

TECIDOS E PRODUTOS ANIMAIS

José Roberto Ferreira¹
Armando de Andrade Rodrigues²
Francisco Duarte Fernandes³
Geraldo Maria da Cruz²
Gilberto Batista de Souza²
Gustavo Eugênio Gerhard Barrocas⁴
Hernani Guilherme Barbosa Filho¹
Izabela Miranda de Castro⁵
Marcelo Bastos Chaves⁵
Mônica Martini⁶

1. INTRODUÇÃO

Além da escolha conveniente do método analítico e estudo dos possíveis interferentes, torna-se essencial boa amostragem, preparação e solubilização da amostra para análise. Qualquer que seja o tipo de amostra, erros significativos poderão ser introduzidos se a etapa de preparação não for satisfatoriamente conduzida (PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR, 1995).

A amostragem é a primeira fase da análise. É preciso haver integração entre os responsáveis pela coleta e o laboratório, buscando-se sincronismo entre a remessa de amostras e a capacidade do laboratório em executar as determinações (SILVA, 1981).

Este capítulo trata da preparação dos seguintes tipos de amostras:

- planta forrageira, feno, silagem, concentrado, fezes, ossos, pêlos, extrusa, fígado, sangue, urina, líquidos (de rúmen, íleo e abomaso) e leite.

¹ Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

² Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

³ Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

⁴ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

⁵ Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

⁶ Coordenadoria de Assistência Técnica Integral de São Paulo, CATI, Campinas, SP

Em alguns casos é necessário reduzir consideravelmente a dimensão da amostra antes que ela seja introduzida no sistema analítico e possa ser tratada convenientemente (BRUNO et al., 1995). Para isso, algumas etapas são importantes, como, p.ex., a secagem, a moagem e suas subdivisões.

O método de preparação utilizado dependerá do tipo de amostra. O material coletado deve ser preparado em local apropriado e equipado para esta finalidade. Normalmente a atividade de preparação inclui o recebimento, o registro, o pré-acondicionamento, a secagem, a moagem, o acondicionamento e a rotulagem das amostras.

2. Aspectos Importantes Relacionados à Coleta de Amostras

Alguns cuidados devem ser observados, para garantir a integridade física e química do material coletado:

- evitar coletar amostras sujas de terra ou com excesso de água;
- identificar devidamente, com letras legíveis, o recipiente (saco de papel ou de plástico, potes plásticos, frascos, etc.) que receberá a amostra. Cuidado especial deve ser tomado com as amostras que serão armazenadas a baixa temperatura. Em muitos casos, a identificação feita inicialmente torna-se ilegível durante o processo de descongelamento;
- garantir que os utensílios, embalagens e ferramentas empregados na coleta e no transporte não contaminem a amostra, principalmente em função das determinações que serão realizadas. Como exemplo, se de uma planta pretende-se determinar o teor de ferro, um facão utilizado para retirar a amostra não pode ter sido confeccionado com esse elemento. Em amostras provenientes de experimentos conduzidos em casa de vegetação esse tipo de cuidado deve ser redobrado;

- documentar cada etapa da coleta, incluindo eventos não esperados (p.ex., chuvas). Especificar todas as características relevantes da área, condições climáticas e população amostrada, condições de transporte e secagem;
- a amostra deve ser encaminhada o mais rapidamente possível ao laboratório, para que possa ser devidamente processada e armazenada;
- a amostra que chegar ao laboratório sem as informações necessárias ao processamento e análise deve ser recusada. É necessário conhecer o tipo da amostra, o que deve ser determinado e quem é o seu responsável.

3. OBJETIVO DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A preparação visa, principalmente (SILVA, 1981; AOAC, 1990; BRUNO et al., 1995):

- permitir o armazenamento de forma mais adequada e por período de tempo mais longo;
- diminuir problemas relacionados à homogeneidade das amostras;
- reduzir a dimensão da amostra;
- facilitar o ataque dos reagentes durante o processo analítico, pela diminuição do tamanho das partículas.

4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.1. RECEBIMENTO

As amostras aqui abordadas são: plantas forrageiras, feno, silagem, resíduos agrícolas ou agro-industriais e concentrados.

Com relação ao recebimento de amostras, é importante ressaltar que:

- são necessários, no mínimo, 15 g de material pré-sêco (65°C) e moído para que se possa realizar as principais determinações em estudos de nutrição animal (nitrogênio total, matéria seca a 105°C, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, digestibilidade “in vitro” da matéria seca, matéria orgânica (cinzas), extrato etéreo, energia bruta, macro e microelementos minerais);
- em experimentos que produzam pequena quantidade de amostras, devem ser discriminadas as determinações necessárias com a quantidade de material possível de se obter;
- para determinação de pH, ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal em silagem, coletar de 1,0 a 2,0 kg de amostra;
- a perda de umidade, durante o transporte, não terá grande importância, desde que os resultados sejam dados apenas na matéria seca total. No entanto, em amostras provenientes de silagem, a umidade é um bom indicador de sua qualidade, devendo-se preservá-la;
- quando as determinações não forem realizadas imediatamente em amostras de forragens verdes, fezes, urina, etc., é necessário que as amostras sejam conservadas em baixas temperaturas (entre -18 e -20°C).

