

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

*"Estágio no Laboratório de Nutrição Animal na Empresa Brasileira
de Pesquisa Agropecuária - Rotina laboratorial de análises
bromatológicas"*

Heinrich Moreira Sahm
Estágio em Química
Relatório Final

São Carlos
Outubro, 2022

Dados do Aluno/Estagiário:

Heinrich Moreira Sahm

Ênfase em Química de Materiais

Período do Estágio: 15/07/2022 até 16/11/2022

Docente Responsável:

Prof^a. Dr^a. Marcia Nitschke

Dados da Empresa:

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Laboratório de Nutrição Animal (Setor da Empresa-Local do Estágio)

Rodovia Washington Luiz km 234 s/nº, Fazenda Canchim

CEP: 13560–970 São Carlos, SP

Outros dados relevantes da Empresa:

www.embrapa.br

Dados do Supervisor do Estágio:

Supervisor Reinivaldo Sergio Ferraz Junior

Analista A

(16) 98219-0919

reinivaldo.ferraz@embrapa.br

São Carlos

Outubro / 2022

1. Introdução

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária foi criada em 1973 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de desenvolver a base tecnológica de um modelo de agricultura e pecuária genuinamente tropical.

A unidade localizada em São Carlos é denominada Embrapa Pecuária Sudeste e está instalada na Fazenda Canchim. Esta unidade foca no desenvolvimento de pesquisas e testes para garantir a qualidade e controle nas cadeias produtivas da pecuária de corte e de leite de bovinos e ovinos. Seus trabalhos pioneiros de melhoramento genético em bovinos é de grande destaque, bem como a identificação de marcadores moleculares para segurança e qualidade dos produtos de alimentação do Brasil e, ainda, desenvolvimento de materiais de referência para auxílio no controle de qualidade de laboratórios agropecuários de todo o país.

2. Atuação do estagiário

Durante a atuação, foram feitas análises bromatológicas do teor de nutrientes em amostras de alimentos para nutrição animal, provenientes das pesquisas realizadas na Embrapa. A maior parte das amostras eram plantas forrageiras, as quais são coletadas no campo e então passam por um processo de preparo. A partir daí, elas seguem para as análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e proteína bruta pelo método de Kjeldahl.

Além disso, grande parte das amostras de forrageira também eram analisadas por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) já que com os resultados obtidos das análises clássicas descritas anteriormente foi possível criar um modelo para prever esses parâmetros para as matrizes de forrageira, sendo elas: Brachiaria, Paspalum, Panicum e Alfafa.

Por fim, também foi feita análise por injeção em fluxo (FIA) com amostras de solo lixiviado com o objetivo de determinar concentrações de amônio por cm³ de solo.

3. Procedimentos experimentais

3.1. Determinação de matéria seca (MS)

A determinação de matéria seca se dá a partir da evaporação de água presente em uma amostra de massa conhecida, através da ação do calor em estufa de esterilização e secagem. A exatidão na determinação de matéria seca é extremamente importante, pois a partir dos resultados dessa análise é que se baseiam os cálculos e correções para os teores dos demais parâmetros bromatológicos analisados.

Primeiramente, pesa-se a amostra em um cadinho de porcelana na balança analítica. Então, a amostra é levada para a estufa a 105°C por cerca de 12 horas e então é feita a pesagem novamente para obter a relação entre as massas da amostra seca e da amostra original.

3.2. Determinação de matéria mineral (MM)

Nesta determinação, a amostra passa por processo similar ao descrito anteriormente, exceto que desta vez ela é levada para uma mufla com uma rampa de queima. Neste procedimento ocorre a calcinação da amostra, eliminando a matéria orgânica por volatilização, e o que sobra é somente a fração inorgânica, denominada de cinzas. O resultado final é obtido através da relação entre a massa inicial pesada de amostra e a massa das cinzas restantes.

3.3. Determinação de proteína bruta (PB)

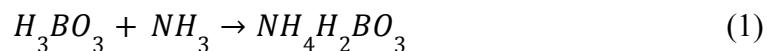
Esse procedimento é baseado no método de digestão de Kjeldahl, e ele é uma estimativa da quantidade de nitrogênio total que consiste na digestão da amostra por ácido sulfúrico a 400°C e determinação de nitrogênio por destilação por arraste de vapor seguida de titulação (Nogueira e Souza, 2005).

