARPECHOWSKI, M.B. *Efeito do nível e fonte de fibra sobre a concentração e a utilização da energia metabolizável de dietas para frangos de corte em crescimento*. 2005. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WARPECHOWSKI, M. B. et al. Propriedades físico-químicas da fibra em detergente neutro de diferentes palhas de trigo. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.10, n.3, p.38-41, 2005.

WARPECHOWSKI, M. B.; CIOCCA, M. L. S. Propriedades físico-químicas da fibra em detergente neutro de alimentos isolados e misturados. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.11, n.1, p.23-26. 2006.

WARPECHOWSKI, M.B.; SILVA, D.A. Modificação de técnica de determinação da capacidade de troca catiônica da fibra em detergente neutro de alimentos. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 30-33, 2006.

3. COMPARAÇÃO DE MEDIDAS DA CAPACIDADE TAMPONANTE DA FIBRA DE ALIMENTOS

Autor: Juahil Martins de Oliveira Júnior

Orientador: Marson Bruck Warpechowski

RESUMO

Foram avaliadas medidas da capacidade tamponante (CT) da fibra em detergente neutro (FDN) de alimentos. Os materiais experimentais utilizados foi fibra do farelo de soja (FS), milho duro (M), casca de soja (CS) e farelo de trigo (FT), e a mistura composta com 65% M + 35% FS, e esta mistura diluída em 10 e 20% CS, 10 e 20% FT, além de uma mistura com mesma proporção de FS, M, FT e CS. As titulações foram realizadas do intervalo de pH 8,0 ao 2,0. A acidez titulável foi medida de duas formas: como a quantidade de HCl necessária (mEq H⁺/g de FDN) para redução do pH inicial (AT); e partindo-se do pH padronizado em 8,0 (ATP). A medida TLT foi obtida como o inverso da inclinação da regressão linear entre a medida linearizada do pH, e a adição acumulada de HCl em cada intervalo. Todas as análises foram repetidas no tempo (Experimentos 1 e 2). Para avaliação da repetibilidade do método foi utilizada a amplitude entre replicatas dos dados obtidos. Devido as diferenças bromatológicas das preparações de fibra dos materiais entre os dois experimentos, apenas os resultados do experimento 2, das variáveis pH_i, AT, ATP, CT e TLT foram submetidos ao teste de comparação de médias e a avaliação da aditividade. A aditividade dos métodos foi avaliada pela diferença entre os valores medidos e calculados expressos em percentagem dos valores medidos, como também pela comparação das diferenças brutas encontradas em relação à zero. A amplitude entre replicatas foi elevada e variou entre 18,53 para a medida TLT no Experimento 1 e 11,39 para CT no Experimento 2, o que indica a necessidade de maior número de replicatas para a obtenção de valores mais precisos. A Média da diferença bruta obtida dos diferentes métodos e dos intervalo de confiança (95%) e teste de t foram -0,0273 +/-0,1123 para AT (p>0,56), -0,0400 +/-0,1370 para ATP (p>0,49), -0,0083 +/-0,0194 para CT (p>0,32) e -0,0502 +/-0,2425 para TLT (p>0,62). Os resultados obtidos do teste de aditividade para todos os métodos apresentaram exatidão e precisão aceitáveis, com o método proposto TLT obtendo maior probabilidade em relação aos demais, demonstrando melhor exatidão quanto à aditividade.

Palavras-chave: capacidade tamponante, acidez titulável, taxa linear de tamponamento, fibra em detergente neutro, propriedade físico-química.

3.1. COMPARISON OF BUFFERING CAPACITY MEASURES ON FEEDS FIBER

ABSTRACT

Were evaluated measures about buffering capacity (BC) of neutral detergent fiber (NDF) of feed. Were used as experimental material NDF of soybean meal (S), corn (C), soybean hulls (SH) and wheat (W) and the mixture with 65% C + 35% S, and this mixture diluted with 10 and 20% S, 10 and 20% W, and another with 25% of S, C, W and SH. The titrations were performed in the range of pH 8.0 to 2.0. The titratable acidity was measured in two forms as the amount of HCl required (mEq H + / g of NDF) to reduce the initial pH (TA) or based on the pH standard (TAS). The BC measure was calculated by the ratio between TAS and the range of pH. The rate linear buffer (LB) was obtained as the inverse slope of linear regression between the linearized measure of the pH, and cumulative addition of HCl in each interval. All tests were repeated in time (Experiments 1 and 2). The repeatability was evaluated used to scale the data obtained between replicates. Because the differences bromatological of the fiber material between the two experiments, only the results of Experiment 2, the variables pH_i, TA, TAS, BC and LB were to compare the means test and evaluation of additivity. The additivity of the methods was assessed by the difference between the calculated and measured values expressed as a percentage of the measured values, but also by comparing the differences found compared to zero. The range between replicates was high and ranged from 18.53 to LB measured in Experiment 1 and 11.39 for BC in Experiment 2, indicating the need for greater numbers of replicates to obtain more accurate values. The mean difference obtained in different methods and the confidence interval (95%) and the t test was -0.0273 +/- 0.1123 to TA ($p > 0.56$), -0.0400 +/- 0.1370 to TAS ($p > 0.49$), -0.0083 +/- 0.0194 to BC ($p > 0.32$) and, -0.0502 +/- 0.2425 to LB ($p > 0.62$). The results of the test of additivity for all methods had acceptable accuracy and precision, the method proposed TLT getting more likely than the other, showing better accuracy on the additivity.

Key words: buffering capacity, titratable acidity, linear measure, pH, physico-chemical property

3.2. INTRODUÇÃO

A capacidade tamponante (CT) de alimentos é a facilidade de uma molécula reter ou trocar cátions por H⁺, conforme o pH do meio, tendo importante influência na oscilação do pH durante os processos nutricionais no trato digestório de ruminantes e monogástricos (Van Soest, 1991).

