

# MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ESPECIAIS PARA A ANÁLISE DE LÍQUIDO RUMINAL, SILAGEM E LEITE EM RUMINANTES



GRUPO DE  
INVESTIGACIÓN  
CIAB



**Sello Editorial**

Universidad Nacional  
Abierta y a Distancia

# **MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ESPECIAIS PARA A ANÁLISE DE LÍQUIDO RUMINAL, SILAGEM E LEITE EM RUMINANTES**

**Editor:**

Julián Andrés Castillo Vargas

**Grupo de Investigación:**

CIAB

## UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD

Jaime Alberto Leal Afanador

**Rector**

Constanza Abadía García

**Vicerrectora académica y de investigación**

Leonardo Yunda Perlaza

**Vicerrector de relaciones intersistémicas e internacionales**

Édgar Guillermo Rodríguez Díaz

**Vicerrector de servicios a aspirantes, estudiantes y egresados**

Leonardo Eremeleth Sánchez Torres

**Vicerrector de relaciones intersistémicas e internacionales**

Julialba Ángel Osorio

**Vicerrectora de inclusión social para el desarrollo regional y la proyección comunitaria**

Myriam Leonor Torres

**Decana Escuela de Ciencias de la Salud**

Clara Esperanza Pedraza Goyeneche

**Decana Escuela de Ciencias de la Educación**

Alba Luz Serrano Rubiano

**Decana Escuela de Ciencias Jurídicas y Políticas**

Martha Viviana Vargas Galindo

**Decana Escuela de Ciencias Sociales, Artes y Humanidades**

Claudio Camilo González Clavijo

**Decano Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería**

Jordano Salamanca Bastidas

**Decano Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente**

Sandra Rocío Mondragón

**Decana Escuela de Ciencias Administrativas, Contables, Económicas y de Negocios**

## MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ESPECIAIS PARA A ANÁLISE DE LÍQUIDO RUMINAL, SILAGEM E LEITE EM RUMINANTES

### Editor:

Julián Andrés Castillo Vargas

**Grupo de Investigación:** CIAB

541.372	Castillo Vargas, Julián Andrés
C352	Métodos cromatográficos: especiais para a análise de líquido ruminal, silagem e leite em ruminantes/ editor Julián Andrés Castillo Vargas -- [1.a. ed.]. Bogotá: Sello Editorial UNAD /2023. (Grupo de investigación CIAB)
	ISBN: 978-958-651-953-3
	e-ISBN: 978-958-651-954-0
	1. Métodos cromatográficos 2. Ciencias agrícolas 3. Investigaciones en farmacia 4. Análisis del líquido ruminal 5. Producción animal I. Castillo Vargas, Julián Andrés

**ISBN:** 978-958-651-953-3

**e-ISBN:** 978-958-651-954-0

**Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAPMA**

©Editorial

Sello Editorial UNAD

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Calle 14 sur No. 14-23

Bogotá, D.C.

Octubre de 2023

**Corrección de textos:** Rosemary Silva

**Diagramación:** Natalia Herrera Farfán

**Edición integral:** Hipertexto SAS

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons–Atribución – No comercial – Sin Derivar 4.0 internacional.

[https://co.creativecommons.org/?page\\_id=13](https://co.creativecommons.org/?page_id=13).



A busca contínua pela maximização da produção de ruminantes e pela redução de seus efeitos negativos no meio ambiente tem estimulado, nos últimos anos, o desenvolvimento e implementação de diversas estratégias nutricionais e de alimentação animal.



## RESENHA DO LIVRO

A busca contínua pela maximização da produção de ruminantes e pela redução de seus efeitos negativos no meio ambiente tem estimulado, nos últimos anos, o desenvolvimento e implementação de diversas estratégias nutricionais e de alimentação animal. Produto desta otimização, obtiveram-se melhorias consideráveis, em termos de maior eficiência produtiva e qualidade composicional dos produtos derivados de ruminantes.

Essas tendências de “produzir mais com menos”, “produzir limpamente” e de “melhorar a qualidade nutricional” dos produtos derivados da produção de ruminantes têm exigido, nos últimos anos, maior intensidade na transdisciplinaridade. Isso implica que as ciências agrárias estão constantemente buscando apoio em ciências afins, como as ciências básicas, incluindo química, biologia, geologia, estatística, matemática e farmácia. Particularmente no caso das ciências químicas, estas fornecem ferramentas fundamentais na nutrição animal, para a tomada de decisões, do ponto de vista do conhecimento da composição de alimentos (por exemplo: forrageiras, concentrados, subprodutos etc.), tecidos (exemplo: órgãos, músculos e ossos) e produtos derivados (exemplo: leite, carne e outros produtos alimentícios) de ruminantes. Assim, a química tem o potencial de apoiar tanto o elo primário quanto os subsequentes na cadeia de produção pecuária.

Em particular, a química analítica instrumental fornece ferramentas para entender o impacto das estratégias nutricionais adotadas ou mesmo as características do ruminante, no seu metabolismo de nutrientes e como isso influencia na qualidade de seus produtos. Nesse sentido, os métodos instrumentais modernos, mais especialmente os métodos cromatográficos e espectroscópicos, fornecem informações em termos da abundância e presença de compostos orgânicos de interesse, visando a produção de alimentos de melhor qualidade com menor custo ou impacto ambiental. No entanto, livros específicos propondo o uso de técnicas cromatográficas acopladas às espectroscópicas no campo da produção animal são escassos e, por vez, ausentes.

Desta forma, com esta publicação pretende-se fornecer um conjunto de ferramentas através da utilização de métodos químico-instrumentais focados na combinação de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, que procuram fornecer ferramentas de diagnóstico para otimizar a produção de ruminantes. O material propõe diversas metodologias para a análise de metabolitos de interesse para a produção animal em líquido ruminal e leite de ruminantes, bem como em silagem, para esta espécie.

## RESENHA DOS AUTORES

### Julián Andrés Castillo Vargas



Doutor em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Mestre em Produção Animal e Bacharel em Química pela Universidad Nacional de Colombia. Licenciado em Química pela Universidade Cruzeiro do Sul. Atualmente é Pós-doutorando ativo do Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins e da Universidade Federal Rural da Amazônia. Contato: [jcfcav@gmail.com](mailto:jcfcav@gmail.com)

### Tiago Costa de Araújo

Licenciado em Ciências Naturais com habilitação em química pela Universidade do Estado do Pará. Atualmente é Técnico de Laboratório-Química da Universidade Federal Rural da Amazônia. Contato: [tiago.araujo@ufra.edu.br](mailto:tiago.araujo@ufra.edu.br)

### Vinícius da Silva Botelho Duarte Gomes

Mestre em Zootecnia e Zootecnista pela Universidade Federal Rural da Amazônia. Atualmente é consultor técnico na Premix Nutrição Animal. Contato: [viniciusbotelhodg@gmail.com](mailto:viniciusbotelhodg@gmail.com)

### Raylon Pereira Maciel

Doutor e Mestre em Zootecnia, bem como Zootecnista pela Universidade Federal do Tocantins. Atualmente é docente da Universidade Federal Rural da Amazônia. Contato: [raylonmaciel@gmail.com](mailto:raylonmaciel@gmail.com)

### Rafael Mezzomo

Doutor e Mestre em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa. Zootecnista pela Universidade do Estado de Santa Catarina. Atualmente é docente na Universidade Federal Rural da Amazônia. Contato: [mezzomozoo@gmail.com](mailto:mezzomozoo@gmail.com)

# SUMÁRIO

Prefácio	13
----------	----

## Capítulo 1

Extração, identificação e quantificação de ácidos graxos voláteis (AGV) em amostras de líquido ruminal usando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a detector de arranjo de diodos (RP-HPLC-DAD)	17
1. Resumo	18
2. Introdução	18
3. Reagentes	19
4. Equipamento	20
5. Procedimento	21
6. Cálculos (para cada AGV utilizando o método de padrão externo)	24
7. Tempo de análise	26
8. Comentários adicionais	26
9. Agradecimentos	26
10. Referências	27

## Capítulo 2

Protocolo para a extração, identificação e quantificação de ácidos graxos voláteis (AGVs) em silagem usando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a detector de arranjo de diodos (RP-HPLC-DAD)	29
1. Resumo	30
2. Introdução	30
3. Reagentes	31
4. Equipamento	33
5. Procedimento	34
6. Cálculos (para cada AGV utilizando o método de padrão externo)	36
7. Tempo de análise	38
8. Comentários adicionais	38
9. Agradecimentos	39
10. Referências	39