É feita a pesagem da amostra, e esta quantidade é transferida para um tubo de ensaio onde irá passar por três etapas: digestão, destilação e titulação.

Na primeira etapa, é adicionado sulfato de sódio/sulfato de cobre mistura 10:1 que atua como catalisador para o ácido sulfúrico concentrado que é adicionado em seguida. Este último decompõe a matéria orgânica, reagindo com a amostra e convertendo o nitrogênio em sulfato de amônio. Então o tubo é colocado em um bloco de aquecimento a 400°C, até que a mistura contida nele fique incolor.

Na etapa seguinte, é adicionado solução de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹, a qual reage com o sulfato de amônio proveniente da digestão liberando amônia na forma gasosa. Esta é conduzida por arraste de vapor para um erlenmeyer contendo

ácido bórico e indicador de pH, os quais reagem e formam solução de borato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$).



Todo esse processo é realizado no destilador de nitrogênio como mostra a figura a seguir.



Figura 1. Destilador de nitrogênio MA-036. Fonte: autoria própria.

Por fim, a solução de borato de amônio é titulada com ácido sulfúrico 0,025N, e a quantidade de nitrogênio é calculada a partir do volume de ácido utilizado para converter novamente o nitrogênio em sulfato de amônio.

3.4. Análise de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA)

Tanto na análise FDN quanto na FDA, a amostra é pesada e transferida para um saquinho de TNT e este é selado. A seguir, o saquinho é colocado em um reator onde são adicionados cerca de 1,8 litros de detergente neutro (no caso da FDA, o detergente utilizado é preparado com ácido sulfúrico) e ativa-se a rotação e o aquecimento do reator até que a temperatura chegue a 100°C durante 1 hora e 15 minutos. Passado esse tempo, o detergente é descartado e adiciona-se água deionizada

ao reator, novamente sob agitação e aquecimento, porém desta vez a 90°C durante mais 15 minutos. Essa é a etapa de lavagem, e ela é repetida mais duas vezes. Por fim, os saquinhos são retirados e levados a um béquer com acetona, e finalmente são deixados em uma bandeja até secarem para que possam ser pesados depois.

O detergente neutro utilizado reage com a amostra e solubiliza o conteúdo celular até que sobre só a fibra. Esta é constituída por polissacarídeos, proteínas, lignina, etc. O que resta da reação é somente o resíduo insolúvel, denominado de fibra (NOGUEIRA; SOUZA; BATISTA, 2006).

O detergente ácido garante a solubilização de constituintes menos solúveis da parede celular, como a lignina, proteínas que não são solubilizadas no detergente neutro, cinzas, celulose e sílica. O resíduo do processo é o nitrogênio lignificado e a celulose. A lignina é uma macromolécula que se associa à celulose, conferindo rigidez e estabilidade à parede celular das plantas. Devido à essa propriedade, a digestão da mesma se torna difícil para os animais ruminantes, e por isso é importante determinar o seu teor nas amostras de forrageira. Dito isso, a partir da análise FDA, é feita a determinação de lignina com o uso de solução de ácido sulfúrico 72%.



Figura 2. Reator Ankom para análise FDN/FDA. Fonte: autoria própria.

3.5. Análise de injeção em fluxo (FIA)

A análise de injeção em fluxo é um método de fluxo contínuo, em que a amostra é carregada através de uma alça por uma solução aquosa até um detector. A solução aquosa passa através do sistema de alças (tubos finos) graças a uma bomba peristáltica. A figura a seguir mostra o esquema utilizado para determinar amônio utilizando FIA e um espectrofotômetro Pharmacia (NOGUEIRA; SOUZA; BATISTA, 1996; LEMOS; NOGUEIRA; SOUZA, 2002; WANG et al., 2017).