Diversas medidas têm sido utilizadas para a determinação da CT em nutrição animal, dentre elas: a titulação direta de amostra em solução aquosa até um valor de pH estipulado (acidez ou alcalinidade titulável, AT) (McBurney *et al.*, 1983; Warpechowski, 1996; Warpechowski *et al.* 2005; Warpechowski e Ciocca, 2006; Bockor *et al.*, 2007); o valor obtido pela razão entre a AT e o intervalo de pH utilizado (McBurney *et al.*, 1983; Gabert *et al.*, 1995; Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2007); e a utilização de parâmetros das curvas de titulação, em que a CT é calculada como uma taxa, como por exemplo pela inclinação da regressão linear obtida entre o pH (Y) e a quantidade adicionada de ácido ou base (X), com ou sem transformação linear (Giger-Reverdin *et al.*, 2002; Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2). As medidas AT e CT têm sido avaliadas em amostras integrais do alimento (Gabert *et al.*, 1995; Giger Reverdin *et al.*, 2002; Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2007) ou na fibra detergente neutro (FDN) dos mesmos (McBurney *et al.*, 1983; Warpechowski, 1996; Warpechowski *et al.*, 2005; Warpechowski e Ciocca, 2006; Oliveira Jr e Warpechowski, 2007). Em monogástricos, para alcançar atividade enzimática ideal e fermentação microbiana benéfica, é necessário que a digesta se encontre em pH adequado (Moran Jr., 1982). No estômago o pH pode ser afetado pela composição total da dieta ingerida pelo animal, incluindo aí as frações digestíveis como a proteína e parte dos minerais (Gabert *et al.*, 1995). Entretanto, no decorrer da digestão e absorção intestinal, as frações digestíveis estão sendo absorvidas (Ferreira, 1994) e, portanto, não estão mais presentes para causar efeito sobre o pH e a CT do meio. Sendo assim, é razoável esperar que medidas da CT nas frações indigestíveis, isto é, a fibra da dieta, resulte em melhor estimativa do efeito da dieta sobre o pH da digesta na porção intestinal do trato digestório de não ruminantes. Os polímeros que compõem a parede celular vegetal possuem grande variedade estrutural e apresentam diferentes grupos funcionais (McDougall *et al.* 1996), resultando em grande variação na atividade nutricional. As diferentes proporções entre constituintes fibrosos como lignina, celulose e hemiceluloses, a composição

destes constituintes e suas estruturas macromoleculares podem afetar diferentemente a CT, devido à quantidade de sítios ativos disponíveis para troca de íons com o meio, como carboxilas, aminas e hidroxilas alifáticas e aromáticas livres (Jeraci e Van Soest, 1990; Van Soest *et al.*, 1991; Annison e Choct, 1994).

A CT obtida como taxa linear de Tamponamento (TLT) calculada como o inverso da inclinação da regressão linear entre a medida transformada de pH, como variável dependente, e a quantidade de ácido adicionada, como variável independente, permite a obtenção de uma taxa linear única que explica a capacidade tamponante em ampla faixa de pH, de modo que atenda os interesses de formulação para diferentes espécies e momentos da digestão e fermentação no trato gastrintestinal (Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2). Além disso, de acordo com Oliveira Jr e Warpechowski (2007), utilizando métodos de linearização das curvas de titulação é possível obter medidas mais aditivas da CT da fibra de alimentos, mesmo em faixas de pH abaixo de 4,0. Entretanto, não foram encontrados na literatura outros trabalhos avaliando medidas da CT obtidas a partir de curvas de titulação linearizadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a repetibilidade e a aditividade de diferentes medidas da capacidade tamponante da fibra de alimentos.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com amostras de alimentos utilizadas na alimentação de suínos providas de Marechal Cândido Rondon em julho do ano de 2008.

Os materiais experimentais utilizados foram a FDN do farelo de soja (FS), milho duro (M), casca de soja (CS) e farelo de trigo (FT), e a FDN de misturas compostas com 65% M + 35% FS, (M + FS) + 20% CS, (M + FS) + 10% CS, (M + FS) + 20% FT, (M + FS) + 10% FT e 25% FS + 25% M + 25% FT + 25% CS. Os alimentos e misturas utilizados foram submetidos à análise bromatológica para a determinação de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), resíduo mineral (RM) e fibra bruta (FB), conforme a AOAC (1995), e para fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina insolúvel em ácido (LIG) de acordo com (Goering e Van Soest, 1970).

A obtenção da fibra dos materiais experimentais foi realizada em quadruplicata, sendo duas para realização das determinações de CT, após secagem a 65 °C por 12 h e duas para determinação da MS a 105 °C, das quais uma foi utilizada para determinação da PB na FDN (Micro-Kjeldahl) e outra para determinação do RM na FDN, a 500 °C, conforme técnica descrita como método alternativo por Warpechowski e Silva (2006). Para a separação de FDN dos materiais com teor esperado de amido maior do que 5% foi utilizada alfa-amilase termoestável (Termamyl 120 L®, Novo Nordisk do Brasil Ltda.). Todas as análises foram repetidas no tempo (Experimentos 1 e 2). No experimento 1 a alfa-amilase foi adicionada na proporção de 2,0 ml/L de solução detergente neutro previamente à extração (Van Soest *et al.*, 1991). No Experimento 2, foram ainda realizadas mais duas adições de 0,1 ml da enzima, uma no final do período de extração e outra na primeira lavagem com água quente, diretamente no cadinho filtrante, mantendo-se repouso por 30 s (Van Soest, *et al.* 1991; Hall, 2000).