### Capítulo 3

Extração, identificação e quantificação de proteínas do leite bubalino usando a combinação de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e medidas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) 43

1. Resumo	44
2. Introdução	44
3. Reagentes	45
4. Equipamento	46
5. Procedimento	47
6. Cálculos	50
7. Tempo de análise	53
8. Comentários adicionais	53
9. Agradecimentos	54
10. Referências	54

### Capítulo 4

Protocolo para o estudo da biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados de suplementos lipídicos misturados com forrageiras usando uma abordagem *in vitro* 57

1. Resumo	58
2. Introdução	58
3. Reagentes	59
4. Equipamento	60
5. Procedimento	61
6. Tempo de análise	68
7. Comentários adicionais	68
8. Agradecimentos	68
9. Referências	69

## Lista de figuras

### Capítulo 1

- Figura 1. Cromatograma de mistura padrão de 10 mM de AGV. 24
- Figura 2. Cromatograma de amostra real de líquido ruminal de bovino, apresentando a identificação de diversos AGVs. 25

### Capítulo 2

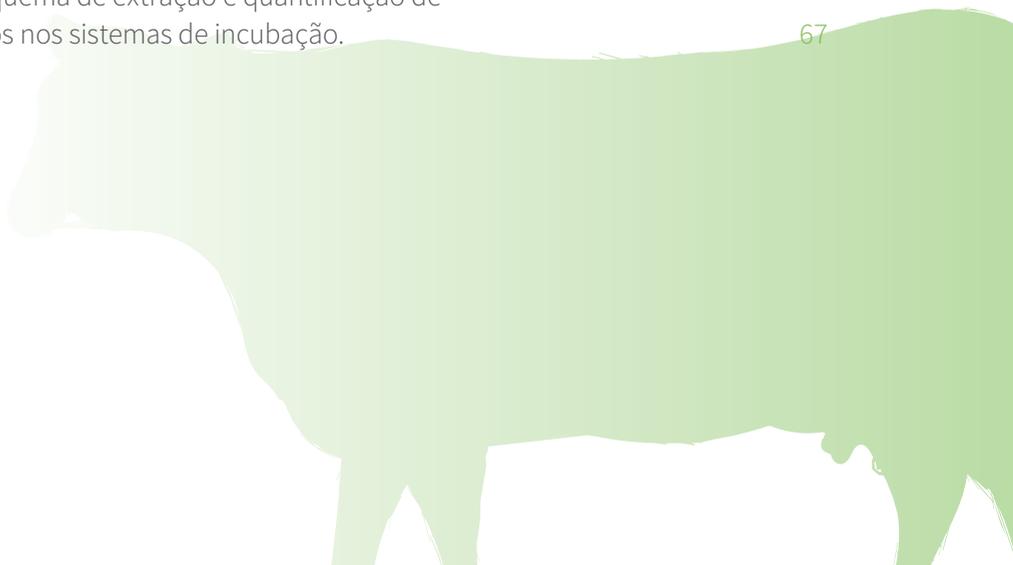
- Figura 1. Cromatograma de mistura padrão de 10 mM de AGV usando o programa apresentado na tabela 3. 37
- Figura 2. Cromatograma de amostra real de silagem de milho usando o programa apresentado na tabela 2. 38

### Capítulo 3

- Figura 1. Perfis cromatográficos do leite bubalino de diferentes búfalas (a, b, c e d). 50

### Capítulo 4

- Figura 1. Tubos com tampas de borracha com um orifício, dentro do banho termostático a ser usado nas incubações *in vitro*. 62
- Figura 2. Inóculo preparado para incubações *in vitro*. 63
- Figura 3. Banho de gelo para tubos de incubação após adição de solução de  $\text{HgCl}_2$  2% m/v para interromper a biohidrogenação de ácidos graxos. 64
- Figura 4. Liofilização do conteúdo de incubação. 65
- Figura 5. Esquema de extração e quantificação de ácidos graxos nos sistemas de incubação. 67



## Lista de tabelas

### Capítulo 1

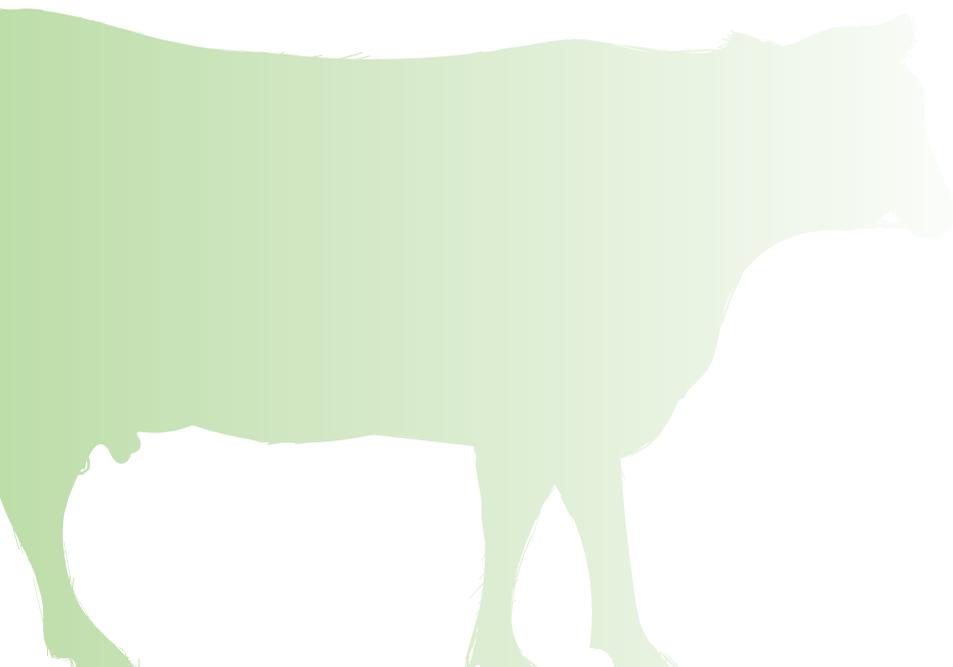
- Tabela 1.** Quantidades de reagentes a serem usados para preparar a curva de calibração. 19
- Tabela 2.** Gradiente usado na corrida cromatográfica (Mix AGV). 23
- Tabela 3.** Gradiente usado na corrida cromatográfica (ácidos acético, propiônico e butírico). 23

### Capítulo 2

- Tabela 1.** Quantidades de reagentes a serem usados para preparar a curva de calibração de AGV (ácido acético, propiônico, butírico e demais AGVs no Mix de AGV). 32
- Tabela 2.** Quantidades de reagentes a serem usados para preparar a curva de calibração de ácido láctico. 33
- Tabela 3.** Gradiente usado na corrida cromatográfica (ácido láctico e Mix AGV). 35
- Tabela 4.** Gradiente usado na corrida cromatográfica (ácidos láctico, acético, propiônico e butírico). 36

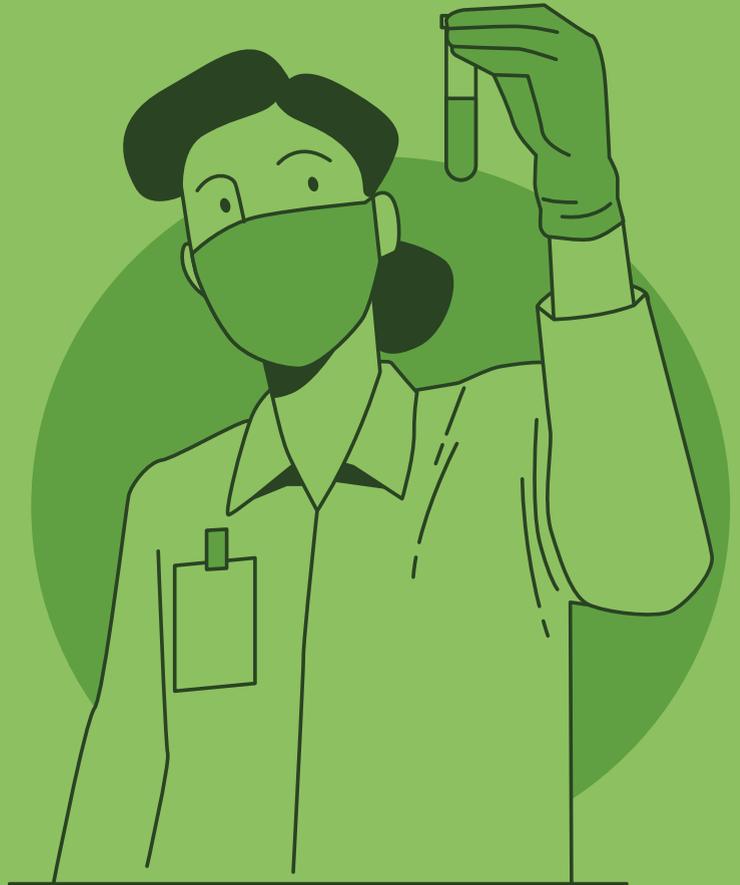
### Capítulo 3

- Tabela 1.** Gradiente de eluição a ser usado na corrida cromatográfica. 48





A química analítica visa separar, identificar e quantificar analitos em variadas matrizes e baseia-se no uso de dois grandes tipos de técnicas: as técnicas clássicas e as técnicas instrumentais.