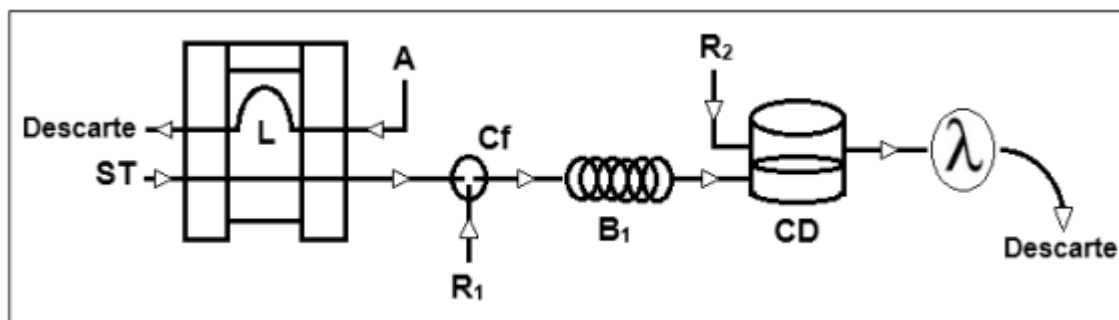
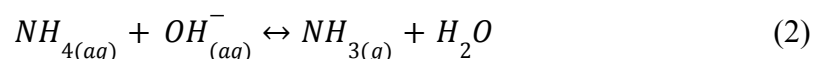


Figura 3. Diagrama de fluxo para a determinação de nitrogênio amoniacal.

Em que A é a amostra; L alça de amostragem, a qual possui 50 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,9 mm; R₁ é a solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em meio 0,1% EDTA; R₂ é o indicador púrpura de bromocresol; ST é a solução transportadora, no caso utiliza-se água destilada; Cf é a confluência; B₁ é a bobina de mistura; CD é a câmara de difusão; λ é o espectrofotômetro VIS com célula de fluxo com caminho óptico de 1cm.

O sistema funciona com a amostra sendo inserida no fluxo transportador, e então recebe, por confluência, o reagente R₁ (NaOH) e passa para a bobina de mistura. Nela, todo o amônio é convertido em amônia, como mostra a reação a seguir.



A solução com o gás amônia é transportada para a câmara de difusão gasosa (CD) com membrana seletiva para difusão de gases. O gás amônia é coletado pela solução BCP a pH 5,9 e direcionada ao espectrofotômetro. O comprimento de onda utilizado para detecção é 590 nm.

As amostras são preparadas pesando-se 5 gramas de solo, adiciona-se solução KCl 2 mol L⁻¹ e então filtra-se essa solução. A amostra analisada é o líquido filtrado resultante.

4. Resultados e discussões

4.1. Determinação de matéria seca (MS) e matéria mineral

A determinação de matéria seca representa a fração do alimento que não possui água. Essa determinação é a mais simples e a mais importante, já que a água não possui valor energético, então esse processo serve de correção para as outras análises bromatológicas descritas anteriormente, com exceção da análise por injeção em fluxo, em que a amostra é proveniente do solo. O cálculo da porcentagem de matéria seca é feito como mostra a equação a seguir.

$$\frac{([T+MS]-T) \times 100}{A} \quad (3)$$

Em que T é a tara, MS é a matéria seca restante no cadinho e A é amostra inicialmente pesada.

A determinação de matéria mineral, por sua vez, representa a massa de matéria inorgânica na amostra, como potássio, cálcio, sódio, silicatos, fosfatos, etc. Seu cálculo é feito a partir da seguinte equação.

$$\frac{([T+Cinzas]-T)100}{(T+MS)-T} \quad (4)$$

Tabela 1. Análise em sextuplicata de matéria de referência.

| Amostra | MS(%) | MM(%) |
|---------|--------|-------|
| 1 | 94,526 | 5,358 |
| 2 | 94,529 | 5,282 |
| 3 | 94,539 | 5,26 |
| 4 | 94,495 | 5,223 |
| 5 | 94,241 | 5,411 |

| | | |
|---|--------|-------|
| 6 | 94,726 | 5,146 |
|---|--------|-------|

4.2. Determinação de proteína bruta (PB)

A análise de proteína bruta tem como objetivo determinar a quantidade de nitrogênio na forma de amônia e amônio numa amostra. A amostra reage com o ácido sulfúrico Pa e a matéria orgânica é degradada. O cálculo é feito como mostrado a seguir.

$$\frac{14 \times 0,025 (V_{H_2SO_4} - V_{BRANCO}) 100}{M_{amostra} \times 1000} \quad (5)$$

Em que $V_{H_2SO_4}$ é o volume utilizado de ácido sulfúrico para a titulação, V_{BRANCO} é o volume utilizado de ácido sulfúrico para titular o branco, $M_{amostra}$ é a massa pesada de amostra. Nesse caso a padronização do ácido sulfúrico utilizado era de 0,025 N.