As amostras de fezes são processadas praticamente da mesma maneira, diferenciando de outros tipos de amostras de origem animal e que serão consideradas mais adiante.

4.2. IDENTIFICAÇÃO E REGISTRO

A identificação e o registro das amostras permitirão o rastreamento dos dados gerados, possibilitando ao pesquisador/cliente relacionar os códigos atribuídos pelo laboratório à identificação mais detalhada do experimento.

O mínimo que é preciso realizar na etapa de identificação e registro é (SILVA, 1981; AOAC, 1990; BRUNO et al., 1995; EMBRAPA, 1996):

- nome do solicitante da análise;
- data de coleta;
- data de recebimento das amostras;
- tipo de material;
- determinações a serem realizadas;
- número-código de cada amostra;
- documentação de informações relevantes.

4.3. PRÉ-ACONDICIONAMENTO

Antes de concluir o processo de preparação das amostras, elas são pré-acondicionadas de diversas formas.

4.3.1. AMOSTRAS DE ORIGEM VEGETAL

São pré-acondicionadas em sacos de papel de capacidade de 3 kg. Em cada saco, que deverá estar identificado com o número-código, são colocados aproximadamente 150 g da amostra.

Para determinação de carboidratos solúveis, ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal, parte da amostra deverá ser separada, identificada e imediatamente congelada, encerrando, nessa etapa, a preparação. A amostra só será descongelada horas antes da determinação (EMBRAPA, 1996).

4.3.2. AMOSTRA DE FEZES

Para o pré-acondicionamento deste tipo de amostra empregam-se recipientes retangulares de vidro (tipo fôrma doméstica), colocando-se, em cada um, também aproximadamente 150 g da amostra.

Observação:

Quando solicitada, a determinação da matéria seca ao ar - ASA (amostra seca em estufa a 65°C com circulação forçada de ar) é feita após o pré-acondicionamento. Neste caso, é necessário obter o peso exato da amostra que é colocada na bandeja ou recipiente de vidro. Os pesos anotados serão utilizados para o cálculo da porcentagem de matéria seca ao ar (% ASA).

4.4. PRÉ-SECAGEM

A pré-secagem das amostras tem os seguintes objetivos: facilitar o processo de moagem, prolongar a conservação da amostra pela destruição de enzimas responsáveis pelo processo de decomposição (JONES JUNIOR & STEYN, 1973) e pela diminuição da atividade microbológica (facilitada pela umidade) e permitir a determinação da ASA.

- no caso de ser necessário o valor da porcentagem de matéria seca, deve-se pesar a amostra antes e depois da pré-secagem;
- amostras de plantas destinadas a determinações de macro e microelementos minerais podem necessitar descontaminação antes da pré-secagem, devido à poeira ou resíduos de pulverização no local da coleta, dependendo dos elementos a serem determinados e das possibilidades de contaminação. Caso necessário, lavar as

amostras com solução de detergente neutro (entre 0,1-0,3 % (v/v) e em seguida com água deionizada. Este procedimento deve ser rápido para se evitar perda de nutrientes durante a lavagem. Se as amostras estiverem secas ou murchas, é aconselhável não lavar com água;

- a secagem é feita em sacos de papel limpos, em estufa com circulação de ar a temperatura de 65°C, por um período de 48 horas ou até peso constante (SILVA, 1981; BRUNO et al., 1995);
- para o caso de silagem, a pré-secagem deve ser feita a 45°C por 72 horas;
- a carga de cada estufa deve ser definida de modo que a circulação interna de ar não seja prejudicada;
- amostras de fezes que serão analisadas após secagem e moagem devem ser colocadas em bandejas limpas e secas a 65°C durante 48 horas ou até peso constante. Amostras que serão analisadas frescas devem ser colocadas em sacos plásticos, sendo então retirado o ar e congeladas até a sua manipulação;
- determinações de vitamina C, caroteno, etc. devem ser feitas na amostra fresca, porque tais compostos podem ser perdidos ou alterados durante o processo de secagem;
- a pré-secagem é necessária quando a amostra possui alto teor de umidade;
- após secagem, a bandeja ou o saco de papel é retirado da estufa e posto sob condições ambientais do laboratório por 24 horas. Esse tempo é necessário para que a umidade da amostra entre em equilíbrio com a umidade do ambiente e atinja peso constante;
- no caso de grãos, o seguinte procedimento para controle de qualidade da matéria prima é adotado nas indústrias: pré-secagem a 45°C por 24 horas; em seguida, o grão é triturado ou quebrado e colocado em estufa por 1 hora a 130°C para determinação da matéria seca.