## PREFÁCIO

A nutrição animal, como uma das vertentes da zootecnia, busca gerar soluções para o produtor, em termos da maximização da produção animal. Para isso, a zootecnia busca se associar com diversas áreas do conhecimento, entre estas, a química analítica. É dessa necessidade de gerar soluções na nutrição animal, que nasce o presente livro, buscando realizar uma junção prática entre a química analítica e a zootecnia, com o intuito de ajudar na tomada de decisão nesta última área.

A química analítica visa separar, identificar e quantificar analitos em variadas matrizes e baseia-se no uso de dois grandes tipos de técnicas: as técnicas clássicas e as técnicas instrumentais. As técnicas clássicas, tais como a gravimetria e volumetria, fundamentam-se na determinação da concentração de analitos, em função da medição da massa (gravimetria) e do volume (volumetria) de substâncias. Estas técnicas são econômicas e fáceis de executar, porém, têm a desvantagem de não detectar quantidades de analitos muito baixas.

Em contrapartida, tem-se as técnicas instrumentais, as quais, apesar de precisarem de padrões de calibração e de um conhecimento técnico maior que as técnicas clássicas, oferecem a possibilidade de serem usadas para identificar e quantificar uma ampla diversidade de analitos, inclusive, em quantidades muito baixas. Entre as principais técnicas instrumentais destaca-se a cromatografia, a qual será o fundamento dos métodos apresentados neste livro.

Em termos gerais, a cromatografia é uma técnica físico-química de separação, identificação e quantificação de substâncias, a qual visa auxiliar na tomada de decisões em diversas áreas do conhecimento. Existem dois tipos de técnicas cromatográficas modernas: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG). Ambas as técnicas, possibilitam a separação de uma mistura de substâncias dissolvidas em fase líquida, bem como a identificação e quantificação dos seus componentes. Porém, a CLAE e a CG são usadas para separar e identificar substâncias de baixa e alta volatilidade, respectivamente.

No processo cromatográfico, uma solução da mistura é injetada no cromatógrafo e as diferentes substâncias são separadas em função das suas propriedades físico-químicas usando

Em termos gerais, a cromatografia é uma técnica físico-química de separação, identificação e quantificação de substâncias, a qual visa auxiliar na tomada de decisões em diversas áreas do conhecimento.

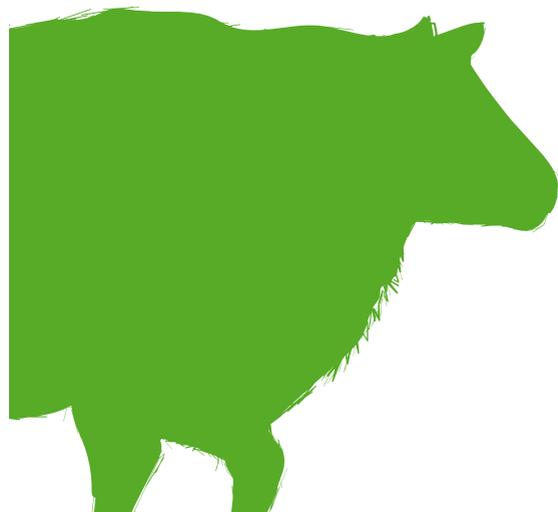
um sistema fase móvel - fase estacionária. Posteriormente, as substâncias já separadas, são identificadas mediante um sistema de detecção espectroscópico o que envolve uma reação química. Desta forma, o presente livro, pretende apresentar a aplicação destas técnicas cromatográficas no desenvolvimento de métodos para a separação, identificação e quantificação de substâncias envolvidas em diversos contextos da nutrição de ruminantes.

O primeiro capítulo propõe um método rápido para a extração, separação e identificação de ácidos graxos voláteis (AGVs) no líquido ruminal, que são poderosos indicadores da digestibilidade ruminal de uma dieta. O capítulo 2 tem como foco a determinação de AGVs em silagem, que são indicadores de sua qualidade de armazenamento e produção. O capítulo 3 propõe uma abordagem prática para determinar quantitativamente diversas frações proteicas em caseína e proteína do soro do leite bubalino, as quais fornecem elementos essenciais para avaliar a qualidade nutricional do leite e os impactos da genética animal na mesma. E por fim, o capítulo 4 propõe uma metodologia completa para a avaliação da dinâmica ruminal de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, implementando o uso da cromatografia gasosa para sua separação e quantificação.

Os métodos propostos são derivados da experiência obtida pelos autores, no laboratório de análises especiais do departamento de zootecnia da Universidade Federal Rural da Amazônia e visam auxiliar pesquisas associadas na área de nutrição de ruminantes por pesquisadores no âmbito nacional e internacional. As metodologias propostas neste livro, foram desenvolvidas com o financiamento do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (PROCAD/Amazônia, Proc. 88887.200488/2018-00), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil), do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa (FAPESPA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), da División de Investigación de

Bogotá da Universidad Nacional de Colombia e de Colciencias (code: 1115-452-21319). Adicionalmente, este material está associado ao projeto: “Estudio del metabolismo ruminal de ácidos grasos poliinsaturados, con énfasis en la biosíntesis de precursores de lípidos bioactivos en leche y carne de ruminantes, usando análisis de correlaciones canónicas” (Proyecto PIE: ECAPMAPIE 132020)”.

Julián A. C. Vargas, PhD  
Editor

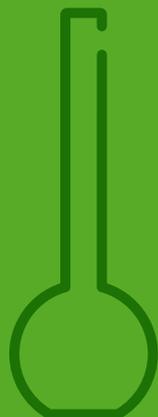


As metodologias propostas neste livro, foram desenvolvidas com o financiamento do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (PROCAD/Amazônia) e da División de Investigación de Bogotá da Universidad Nacional de Colombia





# EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGV) EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO RUMINAL USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (RP-HPLC-DAD)



## **Julián Andrés Castillo Vargas**

*Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Medellín, Antioquia, Colômbia*

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

*Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína, Tocantins, Brasil*

## **Tiago Costa de Araújo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## **Rafael Mezzomo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

# 1. Resumo

Em animais ruminantes, os ácidos graxos voláteis (AGVs) ou ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são derivados da fermentação de proteínas e carboidratos pelo microrganismo ruminal. Assim, a determinação de AGV no líquido ruminal permite avaliar a qualidade nutricional de uma dieta, bem como seu potencial impacto na composição química do leite e da carne de ruminantes. Desta forma, no presente capítulo, apresenta-se um protocolo para extrair, identificar e quantificar os principais AGVs no líquido ruminal, utilizando a técnica de cromatografia líquida em fase reversa acoplada a detector de arranjo de diodos (RP-HPLC-DAD). O método envolve a extração líquido-líquido de AGVs em líquido ruminal usando ácido fosfórico 0,85% m/m, cujo extrato é analisado por RP-HPLC-DAD após microfiltração. Os AGVs são quantificados pelo método de padrão externo.

# 2. Introdução

Os ruminantes obtêm os nutrientes dos alimentos para a produção de leite, carne e lã. Mas a utilização de nutrientes das rações implica a atividade de diferentes processos digestivos, nos quais os microrganismos de rúmen desempenham um papel central (Berchielli et al., 2011). Quando o ruminante consome forragem ou concentrado, as moléculas de carboidratos e proteínas são inicialmente catabolizadas pela ação de enzimas secretadas por bactérias, fungos e protozoários ruminais (Gomez-Insuasti et al., 2021). Dentre os produtos majoritários deste processo catabólico, estão os ácidos graxos voláteis (AGVs), mais comumente, o ácido acético, propiônico e butírico. Mas podem ser encontrados outros, tais como o ácido isobutírico, valérico e capróico.