A obtenção das curvas de titulação para determinação da CT foi realizada de acordo com a metodologia descrita por McBurney *et al.* (1983), com modificações descritas por (Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2). Para todas as amostras foi determinado o pH inicial (pHi) da fibra do material em solução após estabilização e as curvas de titulação foram realizadas entre o intervalo de pH do 8,0 ao 2,0. A medida acidez titulável foi determinada, partindo-se do pHi (AT), realizada conforme técnica descrita por McBurney *et al.* (1983), e também com pH inicial padronizado em 8,0 (ATP), conforme técnica descrita por Oliveira Jr e Warpechowski (2009; Capítulo 2). A medida CT foi calculada pela razão entre a ATP e o intervalo de pH utilizado, conforme descrito por (Gabert *et al.*, 1995), e a medida TLT determinada de acordo com técnica descrita por Oliveira Jr e Warpechowski (2009; Capítulo 2).

Como houve variação dos resultados obtidos de PB e RM da FDN entre os dois experimentos, estes foram submetidos a análise de variância e ao teste de tukey com 5% de probabilidade. Todas as análises laboratoriais foram feitas em replicatas e realizado análise de variância das medidas pHi, AT e CT para verificação se houve diferença de repetição dentro do material. Para avaliação da repetibilidade e precisão do método foi utilizada a amplitude entre replicatas dos dados obtidos. Devido às diferenças bromatológicas dos materiais experimentais obtido entre os dois experimentos, apenas os resultados do experimento 2, das

medidas pHi, AT, CT e TLT foram submetidos à análise de variância e agrupados pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5 %, como também aos testes de aditividade. A aditividade dos diferentes métodos de determinação da CT foi avaliada de duas formas. Pela diferença entre os valores medidos e calculados expressos em percentagem dos valores medidos, sendo analisado o desvio padrão da diferença, e os coeficientes de regressão e determinação das regressões lineares. Como também foi avaliada pelas diferenças brutas encontradas, que foram submetidos ao teste de t para a avaliação da exatidão da aditividade dos métodos e o intervalo de confiança (95%) foi utilizado para avaliação da precisão desta aditividade.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição dos ingredientes e misturas são apresentadas na TABELA 3.1 e a composição dos resíduos de FDN obtidos é apresentada na TABELA 3.2.

TABELA 3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (VALORES ANALISADOS) DOS INGREDIENTES E MISTURAS¹.

Material	MS%	PB%	RM%	FDN%	FDA%	Lig.%	FB%
Casca de soja	89,80	13,25	4,68	56,55	37,64	2,82	29,34
Farelo de trigo	87,70	13,11	3,80	36,13	8,88	3,35	2,01
Milho	86,39	8,15	0,97	12,83	3,91	2,41	1,68
Farelo de soja	88,09	35,61	4,95	18,85	8,58	2,30	5,32
M + FS ¹	87,17	17,65	2,38	14,41	5,70	2,20	2,97
(M + FS) + 20%CS ²	88,01	17,23	2,67	24,06	11,43	2,52	8,22
(M + FS) + 10%CS ²	87,50	16,65	2,48	18,59	8,63	2,56	5,58
(M + FS) + 20%FT ³	87,42	16,95	2,63	20,06	6,77	2,74	3,57
(M + FS) + 10%FT ³	87,19	18,03	2,42	18,59	6,61	2,56	3,61
M + FS + FT + CS ⁴	88,26	18,25	3,29	30,69	14,10	2,42	9,95

¹M + FS, mistura com 65% milho + 35% farelo de soja; ²mistura diluída com casca de soja na proporção indicada; ³mistura diluída com farelo de trigo na proporção indicada; ⁴M + FS + CS + FT, mistura com 25% milho + 25% farelo de trigo + 25% casca de soja + 25% farelo de soja. MS, matéria seca; PB, proteína bruta; RM, resíduo mineral; FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; Lig, lignina; FB, fibra bruta.

Os resultados da amplitude entre replicatas para as diferentes medidas avaliadas (em % da média) são apresentados na TABELA 3.3. Embora não haja diferença significativa de repetição dentro de material em nenhuma das medidas ($p > 0,97$), a amplitude encontrada foi bastante elevada com exceção apenas para o pHi. O maior valor obtido de amplitude média foi para TLT no Experimento 1 (18,53) e a menor para a medida CT no Experimento 2 (11,39) (TABELA 3.3). Para as

demais medidas, a amplitude variou entre 11,56 e 13,31, indicando a necessidade de maior número de replicatas para a obtenção de valores mais confiáveis (TABELA 3.3).

TABELA 3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FDN SEPARADA DOS MATERIAIS EXPERIMENTAIS.

Material	MS% (média de 2 replicatas)	N% (uma replicata)	RM% (uma replicata)
Experimento 1			
Casca de soja	95,78	11,67	3,36
Farelo de trigo	97,23	9,06	3,32
Milho	94,59	7,23	5,05
Farelo de soja	92,40	20,59	8,66
(M + FS) ¹	93,47	14,24	5,61
(M + FS) + 20%CS ²	93,07	11,02	3,56
(M + FS) + 10%CS ²	92,40	11,64	4,19
(M + FS) + 20%FT ³	93,07	11,59	5,28
(M + FS) + 10%FT ³	92,33	12,84	3,07
(M + FS + FT + CS) ⁴	94,41	8,73	3,50
Média	93,87	11,86	4,56
Experimento 2			
Casca de soja	90,17	8,41	2,87
Farelo de trigo	90,09	7,66	1,27
Milho duro	90,39	6,02	1,19
Farelo de soja	88,78	19,26	6,31
M + FS ¹	90,05	10,60	3,73
(M + FS) + 20%CS ²	91,22	9,90	2,40
(M + FS) + 10%CS ²	94,80	10,72	2,86
(M + FS) + 20%FT ³	89,97	11,27	3,06
(M + FS) + 10%FT ³	95,12	10,21	3,27
M + FS + FT + CS ⁴	95,56	10,62	2,65
Média	91,64	10,46	2,96

¹M + FS, mistura com 65% milho + 35% farelo de soja; ²mistura diluída com casca de soja na proporção indicada; ³mistura diluída com farelo de trigo na proporção indicada; ⁴M + FS + FT + CS, mistura com 25% milho + 25% farelo de trigo + 25% casca de soja + 25% farelo de soja. MS, matéria seca ; N, nitrogênio; RM, resíduo mineral.