4.5. MOAGEM

A moagem das amostras é feita em moinho tipo Wiley, com facas, com peneiras de 1 mm, sendo coletado apenas o que passa na peneira (SILVA, 1981; AOAC, 1990; PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR, 1995; EMBRAPA, 1996). Toda superfície que tenha contato com a amostra deve ser de aço inoxidável.

A moagem é realizada em amostras que apresentam elevado teor de matéria seca (> 80%). Se a amostra for constituída de pó fino, capaz de atravessar a peneira de 40 “mesh”, bastará homogeneizá-la e reduzi-la, com auxílio do quarteador, à porção destinada a análise.

O procedimento a ser utilizado na moagem, entre uma amostra e outra, é o seguinte:

- ao retirar a amostra, abrir o moinho e limpar adequadamente seu interior, não deixando material que possa contaminar a amostra seguinte;
- fechar novamente o moinho, colocando uma pequena quantidade da próxima amostra;
- descartar esta quantidade moída;
- colocar o restante do material, coletando o material moído.

Para quantidades pequenas de amostras o melhor é empregar micromoinhos. Não sendo possível, aproveitar todo o material, inclusive o que fica retido na peneira. No caso de algumas amostras, como por exemplo caroço de algodão, é necessário usar moinho especial ou tratar a amostra (HCl P.A., concentrado) para facilitar a moagem.

4.6. ACONDICIONAMENTO

Após a moagem, as amostras são acondicionadas em frascos com tampa, com capacidade aproximada de 150 mL, identificados com o número-código (JEFFERY et al., 1992; FERREIRA & GOMES, 1995).

Alguns cuidados devem ser tomados nesta fase:

- utilizar embalagem limpa e seca, que garanta a não interação entre o ambiente e a amostra;
- a embalagem deverá estar adequadamente rotulada;
- o ideal é analisar as amostras logo após a moagem. Não sendo possível, armazenar em local fresco (de preferência refrigerado) e protegido da luz; e,
- é necessário lavar as embalagens destinadas ao armazenamento, levando-se em conta os tipos de determinações a serem realizadas. No caso de se determinar macro e microelementos, além da lavagem com detergente neutro, recomenda-se a lavagem com solução de HCl P.A., a 10 % (v/v) e em seguida com água deionizada.

Ao final do acondicionamento, as amostras seguem para o laboratório, acompanhadas de formulário de registro, estando prontas para serem analisadas.

Quando se tratarem de amostras de fezes contendo marcadores, como, p.ex., cromo ou cobalto, procurar agrupar os tempos de coleta (um grupo: T₀ - Animal 1, T₀ - Animal 2, ...; outro grupo: T₁ - Animal 1, T₁ - Animal 2, ...; etc.). Com isso, o que se pretende é minimizar contaminações entre as amostras, ou seja, processa-se primeiro as de baixa concentração, indo em direção às mais concentradas.

Em todo o trabalho de preparo de amostra é recomendável o uso de luvas e máscara.