Quando o ruminante consome forragem ou concentrado, as moléculas de carboidratos e proteínas são inicialmente catabolizadas pela ação de enzimas secretadas por bactérias, fungos e protozoários ruminais.

Estes AGVs são absorvidos pelo epitélio ruminal e convertidos por processos anabólicos a nível tissular em carboidratos, proteínas e lipídios, os quais são incorporados em grande parte em leite e carne (Van Soest et al., 1994). Assim, a determinação da concentração de AGV no líquido ruminal, permite a avaliação da qualidade nutricional de uma dieta, bem como seu potencial impacto na composição química do leite e da carne no ruminante (Kozloski, 2012).

Com o desenvolvimento das técnicas cromatográficas, o descobrimento de novos compostos orgânicos

cos, bem como o aumento da acurácia na determinação da concentração dos já conhecidos, tem aumentado nos últimos anos (Ferlay et al., 2017). Dentre estas técnicas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), posiciona-se como uma técnica poderosa de separação, identificação e quantificação de compostos orgânicos em matrizes complexas, baseada nas propriedades físico-químicas dos compostos orgânicos. Desta forma, o objetivo deste capítulo é descrever um método rápido para extrair, identificar e quantificar AGVs em amostras de líquido ruminal, utilizando RP-HPLC-DAD como técnica de separação e quantificação.

## 3. Reagentes

### 3.1. Solução de extração

*Solução de ácido ortofosfórico 0,85% (m/m) (solução de trabalho):* adicionar cuidadosamente 1 mL de ácido ortofosfórico 85% m/m (Sigma Aldrich®) usando pipeta volumétrica a um balão volumétrico de 100 mL. Completar a volume de 100 mL com água destilada.

### 3.2. Componentes de fase móvel para a análise cromatográfica

3.2.1. *Fase A: solução tampão de fosfato de sódio 10 mM (pH = 2,6) (1 L):* pesar 0,78 g de Dihidrogenofosfato de sódio dihidratado (Sigma Aldrich®) e misturá-los com 0,34 mL de ácido ortofosfórico 85% v/v em um béquer. Adicionar 10 mL de água Milli-Q® à mistura e transferi-la para um balão volumétrico classe A de 1L. Completar o volume para 1L com água Milli-Q®.

3.2.2. *Fase B: Acetonitrila grau HPLC (Sigma Aldrich®).*

### 3.3. Preparação da curva de calibração de AGVs para a quantificação destes usando o método do padrão externo

3.3.1 *Preparação da curva de calibração no intervalo de concentração 2 a 10 mM de AGVs, utilizando uma mistura comercial de AGVs (CRM46975, Sigma Aldrich®):* considerando que a concentração de cada AGV na mistura é igual a 10 mM, preparar 6 vials cromatográficos e adicionar a cada um deles, as quantidades de reagente descritas na tabela 1, para preparar a curva de calibração na faixa de concentrações mencionadas acima:

Tabela 1. Quantidades de reagentes a serem usados para preparar a curva de calibração.  
Fonte: Autores

Nível	Concentração final de cada AGV (mM)	Volume de mix comercial de AGVs ( $\mu\text{L}$ )	Volume de água Milli-Q® ( $\mu\text{L}$ )
1	2	200	800
2	4	400	600
3	5	500	500
4	6	600	400
5	8	800	200
6	10	1000	0

Notas:

- O volume total para cada ponto de calibração é de 1000  $\mu\text{L}$ .
- As curvas de calibração para cada ácido graxo também podem ser obtidas usando os AGVs individuais. Sugere-se o mix comercial de AGVs por praticidade de operação.

## 4. Equipamento

- HPLC equipado com autoamostrador, coluna Hypersil GOLD™ C18, pré-coluna Hypersil GOLD™ C18, forno, e detector de arranjo de diodos.
- Centrífuga (atingindo um mínimo de 4.000 rpm).
- Freezer (temperatura mínima de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- Balança analítica.
- Tubos de centrífuga de pelo menos 5 mL de capacidade.
- Micropipetas de 100  $\mu\text{L}$  a 5 mL e suas respectivas pontas.
- Filtro de seringa e membrana (membrana PES), marca Whatman®, de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Seringas de plástico de 5 mL.
- Vials cromatográficos de 1,5-2,0 mL (âmbar) com septo e tampa.

## 5. Procedimento:

### 5.1. Coleta de líquido ruminal e preparação de amostras

5.1.1. De um ruminante fistulado, (bovino, ovino ou caprino), coletar no mínimo 50 mL de líquido ruminal e filtrá-lo através de três camadas de gaze. Fazer a coleta em uma garrafa térmica pré-aquecida a 39 °C e transportar o líquido para o laboratório o mais rápido possível.

#### Notas:

- Para o pré-aquecimento da garrafa térmica, encha-a com água pré-aquecida a 39°C e esvazie-a no momento de coletar o líquido ruminal.
- A amostra de líquido ruminal deve ser obtida a partir da amostragem composta de líquido ruminal de três regiões do rúmen: frontal, metade do saco ventral e do saco cranial (Zijderveld et al., 2011).

5.1.2. No laboratório, adicionar 2 mL do líquido ruminal previamente filtrado a um tubo de centrífuga de 5 mL.

5.1.3. Agregar 2 mL de solução de extração (ver seção 3.1) ao tubo de centrífuga contendo a amostra de líquido ruminal e agitá-lo usando Vórtex a velocidade média por 30 s.

5.1.4. Congelar a amostra a -20 °C até a análise.

#### Nota:

Se a amostra for imediatamente analisada após a coleta, refrigerar o tubo a 4 °C por 30 min para permitir a precipitação da proteína do líquido ruminal.

### 5.2. Extração de ácidos graxos voláteis do líquido ruminal

5.2.1. No dia da análise, descongelar a amostra a temperatura ambiente (20 °C) e de forma controlada.

5.2.2. Centrifugar as amostras a 4.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (20°C).



5.2.3. Recuperar a fase líquida após a centrifugação usando uma seringa plástica e filtrar a fase líquida através de um filtro de membrana PES de 0,45  $\mu\text{m}$ . Coletar o volume em um tubo plástico de 4 mL.

### 5.3. Análise cromatográfica

#### 5.3.1. Análise cromatográfica da curva de calibração

5.3.1.1. Preparar a curva de calibração conforme descrito na seção 3.3.1 de reagentes.

5.3.1.2. Analisar cada ponto da curva por RP-HPLC-DAD.

5.3.1.3. Identificar e integrar os picos cromatográficos resultantes.

#### 5.3.2. Análise cromatográfica das amostras de líquido ruminal

5.3.2.1. Colocar 500  $\mu\text{L}$  do extrato final em um vial cromatográfico.

5.3.2.2. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q®.

5.3.2.3. Analisar por RP-HPLC-DAD.

5.3.2.4. Identificar e integrar os picos cromatográficos resultantes.

#### 5.3.3. Condições cromatográficas

a. Temperatura da coluna: 30 °C.

b. Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ .

c. Fase estacionária: Coluna Hypersil GOLD™ C18 (dimensões: 150 x 4,6 mm) equipada com coluna de guarda Hypersil GOLD™ C18 (dimensões: 10 x 4 mm).

d. Comprimento de onda de trabalho: 210 nm.

e. Modo: gradiente, fluxo constante: 0,750 mL/min (Tabela 2).



Tabela 2. Gradiente usado na corrida cromatográfica (Mix AGV). Fonte: Autores.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A (Tampão fosfato)	Fase B (Acetonitrila)
Equilíbrio			
-2,000	0,750	95	5
Corrida cromatográfica			
0,000	0,750	95	5
6,500	0,750	60	40
16,500	0,750	60	40
16,501	0,750	60	40
18,000	0,750	95	5

## Notas:

- a. Em caso de querer separar e quantificar somente os ácidos acético, propiônico e butírico (AGVs mais relevantes na dinâmica ruminal), o tempo da corrida cromatográfica pode ser mais curto, sugerindo-se usar o programa descrito na tabela 3.
- b. Nas tabelas 2 e 3 se observa um tempo “negativo”. Este corresponde a um tempo de equilíbrio necessário para realizar a análise cromatográfica. No software do equipamento usado, deve ser inserido dessa maneira.