Dentre os fatores que podem ter afetado o erro laboratorial pode ser citada a pouca quantidade de resíduo de fibra utilizada para obtenção das curvas de titulação, de aproximadamente 0,5000 g, bem como a necessidade de alterar a quantidade de amostra inicial de alimento para obtenção de resíduo de fibra suficiente para materiais com baixo teor de FDN como o milho. O teor de gordura acima de 10% pode atrapalhar o processo de filtragem da análise de FDN (Van Soest et al., 1991), que juntamente com a análise realizada com maior quantidade de material dificultaram ainda mais o processo de filtragem no Experimento 1, resultando em média de RM nos resíduos de fibra significativamente superior à obtida no Experimento 2, no qual a utilização de amilase foi intensificada ($p < 0,001$).

O resíduo da FDN pode apresentar níveis variáveis de N e minerais (Warpechowski e Silva 2006), o que pode afetar pH do material em solução aquosa,

e também sua CT (Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2). Hall (1997; 2000) cita a contaminação com minerais e a ineficiente solubilização do amido como causas importantes de erro nas análises de FDN. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que problemas ou variações no procedimento de obtenção do resíduo de FDN pode afetar a composição do material final e, conseqüentemente, resultar em artefatos de análise na determinação da CT, como já havia sido observado por Warpechowski e Silva (2006) para a determinação da troca catiônica da fibra de alimentos. Devido a esses problemas, os resultados do Experimento 1 não foram utilizados na análises estatísticas seguintes.

TABELA 3.3. AMPLITUDE DAS MEDIDAS pH INICIAL (pHi), ACIDEZ TITULÁVEL (AT^A, ATP^B), CAPACIDADE TAMPONANTE (CT^C) E PELA TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT^D). OBTIDAS POR DUAS REPETIÇÕES POR MATERIAL EXPERIMENTAL.

Material	pHi	AT	ATP	CT	TLT
Experimento 1					
Casca de soja	1,21	9,60	17,13	10,13	18,01
Farelo de trigo	3,61	15,44	12,88	16,11	15,14
Milho duro	2,29	14,84	11,22	2,61	0,59
Farelo de soja	0,38	20,98	20,72	20,87	48,69
M + FS ¹	0,76	14,58	14,80	11,52	15,32
M + FS + 20%CS ²	3,17	9,87	6,77	9,07	46,64
M + FS + 10%CS ²	0,14	6,01	6,59	6,69	0,67
M + FS + 20%FT ³	2,16	20,66	19,11	20,85	21,58
M + FS + 10%FT ³	0,60	8,02	8,75	9,90	3,66
M + FS + FT + CS ⁴	0,28	6,18	11,64	12,22	15,00
Media	1,46	12,62	11,56	12,00	18,53
Experimento 2					
Casca de soja	3,78	19,39	8,32	8,10	10,43
Farelo de trigo	10,11	15,36	15,44	0,81	16,98
Milho duro	4,44	12,40	12,22	14,13	9,36
Farelo de soja	0,20	5,85	6,11	3,58	1,11
M + FS ¹	0,35	17,15	17,64	18,80	13,20
M + FS + 20%CS ²	8,53	18,14	19,71	22,80	29,37
M + FS + 10%CS ²	1,13	11,44	11,59	12,71	13,41
M + FS + 20%FT ³	1,67	17,83	18,31	18,21	20,37
M + FS + 10%FT ³	0,85	3,67	3,61	3,25	3,50
M + FS + FT + CS ⁴	1,46	11,82	11,80	11,52	9,10
Media	3,25	13,31	12,48	11,39	12,68

^aAT – acidez titulável partindo do pH inicial

^bATP – acidez titulável a partir de pH estipulado (8,00)

^cCT – AT2/intervalo de pH.

^dTLT – 1/b, sendo b a inclinação da regressão linear entre o EXP(1/pH) e a adição de ácido.

¹M + FS, mistura com 65% milho + 35% farelo de soja; ²mistura diluída com casca de soja na proporção indicada; ³mistura diluída com farelo de trigo na proporção indicada; ⁴ M + FS + FT + CS, mistura com 25% milho + 25% farelo de trigo + 25% casca de soja + 25% farelo de soja.

Os resultados obtidos e o teste de comparação de médias das medidas pHi, AT¹ (a partir do pHi), ATP (a partir do pH 8,0), CT e TLT estão apresentadas na TABELA 3.4.

O menor valor de pH_i obtido da fibra dos alimentos foi para a mistura diluída com 20% de casca de soja (6,12) e maior para farelo de trigo (8,19), ambos diferentes estatisticamente dos outros materiais ($P < 0,05$). Entre os demais materiais não houve diferença significativa do pH_i em solução, variando entre 7,05 para a diluição com 20% de farelo de trigo e 7,62 para a mistura com 25% de cada material. Os resultados obtidos de pH_i apresentaram valores próximos entre si e sempre elevados em comparação aos obtidos em outros trabalhos utilizando amostras de alimentos (Giger-Reverdin *et al.*, 2002; Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2008), concordando com os resultados obtidos na fibra de alimentos apresentados por Oliveira Jr e Warpechowski (2009; Capítulo 2), que segundo os autores pode estar atribuído à contaminação de solução detergente neutro presente no resíduo de FDN avaliado.