4.1.7. ETAPAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

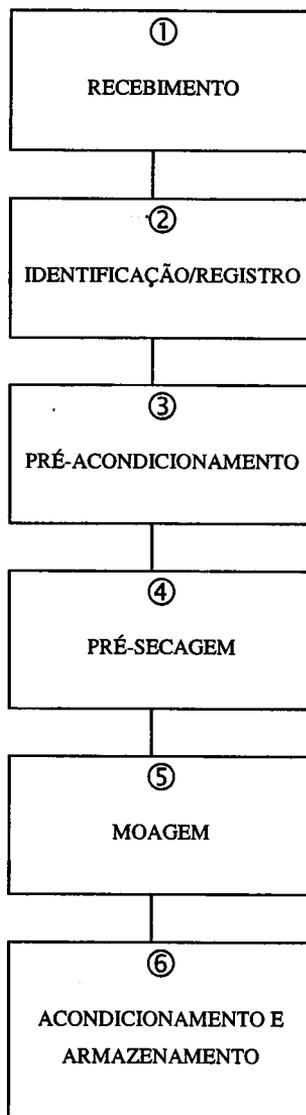


Figura 1 - Preparação das amostras

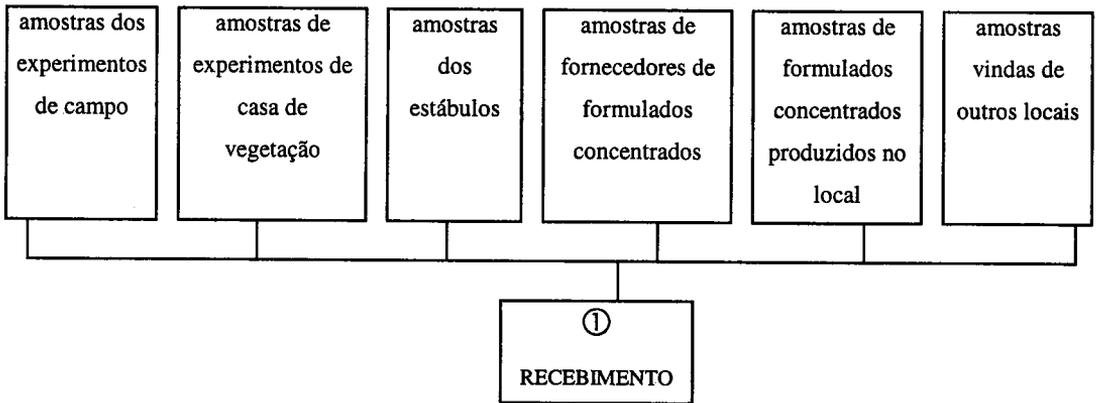


Figura 2. Recebimento.



Figura 3. Registro.

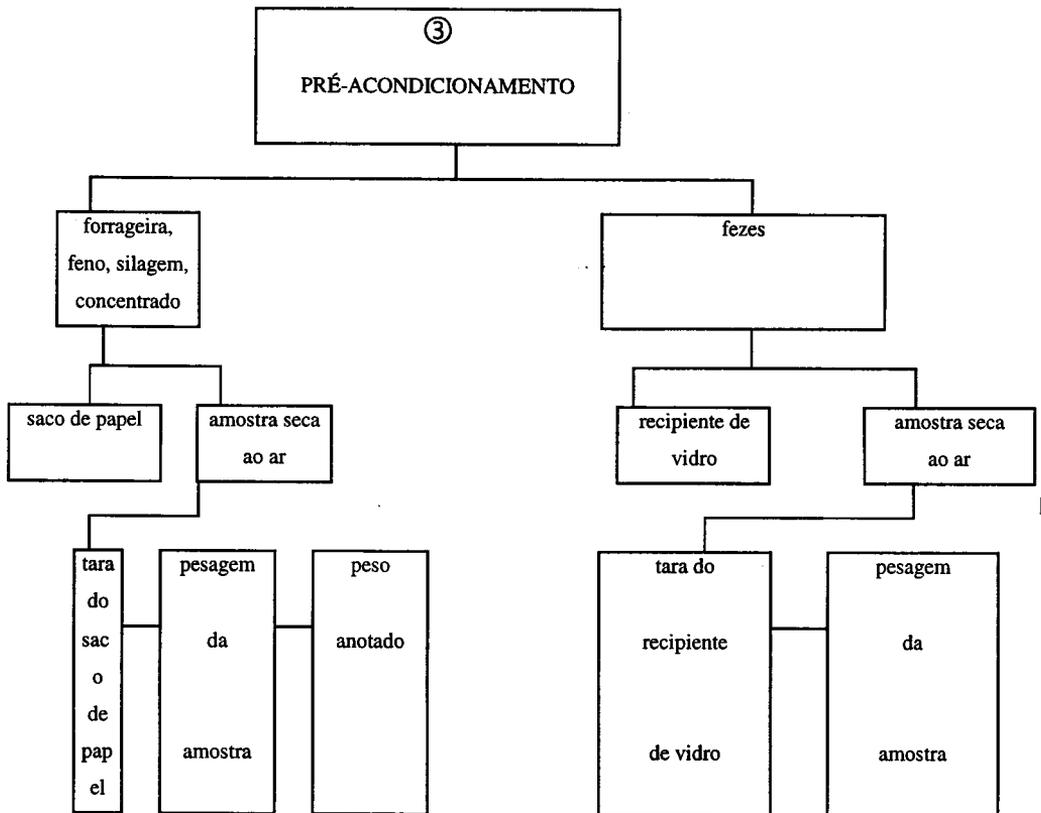


Figura 4. Acondicionamento temporário.