Tabela 3. Gradiente usado na corrida cromatográfica (ácidos acético, propiônico e butírico). Fonte: Autores.

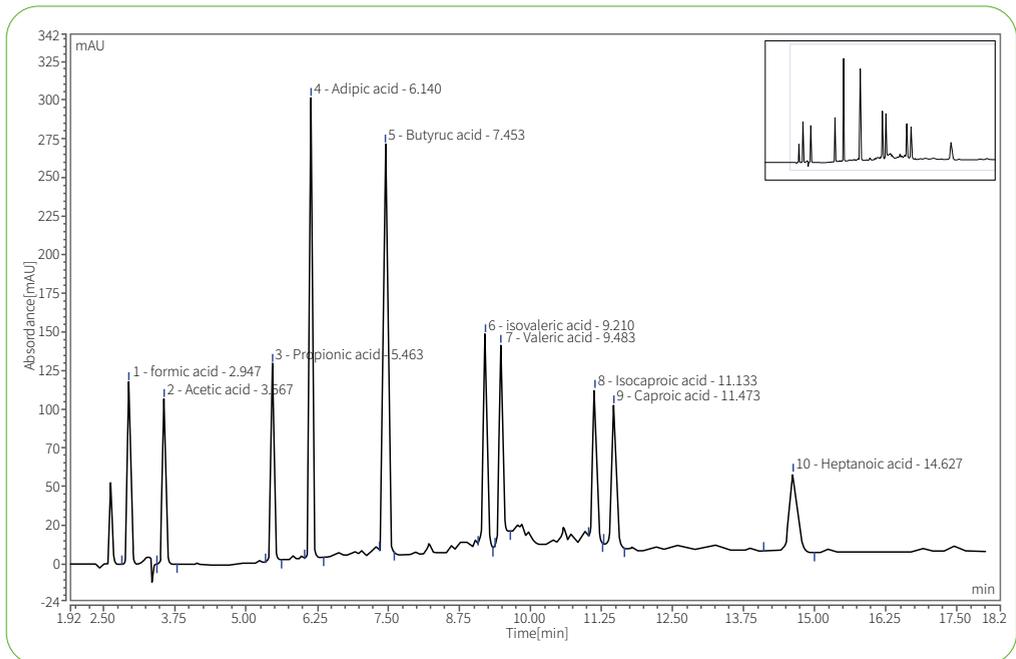
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A (Tampão fosfato)	Fase B (Acetonitrila)
Equilíbrio			
-2,000	0,750	95	5
Corrida cromatográfica			
0,000	0,750	95	5
6,500	0,750	60	40
12,000	0,750	60	40
12,001	0,750	60	40
13,000	0,750	95	5

## 6. Cálculos (para cada AGV utilizando o método de padrão externo)

### 6.1. Para os pontos da curva de calibração

6.1.1. *Determinação 1:* Calcular a área de cada pico de AGV (para cada ponto de calibração) nos diferentes padrões de calibração nos respectivos cromatogramas (Figura 1). Para isto, usar o software do equipamento e determinar área embaixo de cada pico mediante integração.

**Figura 1.** Cromatograma de mistura padrão de 10 mM de AGV. No respectivo cromatograma, mostra-se também o ácido adípico, o qual pode ser usado como padrão interno de quantificação. Detalhes do método de padrão interno aplicado a amostras de líquido ruminal podem ser encontrados em Vargas et al. (2020). Fonte: Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) Software



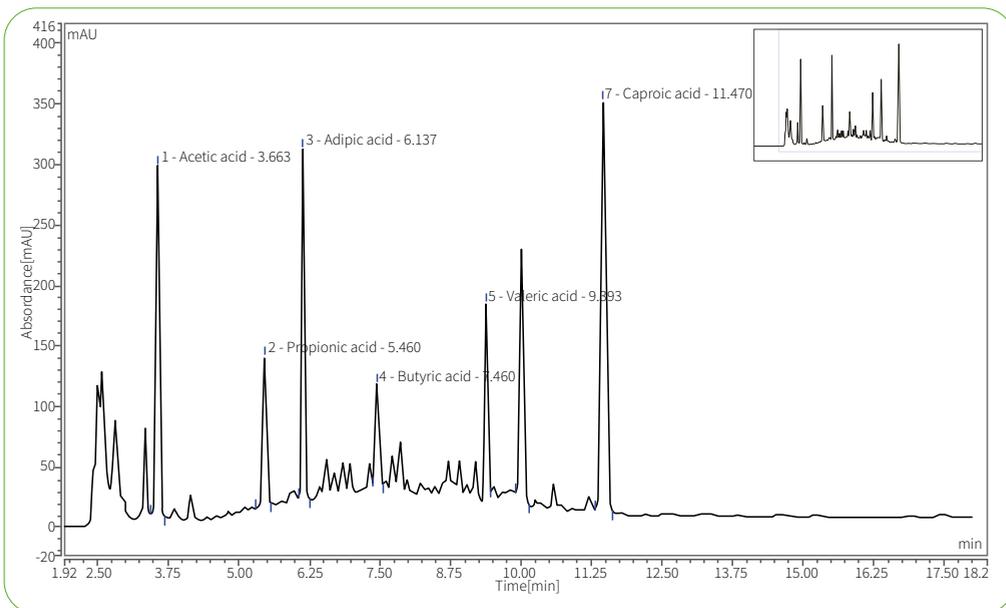
6.1.2. *Determinação 2:* Definir a concentração de cada composto nos diferentes padrões de calibração (0, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 mM neste protocolo).

6.1.3. Realizar uma representação linear da área de pico versus concentração para cada um dos compostos (curva de calibração), e ajustar a melhor reta aos mesmos, usando o método dos mínimos quadrados. A partir desse processo, obter a equação da reta.

## 6.2. Para as amostras

6.2.1. *Determinação 3*: Identificar os AGVs de interesse mediante seu respectivo pico no cromatograma (Figura 2) e usando a mistura padrão com picos conhecidos. Após isso, determinar a área de cada pico, mediante integração usando o software do equipamento.

**Figura 2.** Cromatograma de amostra real de líquido ruminal de bovino, apresentando a identificação de diversos AGVs. No respectivo cromatograma, mostra-se também o ácido adípico, o qual pode ser usado como padrão interno de quantificação. Detalhes do método de padrão interno aplicado a amostras de líquido ruminal podem ser encontrados em Vargas et al. (2020). Fonte: Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) Software



6.2.2. Utilizando a determinação 3, calcular a concentração do AGV usando a curva de calibração feita no item 3.3.1.

6.2.3. O resultado derivado da etapa 6.2.2 deve ser multiplicado pelo fator de diluição adequado (i.e.,  $FD = (4/2) * (1000/500) = 4$  neste protocolo). Esta será a concentração do AGV no líquido ruminal em mmol/L ou mM.

## 7. Tempo de análise

Para 5 amostras:

- a. Preparação da fase móvel e reagentes: 10 min
- b. Preparação da amostra: 15 min.
- c. Preparação da curva de calibração: 100 min (uma curva de calibração para todas as amostras analisadas).
- d. Configuração e estabilização do HPLC-DAD: 15 min.
- e. Tempo de execução da análise cromatográfica: 18 min (mix AGV) ou 13 min (somente ácido acético, propiônico e butírico).
- f. Análise de dados: 5 min.

## 8. Comentários adicionais

8.1. De acordo com o fabricante da coluna Hypersil GOLD™ C18, a faixa segura de pH de uso de tampão está entre 2 e 8. Portanto, em caso de otimização futura deste método cromatógrafo usando a mesma coluna, o uso de solventes ou fases móveis com um pH fora dessa faixa deve ser evitado, para assim preservar a atividade da fase estacionária.

8.2. A coluna utilizada no método proposto não permite o uso de fases móveis 100% aquosas (exemplo: o uso de soluções de ácidos inorgânicos). Portanto, em caso de otimização futura deste método, deve-se evitar o uso de uma fase móvel 100% aquosa (exemplo usar somente o tampão como fase móvel).

8.3. Dependendo do volume de amostra do líquido ruminal utilizado, as quantidades de reagentes a serem usadas durante a extração de AGVs podem ser proporcionalmente reduzidas, sem efeitos significativos sobre a separação cromatográfica.

Portanto, em caso de otimização futura deste método cromatógrafo usando a mesma coluna, o uso de solventes ou fases móveis com um pH fora dessa faixa deve ser evitado, para assim preservar a atividade da fase estacionária.