TABELA 3.4. VALORES MÉDIOS DAS MEDIDAS pH INICIAL (pH_i), ACIDEZ TITULÁVEL (AT, ATP), CAPACIDADE TAMPONANTE (CT) E TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT).

Material	pH _i	AT ^a	ATP ^b	CT ^c	TLT ^d
Casca de soja	7,49 ^b	1,06 ^d	1,00 ^e	0,168 ^e	1,83 ^d
Farelo de trigo	8,19 ^a	1,03 ^d	1,03 ^{de}	0,180 ^{de}	1,83 ^d
Milho duro	7,52 ^b	1,23 ^{cd}	1,23 ^{cde}	0,198 ^{cde}	2,17 ^{cd}
Farelo de soja	7,32 ^b	2,21 ^a	2,25 ^a	0,366 ^a	3,68 ^a
M + FS ¹	7,35 ^b	1,66 ^b	1,68 ^b	0,276 ^b	2,83 ^b
M + FS + 20%CS ²	6,12 ^c	1,55 ^{bc}	1,60 ^b	0,260 ^b	2,69 ^{bc}
M + FS + 10%CS ²	7,42 ^b	1,50 ^{bc}	1,51 ^{bc}	0,249 ^{bc}	2,68 ^{bc}
M + FS + 20%FT ³	7,05 ^b	1,41 ^{bc}	1,43 ^{bc}	0,235 ^{bcd}	2,39 ^{bcd}
M + FS + 10%FT ³	7,53 ^b	1,44 ^{bc}	1,45 ^{bc}	0,240 ^{bc}	2,38 ^{bcd}
M + FS + FT + CS ⁴	7,62 ^b	1,33 ^{bcd}	1,34 ^{bcd}	0,221 ^{bcd}	2,33 ^{bcd}
CV%	3,31	9,65	9,57	9,83	10,50

^aAT – acidez titulável partindo do pH inicial

^bATP – acidez titulável a partir de pH estipulado (8,00)

^cCT – AT2/intervalo de pH.

^dTLT – $1/b$, sendo b a inclinação da regressão linear entre o $\text{EXP}(1/\text{pH})$ e a adição de ácido.

¹M + FS, mistura com 65% milho + 35% farelo de soja; ²mistura diluída com casca de soja na proporção indicada; ³mistura diluída com farelo de trigo na proporção indicada; ⁴ M + FS + FT + CS, mistura com 25% milho + 25% farelo de trigo + 25% casca de soja + 25% farelo de soja.

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

A medida AT foi determinada de 2 formas, a partir do pH_i (AT) e do pH padronizado (ATP). Para a medida AT e ATP os maiores valores obtidos foram para o farelo de soja (2,21 e 2,25) e os menores para casca de soja (1,06 e 1,00) e farelo de trigo (1,03 e 1,03) respectivamente (TABELA 3.4). A fibra do milho utilizada neste experimento apresentou valor de AT (1,23) mais elevado que o esperado em relação ao valor encontrado na literatura (0,741) utilizando-se o mesmo intervalo de pH (Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2). As demais misturas permaneceram

com valores intermediários, sendo menor do que o farelo de soja e maior do que farelo de trigo e casca de soja ($p < 0,05$) (TABELA 3.4).

A acidez titulável foi obtida neste trabalho a partir do pH_i (AT) de acordo com diversos autores (McBurney *et al.*, 1983; Warpechowski, 1996; Warpechowski *et al.* 2005; Warpechowski e Ciocca, 2006; Bockor *et al.*, 2007), como também a partir de pH fixo 8,0 (ATP). A medida AT determinada partindo-se do pH_i até pH desejado acarreta em valores de AT dependentes de pH_i do material analisado (Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2), o que de acordo com o mesmo autor melhora a correlação da medida quando avaliada em outras faixas de pH. A modificação do método não alterou a ordem e diferenças significativas entre os materiais. Entretanto, o CV da medida ATP foi melhor que as demais medidas, o que pode ser explicado pela padronização do pH_i da fibra dos materiais experimentais. Apesar disso, na medida AT, todos os valores de pH_i foram próximos, variando de 6,12 a 8,19, em uma faixa em que o tamponamento é muito pequeno (TABELA 3.4). Entretanto, os valores obtidos de pH_i do alimento são bastante variáveis (Bockor *et al.*, 2007), diferentemente do pH_i da fibra de alimentos (Oliveira Jr e Warpechowski, 2009; Capítulo 2). Logo, se a análise for realizada diretamente em alimentos, se espera que a medida ATP seja mais apropriada.

A medida CT da fibra dos alimentos avaliados neste trabalho variou entre 0,366 para o farelo de soja e 0,168 para a casca de soja (TABELA 3.4). A CT da fibra da mistura diluída em 20% de farelo de trigo não apresentou diferenças significativas em relação à das fibras de milho e farelo de trigo sendo maior apenas que a da casca de soja. Já a fibra da mistura com 25% de cada material, apresentou valores de CT maiores que os obtidos para as de casca de soja e farelo de trigo ($P < 0,05$) (TABELA 3.4). Para a fibra de todas as demais misturas, os valores de CT foram intermediários, menores que do farelo de soja e maiores que os demais ingredientes isolados ($P < 0,05$) (TABELA 3.4). Com exceção da mistura diluída em 20% de FT, os resultados obtidos mantiveram o mesmo comportamento e ordem de classificação das medidas AT e ATP.