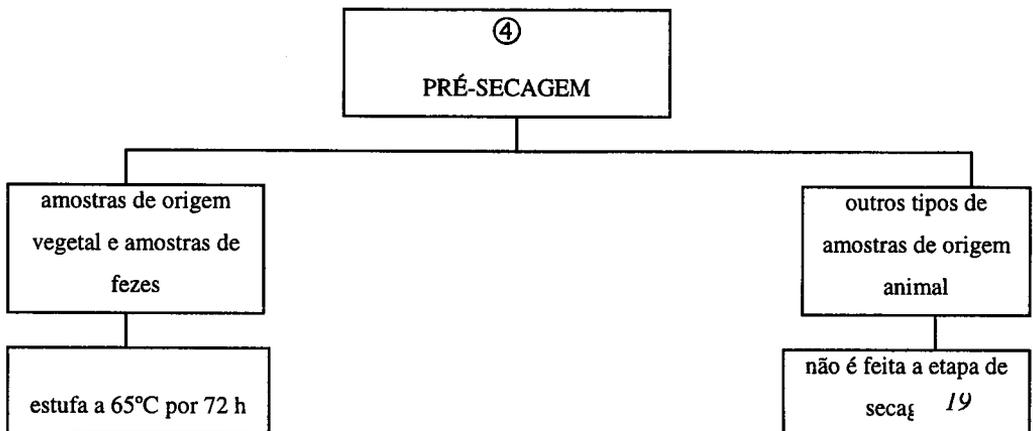


Figura 5. Secagem.

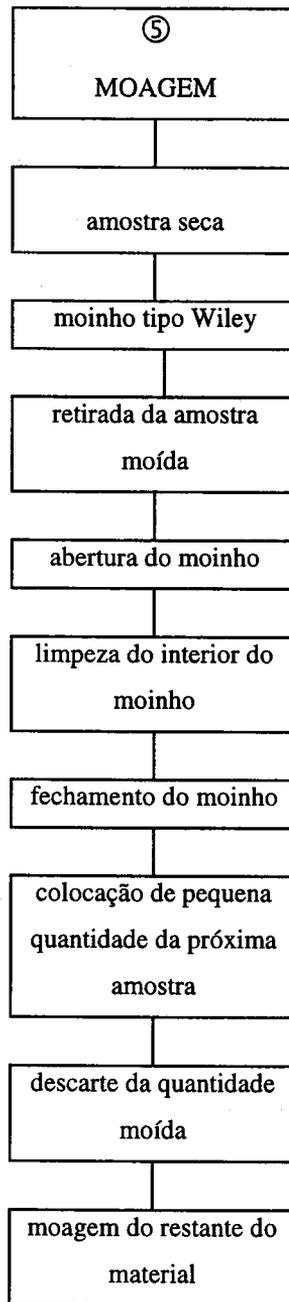


Figura 6. Moagem.

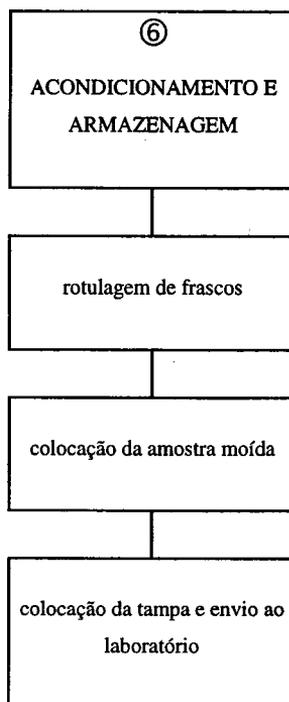


Figura 7. Acondicionamento.

5. PREPARO DE AMOSTRAS DE INGREDIENTES E SUPLEMENTOS MINERAIS

- A quantidade de material não pode ser muito pequena pois deve ser representativa, principalmente em misturas;
- misturar bem o material e fazer amostra composta, cujo procedimento deve estar de acordo com o volume do material a ser investigado;
- retirar em torno de 50 g de amostra, que deve então ser triturada em gral de ágata para perfeita homogeneização;
- armazenar em frascos de vidro, tampados e bem limpos.

6. OUTROS TIPOS DE AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL

Excetuando as fezes, que já foram consideradas, também podem ser recebidas pela sala de preparo de amostras os seguintes tipos de amostras de origem animal: osso, fígado, sangue, urina, líquidos (de rúmen, íleo e abomaso), extrusa e pêlos.

Cuidados devem ser observados em relação à contaminação do material coletado. As principais fontes de contaminação de amostras de tecido animal são frascos e materiais lavados indevidamente, instrumentos de aço não inoxidável e exposição ao ar. Os frascos devem ficar imersos em solução de detergente com baixo teor de fosfato, lavados com água corrente, água deionizada e em seguida deixados em solução de HCl, P.A., a 10% (v/v), por período mínimo de 24 horas e a seguir lavados com água deionizada antes de serem utilizados.

6.1. OSSO

Para a coleta de amostras de osso é necessário o auxílio de um médico-veterinário que fará biópsia do animal. Todos os cuidados necessários à perfeita assepsia devem ser tomados, evitando-se contaminações.

A amostra retirada é imediatamente lavada com água deionizada e colocada em frasco identificado, podendo ser congelada ou conservada em solução de formaldeído P.A., a 10% (v/v), até ser utilizada. A quantidade da solução de formaldeído contida no frasco deve ser suficiente para cobrir toda a amostra, mantida à temperatura de, aproximadamente, 15°C (EMBRAPA, 1996).