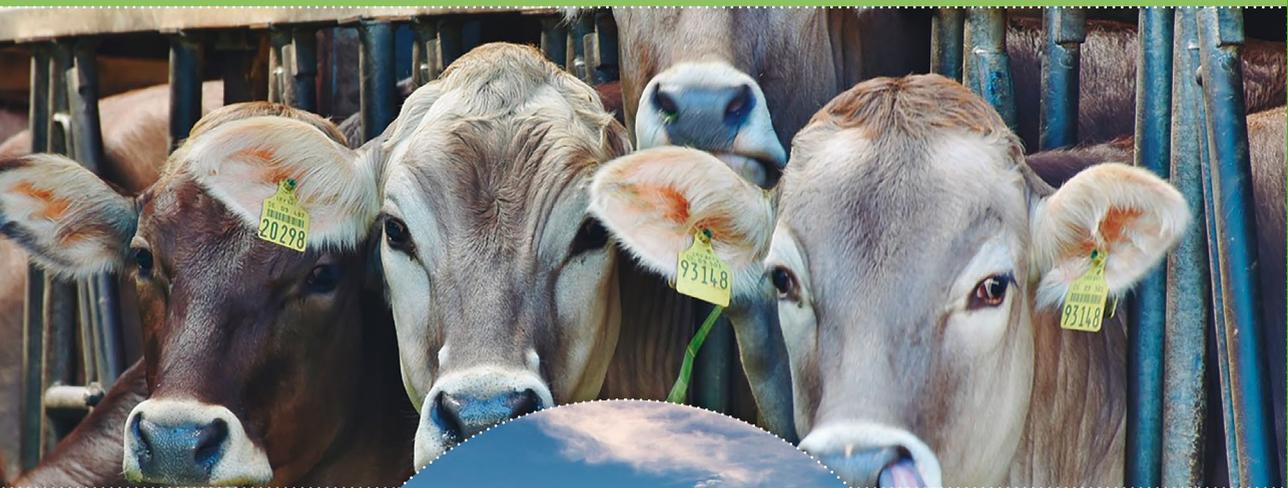
## 9. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação

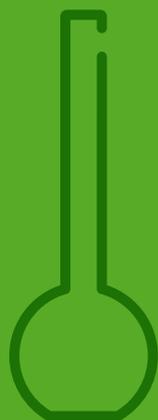
de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo apoio financeiro para desenvolver esta metodologia.

## 10. Referências

- Berchielli, TT; Pirez, AV; Oliveira, SG. (2011). *Nutrição de ruminantes*. 2ª edição. Editora Funep, 616 p.
- Chromeleon® 7. (2021). Chromatography data System. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Ferlay, A; Bernard, L; Meynadier, A; Malpuech-Brugère, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*. 141:107-120. doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.006.
- Insuasti, ASG; Granja-Salcedo, YT; Vargas, JAC; Messana, JD; Sader, APO; Berchielli, TT. (2021). In vitro gas production and fatty acids biohydrogenation of diets containing different unsaturated fatty acids sources plus crude glycerin. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 45 (5), Article 18. doi: 10.3906/vet-2101-67
- Kozloski, GV. (2012). *Bioquímica dos Ruminantes*. 3ª edição, Editora UFSM, 212 p.
- Valente, ALP; Augustus F; Riedo, CRF. (2019) Quantitative analysis by chromatography. Available from: <www.chemkeys.com>. Accessed: 17 October (2021).
- Van Gastelen, S; Antunes-Fernandes, EC; Hettinga, KA; Klop, G; Alferink, SJ; Hendriks, WH; Dijkstra, J. (2015). Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage- or corn silage-based diets. *J Dairy Sci.* 98(3): 1915-27. doi: 10.3168/jds.2014-8552.
- Van Soest, PJ. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2ª edição. Editora: Comstock; 528 p.
- Van Zijderveld, SM; Fonken, B; Dijkstra, J; Gerrits, WJ; Perdok, HB; Fokkink, W; Newbold, JR. (2011). Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 94(3): 1445-54. doi: 10.3168/jds.2010-3635.
- Vargas, JAC; Araújo, TC; Mezzomo, R. (2020). Extraction, identification, and quantification of volatile fatty acids (VFA) in rumen fluid samples using Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (RP HPLC-DAD). Protocol Exchange. doi: 10.21203/rs.3.pex-1121/v1



# PROTOCOLO PARA A EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGVs) EM SILAGEM USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (RP-HPLC-DAD)



## **Julián Andrés Castillo Vargas**

*Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Medellín, Colômbia  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil  
Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína, Tocantins,  
Brasil*

## **Tiago Costa de Araújo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## **Rafael Mezzomo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

# 1. Resumo

O perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) ou ácidos graxos voláteis (AGVs) na silagem, fornece informações significativas sobre o seu padrão fermentativo ruminal, as suas condições de armazenamento e o seu potencial aproveitamento pelo animal. O presente capítulo descreve uma metodologia para extrair, identificar e quantificar AGVs em silagem, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada ao detector de arranjo de diodos (RP-HPLC-DAD). O método envolve a extração sólido-líquido dos AGVs em amostras de silagem. O extrato aquoso de silagem obtido é misturado com ácido fosfórico 0,85% m/m, onde o extrato final é analisado por RP-HPLC-DAD após microfiltração. Os AGVs são quantificados pelo método de padrão externo.

# 2. Introdução

Os sistemas de produção de ruminantes em todo o mundo são fortemente baseados na ingestão de forragens (Reis et al., 2014). Além disso, sabe-se que as condições climáticas (principalmente temperatura e distribuição de chuvas) influenciam o crescimento e a produtividade das pastagens (Lima et al., 2021). Assim, mudanças nas condições climáticas ao longo do ano determinam a disponibilidade de forragens com qualidade nutricional adequada para a produção de ruminantes. Essa condição pode prejudicar a produção, saúde e reprodução do ruminante. Desta forma, o uso de técnicas de conservação de forragens é uma estratégia comum nos sistemas de produção de ruminantes para superar sua limitação de disponibilidade durante o ano todo (Coblentz and Akins, 2018).

Assim, mudanças nas condições climáticas ao longo do ano determinam a disponibilidade de forragens com qualidade nutricional adequada para a produção de ruminantes.

Uma das técnicas de preservação da forragem mais comuns utiliza uma combinação de ambientes anaeróbicos e ácidos. Esta técnica é conhecida como ensilagem e o alimento produzido é definido como silagem (Silva e Santos, 2016). O processo de ensilagem pretende preservar a qualidade nutricional da forragem original, ampliando a disponibilidade nutricional de forragem para diferentes períodos do ano. A qualidade nutricional das silagens pode ser avaliada utilizando diferentes parâmetros. Dentre esses parâmetros, a avaliação do perfil de ácidos graxos voláteis (AGVs) constitui uma escolha adequada para a avaliação de qualidade de uma silagem devido a que

o perfil de AGVs, os componentes nutricionais da silagem e a produtividade animal estão fortemente correlacionados (Wanapat et al., 2015; Lian et al., 2022).

Nas silagens, o perfil de AGVs está composto principalmente pelos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, cuja concentração pode mudar de acordo com a fonte de forragem ou potenciais tratamentos físicos ou químicos aplicados durante a ensilagem. Assim, este capítulo tem como objetivo descrever um método para extrair, identificar e quantificar os AGVs na silagem, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada ao detector de arranjo de diodos (RP-HPLC-DAD) como técnica de identificação, separação e quantificação.

## 3. Reagentes

### 3.1. Solução de extração

3.1.1. *Solução de ácido ortofosfórico 0,85% (m/m) (solução de trabalho)*: adicionar cuidadosamente 1 mL de ácido ortofosfórico 85% m/m (Sigma Aldrich®) usando pipeta volumétrica a um balão volumétrico de 100 mL. Completar a volume de 100 mL com água destilada.

### 3.2. Componentes de fase móvel para a análise cromatográfica

3.2.1. *Fase A: solução tampão de fosfato de sódio 10 mM (pH = 2,6) (1 L)*: pesar 0,78 g de dihidrogenofosfato de sódio dihidratado (Sigma Aldrich®) e misturá-los com 0,34 mL de ácido ortofosfórico 85% v/v em um béquer. Adicionar 10 mL de água Milli-Q® à mistura e transferi-la para um balão volumétrico classe A de 1L. Completar o volume para 1L com água Milli-Q®.