A TLT apresentou comportamento semelhante às demais medidas. A fibra do farelo de soja obteve o maior valor de TLT (3,68), sendo os menores valores obtidos para fibra da casca de soja (1,83) e farelo de trigo (1,83) (TABELA 3.4). A fibra do milho apresentou valores de TLT intermediário entre as misturas diluídas com casca de soja, as misturas diluídas com farelo de trigo e a mistura diluída com 25% de

cada material, apresentando diferença significativa em relação a mistura constituída de 65% farelo de milho e 35% farelo de soja ($P < 0,05$) (TABELA 3.4). Os resíduos das misturas com 65% milho + 35% farelo de soja e das misturas diluídas em casca de soja apresentaram valores de TLT maiores que a casca de soja e farelo de trigo e menores que o farelo de soja ($P < 0,05$) (TABELA 3.4).

Os resultados obtidos da análise estatística e do teste de comparação de médias demonstram que as medidas ATP e CT foram ligeiramente mais sensíveis do que as medidas AT e TLT (TABELA 3.4). Além disso, a medida ATP apresentou menores valores no coeficiente de variação que as demais medidas, o que demonstra melhor homogeneidade dos dados obtidos (TABELA 3.4).

Os registros da literatura apontam valores maiores de AT e CT em amostras do alimento integral de farelo de soja do que de cereais (Giger Reverdin *et al.*, 2002; Lawlor *et al.*, 2005; Bockor *et al.*, 2007), e o mesmo ocorre a FDN desses alimentos (Warpechowski, 1996; Warpechowski *et al.*, 2005; Warpechowski e Ciocca, 2006; Oliveira Jr e Warpechowski, (2007). De acordo com Oliveira Jr *et al.*, (2008), a quantidade residual de elementos como N e minerais na fração do resíduo obtido pela análise de FDN depende da composição inicial do alimento analisado. Neste trabalho, os valores obtidos do farelo de soja foram numericamente mais elevados quanto ao RM e N analisado no alimento, como no resíduo obtido da análise de FDN, o que explica os valores mais elevados da CT.

De acordo com Annison e Choct (1994) e McBurney *et al.* (1983), avaliando alimentos para ruminantes, em especial forragens, o valor de CT normalmente é alto nas pectinas e lignina, variável nas hemiceluloses e proporcionalmente mais baixo na celulose. Entretanto, conforme os dados apresentados, este conceito não se aplica nos alimentos concentrados como farelo de soja e cereais utilizados neste trabalho. No resíduo do FDN os componentes teoricamente remanescentes são celulose, hemicelulose e lignina (Goering e Van Soest, 1970; Carré, 1985; Hall, 1997). Logo, os valores dos níveis de lignina dos alimentos apresentados obtidos foram maiores numericamente para farelo de trigo (TABELA 3.1), que obteve os menores valores de AT, ATP, CT e TLT (TABELA 3.4). Esses resultados demonstram que além dos minerais e N, a composição da hemicelulose restante da análise da FDN (que é bastante variável) dos alimentos estudados neste experimento pode apresentar tamponamento proporcionalmente mais importante que as outras frações remanescentes da fibra.

De acordo McBURNEY (1986) as pectinas também se relacionam com a capacidade de troca catiônica e a capacidade tamponante da fibra vegetal devido as ligações dos íons metálicos a sua estrutura macromolecular. As pectinas ou substâncias pécticas são polímeros de ácido β (1-4) D-galacturônico e estão presentes primordialmente na lamela média e parede primária da célula vegetal, servindo de elemento cimentante de membrana (Ferreira, 1994; Carré, 2002). Devido a essa estrutura molecular, as pectinas possuem grande número de sítios ativos com alta reatividade, os quais formam pontes de ligação entre cadeias por meio de cátions bivalentes (Ca, Mg), os quais são extraídos por substâncias quelantes, como o EDTA, tornando essa fração solúvel na solução de detergente neutro (Van Soest, 1994). Na análise de FDN, o resíduo obtido neste procedimento utilizado, alguns componentes importantes para a avaliação da CT como parte da fibra solúvel e pectina são solubilizados. Entretanto, não foram registrados na literatura, tentativas de avaliação da CT realizada na fibra do material provida de outros métodos de avaliação da fibra, os quais provavelmente apresentem melhor relação com a CT da fibra dos alimentos. O método desenvolvido por Carré e Brillouet (1989), denominado de parede celular insolúvel em água (PCIA), determina compostos como celulose, hemicelulose, lignina e pectina. Outro método desenvolvida por Prosky et al. (1984), determina a fibra total, solúvel e insolúvel da dieta. Estas medidas, por incluírem a fração de polissacarídeos não amiláceos solúveis e as pectinas, parecem ser medidas mais interessantes para a caracterização da CT da fibra de alimentos

Os resultados obtidos dos valores medidos e calculados para as medidas AT, ATP, CT e TLT das misturas e a comparação da aditividade dos métodos são apresentados nas TABELAS 3.5 e 3.6. De acordo com Oliveira Jr e Warpechowski (2008), embora tenham sido publicados trabalhos com ajuste de equações não-lineares (Giger-Reverdin *et al.*, 2001), não foram encontrados registros de avaliações da aditividade de medidas linearizadas da CT.

A diferença média em percentagem entre valores medidos e calculados variou de 5,05% para AT e 7,13% para TLT (TABELA 3.5). O desvio padrão da diferença medida foi maior para a medida ATP (6,18) e menor para a medida AT (5,04) (TABELAS 3.5 e 3.6). O coeficiente de regressão das regressões lineares entre os valores medidos e calculados foi menor para TLT (0,42) e maior para AT (0,54), com as demais medidas apresentando valores intermediários, e o coeficiente

de determinação foi de 0,49 para a medida AT, 0,42 para CT, 0,38 para ATP e 0,25 para a medida TLT (TABELAS 3.5 e 3.6).