Tabela 2. Porcentagem de nitrogênio na forma de amônia e amônio.

| Amostra | %N |
|------------------|--------|
| Ração para peixe | 10,100 |
| Guandu | 3,483 |
| Forrageira | 0,656 |

Os resultados obtidos mostram que, como esperado, a ração para peixe possui bem mais nitrogênio que as outras, cerca de 10%. Enquanto isso, a folha de guandu possui 3,483% de nitrogênio e a forrageira possui apenas 0,656%.

4.3. Análise de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA)

A FDN mensura a quantidade total de fibra na amostra, servindo como parâmetro para o consumo. Então, quanto menor o nível de FDN, maior o consumo de matéria seca. Esse nível pode variar conforme a espécie vegetal e a idade da planta. Por exemplo, plantas mais novas possuem menores níveis de fibra, e isso é facilmente

observado, já que o consumo é maior dentre os animais. O cálculo de FDN é mostrado a seguir.

$$\frac{[(T+FDN)-T]\left[\frac{M_{Bf}}{M_{Bi}}\right]100}{A} \quad (6)$$

Em que T+FDN é a massa do saquinho juntamente com o resíduo de fibra, M_{Bf} é a massa do saquinho do branco final, M_{Bi} é massa do saquinho do branco inicial antes de entrar no reator, e A é a massa de amostra pesada no saquinho. O cálculo do FDA é semelhante ao FDN.

Tabela 3. Resíduo de FDN e FDA em amostras de milho e forrageira.

| Amostra | FDN (%) | FDA (%) |
|--------------|---------|---------|
| Milho A | 7,97 | 3,99 |
| Milho B | 8,07 | 4,05 |
| Forrageira A | 70,45 | 39,47 |
| Forrageira B | 69,66 | 40,97 |

Como se pode observar, o milho possui menos fibra que a forrageira e por isso é mais facilmente digerido pelo gado, enquanto a forrageira possui bem mais fibras e possui uma digestão mais lenta no intestino do animal.

4.4. Análise de injeção em fluxo (FIA)

Para essa análise, primeiramente é feita uma curva de calibração em que as concentrações de amônio são conhecidas, geralmente é feito 8 pontos contando com o branco. Injeta-se o branco (somente solução de cloreto de potássio 2 mol L⁻¹) e então, os padrões analíticos. Com a curva construída, é possível iniciar a análise das amostras.

Tabela 4. Absorbância (A) em duplicata de padrões para construção da curva de calibração.

| ppm N | A ₁ | A ₂ | A _{médio} |
|-------|----------------|----------------|--------------------|
| 0,00 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| 1,00 | 0,048 | 0,048 | 0,048 |
| 2,00 | 0,092 | 0,092 | 0,092 |
| 3,00 | 0,142 | 0,142 | 0,142 |
| 4,00 | 0,189 | 0,189 | 0,189 |
| 5,00 | 0,237 | 0,237 | 0,237 |
| 6,00 | 0,287 | 0,287 | 0,287 |
| 7,00 | 0,326 | 0,326 | 0,326 |