3.2.2. *Fase B: Acetonitrila grau HPLC* (Sigma Aldrich®)

### 3.3. Preparação das curvas de calibração de AGVs para a quantificação destes usando o método do padrão externo

3.3.1 *Preparação da curva de calibração no intervalo de concentração 2 a 10 mM de AGV, utilizando uma mistura comercial de AGV (CRM46975, Sigma Aldrich®) – correspondente aos ácidos acético, propiônico, butírico e demais AGVs, exceto o ácido láctico*: Considerando que a concentração de cada AGV na mistura é igual a 10 mM, preparar 6 vials cromatográficos e adicionar a cada um deles, as quantidades de reagente descritas na tabela 1, para preparar a curva de calibração na faixa de concentrações mencionada acima:

Tabela 1. Quantidades de reagentes a serem usados para preparar a curva de calibração de AGV (ácido acético, propiônico, butírico e demais AGVs no Mix de AGV). Fonte: Autores.

Nível	Concentração final de cada AGV (mM)	Volume de Mix comercial de AGV ( $\mu\text{L}$ )	Volume de água Milli-Q® ( $\mu\text{L}$ )
1	2	200	800
2	4	400	600
3	5	500	500
4	6	600	400
5	8	800	200
6	10	1000	0

#### Notas:

- O volume total para cada ponto de calibração é de 1000  $\mu\text{L}$ .
- As curvas de calibração para cada ácido graxo também podem ser obtidas usando os AGVs individuais. Sugere-se o Mix comercial de AGV por praticidade de operação.

3.3.2. *Preparação da curva de calibração de 2 a 10 mM de ácido láctico (Sigma Aldrich®):* Antes de preparar a curva de calibração para o ácido láctico, é necessário preparar uma solução estoque de 10 mM de ácido láctico. Para isso, transferir 220  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido láctico a 85% (p/p) (solução A) para um balão volumétrico classe A de 10 mL e completar até 10 mL com água Milli-Q® (Solução B). Em seguida, transferir 400  $\mu\text{L}$  da solução B para um balão volumétrico classe A de 10 mL e completar para 10 mL com água Milli-Q® (Solução C). A concentração de ácido láctico na solução C será de 10,039 mM. Considerando que a concentração de ácido láctico é aproximadamente igual a 10 mM, preparar 6 vials cromatográficos e adicionar a cada um as quantidades de água Milli-Q® e de Solução C, conforme descrito na Tabela 2.



Tabela 2. Quantidades de reagentes a serem usados para preparar a curva de calibração de ácido láctico. Fonte: Autores.

Nível	Concentração de ácido láctico (mM)	Volume de solução C de ácido láctico (µL)	Volume água Milli-Q® (µL)
1	2,01	200	800
2	4,02	400	600
3	5,02	500	500
4	6,02	600	400
5	8,03	800	200
6	10,04	1000	0

## 4. Equipamento

- a. HPLC equipado com autoamostrador, coluna Hypersil GOLD™ C18, pré-coluna Hypersil GOLD™ C18, forno, e detector de arranjo de diodos.
- b. Centrífuga (atingindo um mínimo de 10.000 x G e 4 °C).
- c. Ultrafreezer (temperatura mínima de -20 °C).
- d. Balança analítica.
- e. Tubos de centrífuga de pelo menos 5 mL de capacidade.
- f. Liquidificador.
- g. Micropipetas de 100 µL a 5 mL e suas respectivas pontas.
- h. Pipeta volumétrica de 100 mL classe A.
- i. Pera para pipeta.
- j. Filtro de seringa e membrana (membrana PES), marca Whatman®, de 0,45 µm.
- k. Seringas de plástico de 5 mL.
- l. Vials cromatográficos de 1,5-2,0 mL (âmbar) com septo e tampa.
- m. Equipamento de filtragem a vácuo.
- n. Cadinhos filtrantes do tipo PYREX™ Gooch.

## 5. Procedimento

### 5.1. Extração de AGVs na silagem

5.1.1. No dia da análise, descongelar as amostras de silagem fresca a temperatura ambiente (20 °C).

5.1.2. Pesar 10 g de silagem fresca em balança analítica e transferi-la para o vaso do liquidificador.

5.1.3. Adicionar 100 mL de água Milli-Q® (medida usando uma pipeta volumétrica classe A ao vaso do liquidificador).

5.1.4. Liquidificar a mistura durante 30 s a velocidade intermediária.

5.1.5. Filtrar a mistura resultante utilizando um equipamento tipo PYREX™ Gooch e um equipamento de filtração a vácuo. Guardar o filtrado.

5.1.6. Transferir 2 mL do filtrado para tubos de centrifugação de plástico de 6 mL e adicionar 2 mL de solução de extração (ver seção 3.1).

5.1.7. Agitar a mistura em Vórtex durante 30 s a velocidade intermediária.

5.1.8. Centrifugar a mistura a 10.000 x g por 15 min a 4 °C.

5.1.9. Recuperar a fase líquida após centrifugação usando uma seringa plástica e filtrá-la usando o filtro de membrana PES de 0,45 µm. Coletar pelo menos 500 µL do filtrado em um vial cromatográfico.

### 5.2. Análise cromatográfica

#### 5.2.1. Análise cromatográfica da curva de calibração

5.2.1.1. Preparar a curva de calibração conforme descrito na seção 3.3 de reagentes.

5.2.1.2. Analisar cada ponto da curva por RP-HPLC-DAD.

5.2.1.3. Identificar e integrar os picos cromatográficos resultantes.

#### 5.2.2. Análise cromatográfica das amostras de silagem

5.2.2.1. Colocar 500 µL do extrato final em um vial cromatográfico.

5.2.2.2. Analisar por RP-HPLC-DAD.

5.2.2.3. Identificar e integrar os picos cromatográficos resultantes.



### 5.2.3. Condições cromatográficas

- Temperatura da coluna: 30 °C.
- Volume de injeção: 20 µL.
- Fase estacionária: Coluna Hypersil GOLD™ C18 (dimensões: 150 x 4,6 mm) equipada com coluna de guarda Hypersil GOLD™ C18 (dimensões: 10 x 4 mm).
- Comprimento de onda de trabalho: 210 nm.
- Modo: gradiente, fluxo constante: 0,750 mL/min (Tabela 3).

Tabela. 3. Gradiente usado na corrida cromatográfica (ácido láctico e Mix AGV). Fonte: Autores.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A (Tampão fosfato)	Fase B (Acetonitrila)
Equilíbrio			
-2,000	0,750	95	5
Corrida cromatográfica			
0,000	0,750	95	5
6,500	0,750	60	40
16,500	0,750	60	40
16,501	0,750	60	40
18,000	0,750	95	5

#### Notas:

- Em caso de querer separar e quantificar somente os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico (AGVs mais relevantes na silagem), o tempo da corrida cromatográfica pode ser mais curto, sugerindo-se usar o programa descrito na tabela 4.
- Nas tabelas 3 e 4 se observa um tempo “negativo”. Este corresponde a um tempo de equilíbrio necessário para realizar a análise cromatográfica. No software do equipamento usado, deve ser inserido dessa maneira.



Tabela. 4. Gradiente usado na corrida cromatográfica (ácidos láctico, acético, propiônico e butírico). Fonte: Autores.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A (Tampão fosfato)	Fase B (Acetonitrila)
Equilíbrio			
-2,000	0,750	95	5
Corrida cromatográfica			
0,000	0,750	95	5
6,500	0,750	60	40
12,000	0,750	60	40
12,001	0,750	60	40
13,000	0,750	95	5

## 6. Cálculos (para cada AGV utilizando o método de padrão externo)

### 6.1. Para os pontos da curva de calibração

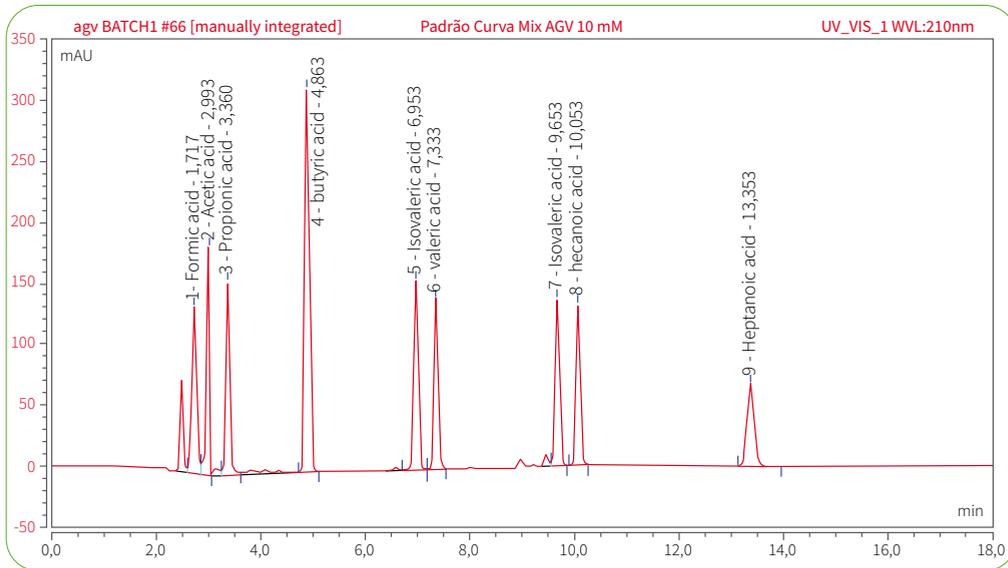
6.1.1. *Determinação 1:* calcular a área de cada pico de AGV (para cada ponto de calibração) nos diferentes padrões de calibração nos respectivos cromatogramas (Figura 1). Para isto, usar o software do equipamento e determinar área embaixo de cada pico mediante integração.