TABELA 3.5. DIFERENÇA ENTRE VALORES DAS MEDIDAS ACIDEZ TITULÁVEL (AT) E ACIDEZ TITULÁVEL PADRONIZADA (ATP) MEDIDOS E CALCULADOS NA FIBRA DE MISTURAS DE ALIMENTOS (EM PERCENTAGEM DA MÉDIA E DIFERENÇA BRUTA), DESVIO PADRÃO (DP) DA DIFERENÇA, COEFICIENTE DE REGRESSÃO (X) E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (r^2) DAS MISTURAS ANALISADAS.

Material	AT _m	AT _c	D%	DB	ATP _m	ATP _c	D%	DB
M+FS*	1,66	1,66	0,18	0,003	1,68	1,68	0,44	0,007
M+FS + 20% Casca de Soja (CS)	1,55	1,36	12,25	-0,190	1,60	1,35	15,61	-0,249
M+FS + 10% Casca de Soja (CS)	1,50	1,48	1,45	-0,022	1,51	1,48	1,91	-0,029
M+FS + 20% Farelo de trigo (FT)	1,41	1,42	0,58	0,008	1,43	1,43	0,30	0,004
M+FS + 10% Farelo de trigo (FT)	1,44	1,57	8,97	0,129	1,45	1,58	9,59	0,139
25%M + 25%FS + 25%FT + 25%CS	1,33	1,24	6,88	-0,092	1,34	1,22	8,35	-0,112
Média			5,05	-0,027			6,03	-0,040
DP			5,04				6,18	
X			0,54				0,46	
r^2			0,49				0,38	

AT_m, acidez titulável medida; AT_c, acidez titulável calculado.

D%, diferença em percentagem entre os valores determinados e estimados em relação aos valores calculados.

DB, diferença bruta entre os valores determinados e estimados.

*mistura constituída por 65% milho duro e 35% farelo de soja

TABELA 3.6. DIFERENÇA ENTRE VALORES DAS MEDIDAS CAPACIDADE TAMPONANTE (CT) E TAXA LINEAR DE TAMPONAMENTO (TLT) MEDIDOS E CALCULADOS NA FIBRA DE MISTURAS DE ALIMENTOS (EM PERCENTAGEM DA MÉDIA E DIFERENÇA BRUTA), DESVIO PADRÃO (DP) DA DIFERENÇA, COEFICIENTE DE REGRESSÃO (X) E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (r^2) DAS MISTURAS ANALISADAS.

Material	CT _m	CT _c	D%	DB	TLT _m	TLT _c	D%	DB
M+FS*	0,28	0,27	1,29	-0,004	2,83	2,84	0,49	0,014
M+FS + 20% Casca de Soja (CS)	0,26	0,22	15,06	-0,039	2,69	2,34	13,13	-0,353
M+FS + 10% Casca de Soja (CS)	0,25	0,24	3,45	-0,009	2,68	2,53	5,60	-0,150
M+FS + 20% Farelo de trigo (FT)	0,24	0,24	0,65	0,002	2,39	2,45	2,61	0,062
M+FS + 10% Farelo de trigo (FT)	0,24	0,26	6,83	0,016	2,38	2,69	13,03	0,311
25%M + 25%FS + 25%FT + 25%CS	0,22	0,20	7,42	-0,016	2,33	2,14	7,92	-0,185
Média			5,78	-0,008			7,13	-0,050
DP			5,33				5,26	
X			0,52				0,42	
r^2			0,42				0,25	

CT_m, capacidade tamponante medida, CT_c, Capacidade tamponante calculada.

TLT_m, Taxa linear de tamponamento medida, TLT_c, Taxa linear de tamponamento calculada.

D%, diferença em percentagem entre os valores determinados e estimados em relação aos valores calculados.

DB, diferença bruta entre os valores determinados e estimados.

*mistura constituída por 65% milho duro e 35% farelo de soja

Avaliando os resultados obtidos da diferença média em percentagem, embora a diferença entre os valores determinados e calculados permanecerem próximos entre as diferentes medidas utilizadas (AT, ATP, CT e TLT), a medida determinada como TLT não apresentou melhora no desvio padrão da diferença medida, bem

como não melhorou os valores do coeficiente de regressão e de determinação, que foram baixos para todas as medidas. Entretanto, este tipo de avaliação pode apresentar problemas, e a qualidade desta avaliação depende do número de amostras e da amplitude entre o maior e menor valor, que neste caso é pequena devido a utilização de apenas 6 amostras. Outro aspecto importante, neste trabalho foram utilizadas somente duas replicatas para a obtenção da média, sendo esperado que com maior número de replicatas seja possível melhorar os resultados de repetibilidade, e com maior número de amostras seja possível melhorar os coeficientes do teste de aditividade para todas as medidas.

A Média da diferença bruta obtida dos diferentes métodos e dos respectivos intervalo de confiança e do teste de t foram de -0,0273 +/-0,1123 para AT ($p>0,56$), -0,0400 +/-0,1370 para ATP ($p>0,49$), -0,0083 +/-0,0194 para CT ($p>0,32$) e de , -0,0502 +/-0,2425 para TLT ($p>0,62$) (TABELAS 3.5 e 3.6).

Ao avaliar a diferença bruta entre os valores calculados e medidos, os resultados obtidos do teste de aditividade para todos os métodos apresentaram exatidão e precisão aceitáveis. Não houve diferença significativa de nenhuma das variáveis avaliadas em relação a zero com nível de significância a 5%, indicativo de que todos os métodos utilizados para determinação da CT demonstraram ser potencialmente aditivos, porém, o método proposto TLT apresentou maior valor de probabilidade em relação aos demais, apresentando melhor exatidão quanto à aditividade.