O preparo da amostra consiste na separação das camadas cortical e medular. A limpeza da camada cortical (utilizada para análise química) é feita com auxílio de bisturi e osteóstomo, lavando sempre a amostra com água deionizada. A amostra deve ser manipulada com pinça. Caso haja necessidade de manuseio, deve-se lavá-la com água deionizada, não sendo aconselhável o uso de luvas cirúrgicas. Estas, por conterem

talco, constituem grande fonte de contaminação (EMBRAPA, 1996). Atenção especial deve ser dada ao local onde se fará a limpeza, evitando-se sempre a proximidade de qualquer material que possa contaminar a amostra.

Para a determinação química de elementos, a amostra de osso deve ser seca a 100°C por 24 horas, desengordurada com éter de petróleo por 36 horas e calcinada a 600°C por 8 horas. Para a determinação da porcentagem de cinzas, deve ser feita a pesagem da amostra seca a 100°C antes e depois da calcinação.

Se for necessária a determinação da densidade da amostra de osso, esta deve ser feita após a limpeza e antes da secagem e extração da gordura.

6.2. FÍGADO

6.2.1. BIÓPSIA

Como no caso da obtenção de amostra de osso, é necessária a presença de um médico-veterinário para a realização da amostragem de fígado. A coleta é feita utilizando-se trocáter. O tecido hepático retirado é colocado em disco de papel de filtro, para que o sangue seja absorvido. O papel de filtro não deve ser retirado da embalagem muito antes, para evitar contaminações. A amostra obtida pode ser congelada imediatamente ou conservada totalmente imersa em solução de formaldeído, P.A., a 10% (v/v), e mantida em torno de 15°C, até ser analisada (EMBRAPA, 1996).

6.2.2. NECRÓPSIA

Para evitar contaminações, a amostra de fígado deve ser coletada tão logo o abdome do animal seja aberto. Cortar 50 a 100 g do lobo direito, tendo-se o cuidado de não tocar na porção do fígado a ser amostrada. A amostra deve ser conservada em formaldeído ou congelada.

6.2.3. OBSERVAÇÕES

Utilizando pinças e tesouras de aço inoxidável, local e materiais bem limpos, retirar a película ou envoltório do fígado (cápsula de Glisson) e cortar em pedaços menores (quando for o caso), secando a amostra a 105°C por 12 horas. Amostras maiores devem ser homogeneizadas por trituração em gral de ágata limpo e exclusivo para esta finalidade, antes de serem pesadas para a realização das determinações. Muitas amostras obtidas por meio de biópsia, que possuem peso seco muito pequeno, podem ser pesadas para determinação diretamente após a secagem, dispensando a etapa de trituração.

6.3. SANGUE

As amostras de sangue são coletadas diretamente dos animais por punção venosa na cauda ou veia jugular, utilizando-se agulhas de calibre 18 ou maior, para prevenir hemólise, recolhendo-se a amostra em tubos de ensaio tipo Vacutainer®. Esses tipos de tubos são comercializados esterilizados, com vácuo e anticoagulante, para o caso de obtenção de plasma. No caso de determinação de zinco, deve-se evitar as rolhas de borracha destes tubos, pois podem ser fonte de contaminação. Isto pode ser evitado substituindo-se as rolhas de borracha por Parafilme® para tampar os tubos (EMBRAPA, 1996).

Deve-se observar a temperatura da amostra e o tempo decorrido até a separação do plasma. Para a determinação de elementos químicos, o soro ou o plasma deve ser separado logo que possível após a coleta do sangue, que deve ser mantido sob refrigeração (p.ex., em água com gelo), antes da separação. Sob certas condições, pode-se utilizar centrífuga portátil e pipetas automáticas.

6.3.1. PLASMA

Para a obtenção de plasma sanguíneo, o tubo de coleta deve conter um anticoagulante. Tão logo o sangue seja coletado, o tubo deve ser invertido cuidadosamente para que ocorra a mistura. A escolha do anticoagulante deve ser feita de forma a provocar hemólise ou contamine a amostra com o elemento a ser determinado. Os mais recomendados são a solução de citrato de lítio, P.A., a 20% (m/v), na proporção de 0,1 mL/10 mL de sangue ou sal EDTA dissódico, P.A., na proporção de 1 mg/mL de sangue. Centrifugar as amostras de sangue durante 12 min a 2500 rpm (EMBRAPA, 1996). Remover o plasma com pipetador automático, tendo o cuidado de não aspirar as células, e transferi-lo para outro tubo.