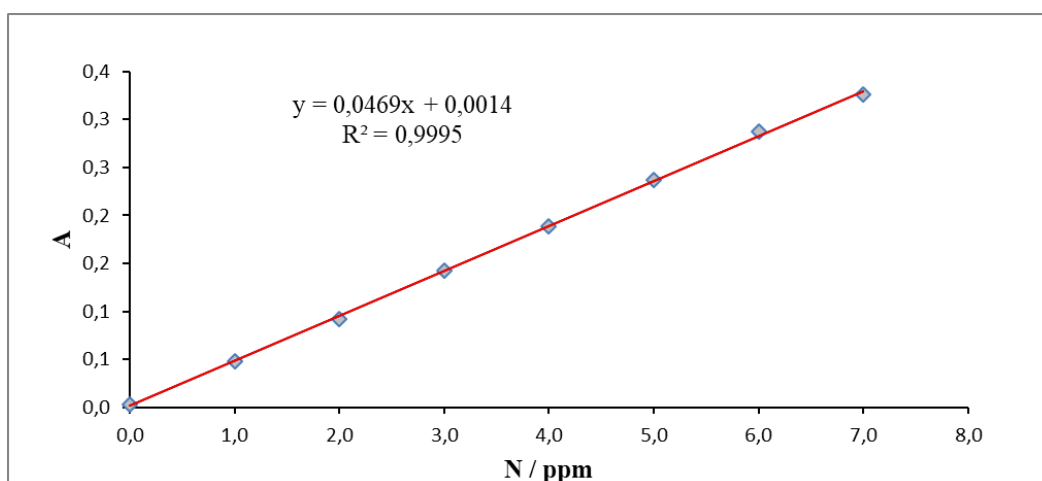


Figura 4. Curva de calibração.

Com a curva, é possível calcular a concentração de nitrogênio sabendo a absorbância de cada amostra partindo da equação a seguir.

$$\frac{A_{\text{médio}} - 0,0014}{0,0469} \quad (7)$$

Tabela 5. Resultados de nitrogênio em ppm para amostras de solo.

| Amostra | A ₁ | A ₂ | A _{médio} | Concentração N (ppm) |
|---------|----------------|----------------|--------------------|-------------------------|
|---------|----------------|----------------|--------------------|-------------------------|

| | | | | |
|---|-------|-------|--------|-------|
| A | 0,272 | 0,273 | 0,2725 | 5,780 |
| B | 0,145 | 0,133 | 0,139 | 2,934 |
| C | 0,220 | 0,222 | 0,221 | 4,682 |

Esses resultados são entregues ao cliente para construção de estimativas da quantidade de fertilizante que se tem no solo e o quanto seria benéfico para o crescimento das plantas.

5. Conclusões

Durante o período de estágio, foi possível aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo da graduação, e ter um contato inicial com uma rotina laboratorial. As análises bromatológicas realizadas foram muito importantes para o desenvolvimento das habilidades práticas de um químico analítico e seus resultados são utilizados para o desenvolvimento de várias pesquisas com o intuito de melhorar a qualidade da pecuária de bovinos e ovinos.

Além disso, observou-se a importância da análise da matéria seca para a correção dos resultados, visto que a água não é considerada no valor nutricional. A análise de matéria mineral mostra que a porcentagem de matéria inorgânica nas amostras de forrageira e milho são bem pequenas. Na análise de fibra em detergente neutro e ácido, foi observado baixa porcentagem de fibra nas amostras de milho, enquanto que para a forrageira os valores são bem mais consideráveis. Quando fez-se o procedimento para determinar proteína bruta, foi verificado que a ração para peixe possui porcentagem maior de nitrogênio quando comparado com a das plantas. Quando se comparou as plantas guandu e forrageira, percebe-se que guandu apresenta quantidade significativamente maior de nitrogênio que a forrageira.

Por fim, na análise de injeção em fluxo, foi medido a concentração de amônio em solos, estimativa importante para verificar a quantidade de fertilizantes utilizados nos mesmos, para então se constatar o quanto é benéfico ou não para o crescimento das plantas.

6. Referências bibliográficas

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

LEMOS, S. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Determinação de formas inorgânicas de nitrogênio por análise em fluxo. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2002. 21 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; BATISTA, L. A. R. Determinação espectrofotométrica de nitrogênio em diferidos de plantas em sistema de análise por injeção em fluxo. Química Nova, v.19, n.1, p.51-58, 1996.

Lira Costa, C., Mendes Braz, C. E., Y. Kamogawa, M., de Campos Bernardi, A. C., Batista de Souza, G., & de Araujo Nogueira, A. R. (2018, October). Determinação de nitrato e amônio por sistema de análise em fluxo em amostras de lixiviado de solo. *Circular Técnica 80*.

Batista De Souza, G., de Araujo Nogueira, A. R., & Alberto Rocha Batista, L. (2006). *Avaliação e aplicação de métodos de análise para o fracionamento do nitrogênio em amostras de alimentos para animais*. 0–26. www.cppse.embrapa.br

Galvani, F., & Gaertner, E. (2006). Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. *Circular Técnica 63*.

Rodrigues, R. C. (2010). *Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos físicos, Químicos e Bromatológicos*. www.cpact.embrapa.br