3.5. CONCLUSÃO

É possível avaliar a capacidade tamponante da fibra de alimentos utilizando diferentes métodos, mas é necessário maior número de replicatas para a obtenção de resultados com menor amplitude e maior precisão dos dados experimentais.

Todos os métodos utilizados para a determinação da capacidade tamponante demonstraram ser potencialmente aditivos.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNISON, G.; CHOCT, M. Plant polysaccharides - their physiochemical properties and nutritional roles in monogastric animals. In: Lyons, T. P.; Jacques, K. A. (Eds.). *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's Tenth Annual Symposium. Nottingham: Nottingham University Press. 1994, p.51-66.*

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*. 16ed. Washington, 1995 . v.2, cap.2, p.5-9.

BOCKOR, L. et al. Comparação de medidas da capacidade tamponante de matérias primas e dietas utilizadas para leitões. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.12, n.3, p.71-76. 2007.

CARRÉ, B. Les parois vegetales, significations chimique et nutritionnelle chez les volailles. In: De La Conférence Avicole W.P.S.A. – S.I.M.A.V.I.P., 1985. p.12-25.

CARRÉ, B.; BRILLOUET, J.-M. Determination of water-insoluble cell walls in feeds: interlaboratory study. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, Washington, v.72, n.3, p.463-467, 1989.

FERREIRA, W. M. Os componentes da parede celular vegetal na nutrição de não-ruminantes. Simpósio Internacional de Produção de Não-Ruminantes. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 31., 1994, Maringá. **Anais...** Maringá, SBZ. p.85-113.

GABERT, V. M. et al. The effect of formic acid and buffering capacity on the ileal digestibilities of amino acids and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs fed semipurified fish meal diets. *Journal of Animal Science*, Canadá, v. 75, p. 615-623, 1995.

GIGER-REVERDIN, S. et al. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, Paris, v.96, p.83-102, 2002.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J.; *Forage Fiber Analyses*. Agriculture Handbook nº379, 1970.

McDOUGALL, G. J.; et al. Plant cell walls as dietary fibre : range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 70, p.133-150, 1996.

HALL, M.B.; et al. A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v.74, p.441-449, 1997.

HALL, M.B. *Neutral detergent-soluble carbohydrates, Nutritional relevance and analysis: a laboratory manual*. Gainesville: University of Florida, 2000. 42p. (Bulletin, 339).

JERACI, J.L.; VAN SOEST, P.J. Improved methods for analysis and biological characterization of fiber. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, v.270, p.245-263, 1990.

LAWLOR, P.G.; et al. Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. *Irish Veterinary Journal*, Irlanda, v.58, p. 447-452, 2005.

McBURNEY, M.I., et al. Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. New York, v. 34, p. 910-916, 1983.

MORAN JR. E. T. *Comparative nutrition of fowl and swine. The gastrointestinal systems*, 1982.

OLIVEIRA Jr, J. M.; WARPECHOWSKI, M. B.; Avaliação da aditividade de medida linearizada da capacidade tamponante da fibra de alimentos. In: I Simpósio Sul Brasileiro de Ovinos e Caprinos. 2007, Curitiba, PR.

OLIVEIRA Jr, J. M. et al. Predição da capacidade tamponante de alimentos a partir da composição química dos mesmos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2008, lavras, MG. **Anais...** SBZ.

PROSKY, L.; ASP, N.-G.; FURDA, I.; DE VRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.F.; HARLAND, B. The determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v.67, p.1044-1052, 1984.

VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991. Savoy, v.74, p.3583-3597.

WARPECHOWSKI, M.B. *Efeito do nível e fonte de fibra sobre a concentração e a utilização da energia metabolizável de dietas para frangos de corte em crescimento*. 2005. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WARPECHOWSKI, M. B. et al. Propriedades físico-químicas da fibra em detergente neutro de diferentes palhas de trigo. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.10, n.3, p.38-41, 2005.

WARPECHOWSKI, M. B.; CIOCCA, M. L. S. Propriedades físico-químicas da fibra em detergente neutro de alimentos isolados e misturados. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.11, n.1, p.23-26. 2006.

WARPECHOWSKI, M.B.; SILVA, D.A. Modificação de técnica de determinação da capacidade de troca catiônica da fibra em detergente neutro de alimentos. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 30-33, 2006.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível avaliar a capacidade tamponante de alimentos utilizando novo método de linearização das curvas de titulação.

A quantidade de N e minerais presentes no resíduo fibroso da análise de fibra em detergente neutro podem afetar consideravelmente a análise das curvas de titulação.

A nova medida proposta denominada de taxa linear de tamponamento apresentou ajuste satisfatório à regressão linear para a fibra de alimentos.

A amplitude dos resultados obtidos das replicatas para todos os métodos avaliados foi elevada, o que sugere a necessidade de maior número de replicatas das curvas de titulação para a avaliação da capacidade tamponante.

Todas as medidas apresentaram correlação linear positiva entre as medidas acidez titulável e a nova medida proposta, mesmo quando avaliadas em diferentes faixas de pH.

Todos os métodos utilizados para a determinação da capacidade tamponante (AT, ATP, CT e TLT) demonstraram ser potencialmente aditivos.

A avaliação da CT pela taxa linear de tamponamento permite a obtenção de uma taxa linear única que explica a capacidade tamponante em ampla faixa de pH, o que provavelmente melhora a correlação com outras medidas aplicada aos alimentos.

A avaliação da CT obtida do resíduo da análise de fibra em detergente neutro dos alimentos pode ser realizada no material obtido por outros métodos, que incluem a fração de polissacarídeos não amiláceos solúveis e as pectinas, componentes da fibra que possuem importante influência na capacidade tamponante de alimentos.