6.3.2. SORO

A coleta de soro é indicada em locais onde a refrigeração e a centrifugação não são possíveis até 24 horas após a coleta da amostra. Nesse caso não se utiliza anticoagulantes e o tubo da amostra é deixado em repouso para que ocorra a coagulação e a separação do soro. Transferir o soro para outro tubo utilizando pipetador automático. O sangue coagulado pode ser centrifugado para separação mais adequada.

6.3.3. DESPROTEINIZAÇÃO

A amostra isenta de proteína é utilizada para determinação de macroelementos, sendo que para as determinações de microelementos parte do soro ou plasma deve ser reservada antes da desproteínização. Um procedimento recomendável para a precipitação das proteínas é o de se adicionar 9,0 mL de solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA), P.A., a 1,0 mL de soro ou plasma, agitar durante 1 min, deixar

em repouso durante 10 min e filtrar. Note-se que esse filtrado representa uma diluição de 1:10 da amostra de soro ou plasma, que os padrões de leitura devem ser preparados com mesma proporção de TCA, e que uma prova em branco filtrada deve ser preparada.

Observações:

De cada animal deve ser coletada quantidade de sangue suficiente para se obter volume de soro ou plasma para as determinações desejadas. Após a separação do soro ou plasma, as amostras devem ter coloração amarelada. Coloração avermelhada indica que houve hemólise, o que inviabiliza a determinação de elementos químicos, devendo então se descartar a amostra.

Amostras de soro ou plasma já desproteinizadas são mais estáveis e podem ser refrigeradas por até quatro semanas. No entanto, as amostras devem ser congeladas quando o período entre a coleta e a determinação for superior a esse período.

6.4. LÍQUIDO DE RÚMEN

Para esse tipo de amostra utilizam-se animais com fístula de rúmen. Em animais intactos utiliza-se sonda esofageana. A fístula é aberta e, com as mãos, calçadas com luvas, o material é retirado de diversas partes do rúmen e colocado em camadas de gaze limpa. A gaze é espremida e o líquido filtrado é recolhido em recipiente adequadamente lavado. Do filtrado:

- parte é utilizada para medição do pH;
- parte é utilizada para determinação de nitrogênio amoniacal → com um pipetador automático, são coletados 5,0 mL do líquido e colocados em tubo de ensaio com

tampa, identificado e contendo 2 gotas de ácido sulfúrico, P.A., a 50% (v/v). No caso de se fazer a determinação do nitrogênio amoniacal imediatamente após a coleta, não haverá necessidade de tratar a amostra com ácido sulfúrico. O volume de líquido a ser coletado depende do teor de nitrogênio da amostra;

- outra parte é utilizada para determinação de ácidos graxos voláteis → são coletados 5,0 mL do líquido e colocados em tubo de ensaio com tampa, identificado e contendo 1,0 mL de ácido metafosfórico, P.A., a 25% (v/v).

Os tubos com as amostras são congelados até momentos antes da análise.

6.5. LÍQUIDOS DE ABOMASO E DE ÍLEO

Para esse tipo de amostra, utilizam-se animais com fístula de abomaso ou íleo. A boca de um saco plástico é adaptada à saída da fístula. O próprio movimento peristáltico ejeta a amostra, que cai dentro do saco. Coleta-se um volume representativo (em torno de 500 mL), retira-se o saco da cânula, fechando sua boca e agitando-o, para homogeneização do material. Do conteúdo do saco são retirados aproximadamente 50,0 mL e colocados em um tubo de ensaio que deve ser imediatamente congelado.

Quando necessário, é feita uma amostragem composta de várias coletas. Para fazer a compostagem, as amostras são descongeladas e transferidas para um liquidificador onde é feita a homogeneização. Feita a homogeneização, retiram-se cerca de 50,0 mL que serão novamente congelados até momentos antes das determinações. São essas amostras compostas que receberão o registro do laboratório.

6.6. URINA

A coleta de urina pode ser feita de machos ou de fêmeas, sendo nesse último caso utilizada sonda tipo Folley®. Quando se tratar de bovinos, é utilizado o sistema

de luvas prepuciais. O sistema possui um dreno ligado a um recipiente plástico com capacidade de 15 a 20 L. Para fixação do nitrogênio, previamente são adicionados ao recipiente 50,0 mL de solução de ácido sulfúrico, P.A., a 50 % (v/v) (EMBRAPA, 1996). Do volume obtido de um dia de coleta, após agitação, são retirados cerca de 20,0 mL, colocados em tubos de ensaio e congelados para o armazenamento.

Quando a coleta é feita em ovinos, não se usam as luvas prepuciais. O animal fica contido em gaiola metabólica e a urina é coletada em baldes colocados por baixo da gaiola. Ao balde são adicionados 50,0 mL de solução de ácido sulfúrico, P.A., a 50% (v/v). Os demais passos são os mesmos descritos anteriormente.

Observação: O procedimento descrito é apropriado para determinação de nitrogênio.

6.7. EXTRUSA

Designa-se como *extrusa* a amostra da dieta coletada via fístula esofágica. Animais com fístula no esôfago têm sido amplamente utilizados para a obtenção de amostras da dieta selecionada por ruminantes em pastejo. Para a coleta de amostras de extrusa, o número de dias e de animais fistulados a serem utilizados varia de acordo com os objetivos da pesquisa.

Um mínimo de três dias de coleta, com quatro animais, são necessários para estimar as principais características qualitativas da dieta com razoável exatidão.

O seguinte procedimento é adotado para a coleta de amostra de extrusa:

- os animais devem ser presos no curral na noite que antecede ao dia da coleta;
- na manhã do dia da coleta, retiram-se as cânulas dos animais e colocam-se as bolsas coletoras;
- os animais são liberados para pastejarem durante um período de 30 a 40 minutos;

- após esse período de pastejo, recolhe-se os animais ao curral e as amostras são retiradas das bolsas;
- as amostras, devidamente homogeneizadas, são colocadas em sacos plásticos identificados e acondicionadas em caixa de isopor, contendo gelo comum;
- logo em seguida, são transportadas e armazenadas em congelador.

A etapa de pré-secagem das amostras de extrusa, sempre que possível, deve ser feita em liofilizador (“freeze dryer”) com temperatura de -40°C . Quando não for possível, a pré-secagem pode ser feita em estufa com ventilação forçada de ar, a temperatura de 50°C , por período mínimo de 48 horas.

6.8. LEITE

A particularidade relevante desse tipo de amostra é o fato de ser muito perecível e o congelamento ser inviável, por provocar alterações nos resultados das determinações.

Os frascos para coleta são preparados no laboratório. É adicionada solução de dicromato de potássio, P.A., 12,5% (m/v), de forma que a concentração de dicromato no leite seja de 1 mg/mL (AOAC, 1990). Como existem frascos de capacidade variada, o volume de solução de dicromato ou sua concentração podem variar. Após a adição da solução, os frascos são colocados em estufa a 50°C , para evaporação de água e recristalização do dicromato. Os frascos são retirados, tampados, estando prontos para receberem as amostras de leite. A coleta é feita da seguinte forma:

- somente uma ordenha → coleta-se o volume final da amostra;
- duas ordenhas (manhã e tarde) → a coleta é feita em volumes proporcionais à produção de leite ou ao intervalo de ordenha; e,
- três ordenhas (manhã, tarde e noite) → coleta-se 1/3 do volume final da amostra em cada ordenha.

Quando o leite é colocado no frasco, é importante aguardar cerca de 20 min e fazer uma leve agitação. Somente após esse tempo é que os cristais de dicromato de potássio se dissolvem. Para que ele atue com eficiência, conservando a amostra, é necessário que esteja distribuído uniformemente na amostra.

6.9. PÊLO

A amostra de pêlo deve ser coletada da região escapular e sacral, colocada em saco plástico, podendo permanecer à temperatura ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE RAÇÕES - ANFAR. **Métodos analíticos de controle de alimentos para uso animal**, São Paulo, 1992. 208p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC 15. ed. **Official methods of analysis**. Virginia, 1990. 1298p., 2v.

BRUNO, O.A.; CASTRO, H.; COMERÓN, E.A.; DIAZ, M.C.; GUAITA, S.; GAGGIOTTI, M.C.; ROMERO, L.A. **Técnicas de muestreo y parametros de calidad de los recursos forrajeros**. Argentina: Publi, 1995. 14p. (INTA - Estacion Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicacion, 56).

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). **Metodologias de análises**. Juiz de Fora, 1996.

FERREIRA, J.R.; GOMES, J.C. **Gerenciamento de laboratórios de análises químicas**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1995. 385p.

FICK, K.R.; DAYRELL, M. de S.; ROSA, I.V. **Métodos de análises de minerais em tecidos de animais e de plantas**. 2.ed. Gainesville: University of Florida, 1980. paginação irregular.

VOGEL, A.; JEFFERY, G.H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel: análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 712p.

JONES JR.; J.B.; STEYN, W.J.A. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In: WALSH, L.M.; BEATON, J.D. **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1973. p. 249-270.

PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR. **Fiber determination, using the Fibertec I & M Systems**. 1995. 8p. (Aplication Note AN 304).

SILVA, D.J. Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1981. 166p.

JONES JR.; J.B.; STEYN, W.J.A. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In: WALSH, L.M.; BEATON, J.D. **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1973. p. 249-270.

PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR. **Fiber determination, using the Fibertec I & M Systems**. 1995. 8p. (Aplication Note AN 304).

SILVA, D.J. Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1981. 166p.