6.1.2. *Determinação 2:* Definir a concentração de cada composto nos diferentes padrões de calibração (0, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 mM neste protocolo).

6.1.3. Realizar uma representação linear da área de pico versus concentração para cada um dos compostos (curva de calibração), e ajustar a melhor reta aos mesmos, usando o método dos mínimos quadrados. A partir desse processo, obter a equação da reta.



Figura 1. Cromatograma de mistura padrão de 10 mM de AGV usando o programa apresentado na tabela 3. Fonte: Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) Software



## 6.2. Para as amostras

6.2.1. *Determinação 3:* Identificar os AGVs de interesse mediante seu respectivo pico no cromatograma (Figura 2) e usando a mistura padrão com picos conhecidos e padrão de ácido láctico. Após isso, determinar a área de cada pico, mediante integração usando o software do equipamento.

6.2.2. Utilizando a determinação 3, calcular a concentração de cada AGV usando a curva de calibração feita no item 6.1.3.

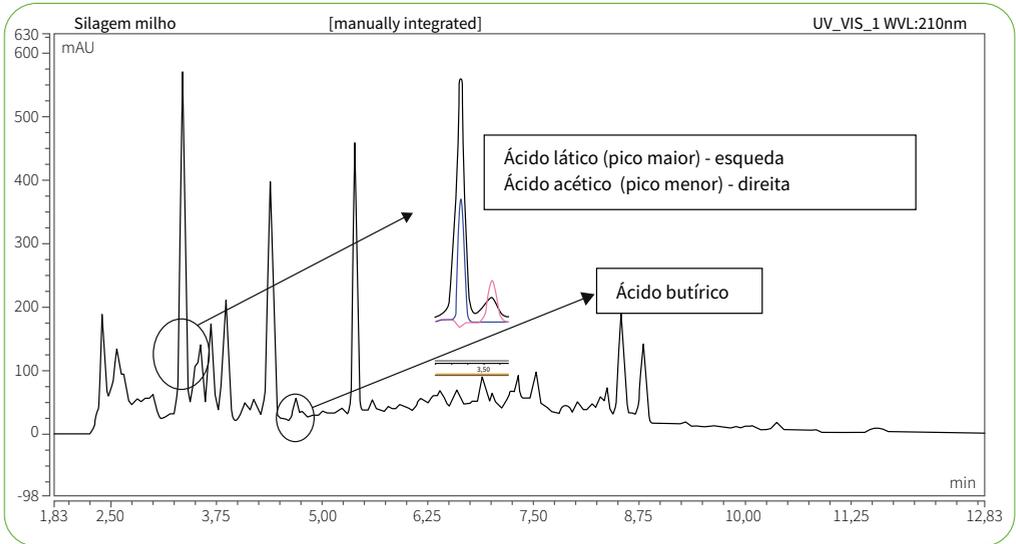
6.2.3. A concentração final de cada AGV pode ser calculada, usando a seguinte equação:

$$\text{mg AGV/ g MS silagem} = \frac{\text{Concentração AGV (etapa 5)} * 2 * 0,1 * \text{Massa molar AGV em análise}}{\text{massa silagem fresca (g)} * \text{MS silagem (\%)}}$$

Onde 2 corresponde ao fator de diluição usado no método e 0,1 ao volume de água Milli-Q® (100 mL) usada na extração. A Massa molar do AGV em análise deve ser usada de maneira independente para cada AGV. Ácido láctico = 90,08 g/mol, ácido acético = 60,05 g/mol, ácido propiônico = 74,08 g/mol e ácido butírico = 88,11 g/mol. MS da silagem, corresponde à matéria seca da silagem (%).

A concentração de AGV na silagem será expressa em mg AGV/g MS silagem.

Figura 2. Cromatograma de amostra real de silagem de milho usando o programa apresentado na tabela 2. Fonte: Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) Software



## 7. Tempo de análise

- Preparação da fase móvel e reagentes: 10 min.
- Preparação da amostra: 30 min.
- Preparação da curva de calibração: 242 min (uma curva de calibração para todas as amostras analisadas).
- Configuração e estabilização do HPLC-DAD: 15 min.
- Tempo de execução da análise cromatográfica: 18 min (mix AGV) ou 13 min (somente ácido láctico, acético, propiônico e butírico). 13 min para a análise de ácido láctico.
- Análise de dados: 5 min.

## 8. Comentários adicionais

8.1. De acordo com o fabricante da coluna Hypersil GOLD™ C18, a faixa segura de pH de uso de tampão está entre 2 e 8. Portanto, em caso de otimização futura deste mé-

todo cromatógrafo usando a mesma coluna, o uso de solventes ou fases móveis com um pH fora dessa faixa deve ser evitado, para assim preservar a atividade da fase estacionária.

8.2. A coluna utilizada no método proposto não permite o uso de fases móveis 100% aquosas (exemplo: o uso de soluções de ácidos inorgânicos). Portanto, em caso de otimização futura deste método, deve-se evitar o uso de uma fase móvel 100% aquosa (exemplo usar somente o tampão como fase móvel).

Portanto, em caso de otimização futura deste método cromatógrafo usando a mesma coluna, o uso de solventes ou fases móveis com um pH fora da faixa (2 - 8) deve ser evitado.

## 9. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo apoio financeiro para desenvolver esta metodologia.

## 10. Referências

Chromeleon® 7. Chromatography data System. Thermo Fisher Scientific Inc.

Coblentz, WK; Akins, MS. (2018). Silage review: Recent advances and future technologies for baled silages. *J. Dairy Sci.* 101(5): 4075-4092. doi: 10.3168/jds.2017-13708.

Ding, WR; Long, RJ; Guo, XS. (2013). Effects of plant enzyme inactivation or sterilization on lipolysis and proteolysis in alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 96: 2536 – 2543. doi: 10.3168/jds.2012-6438

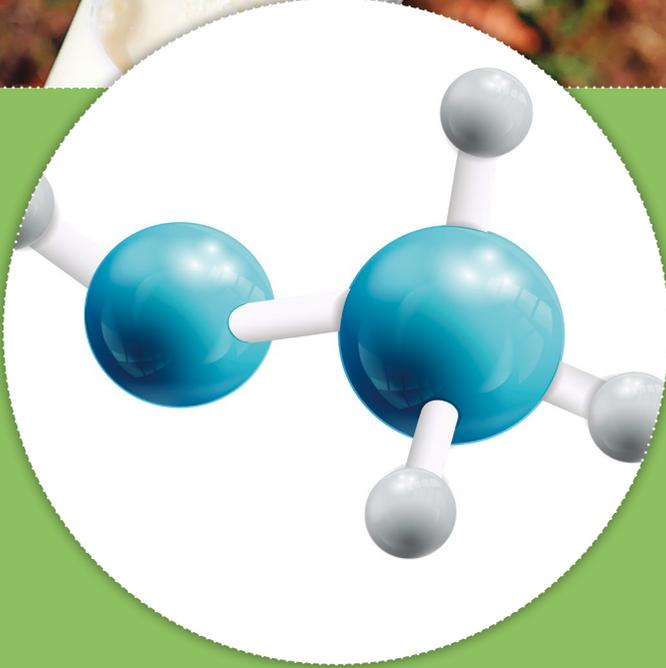
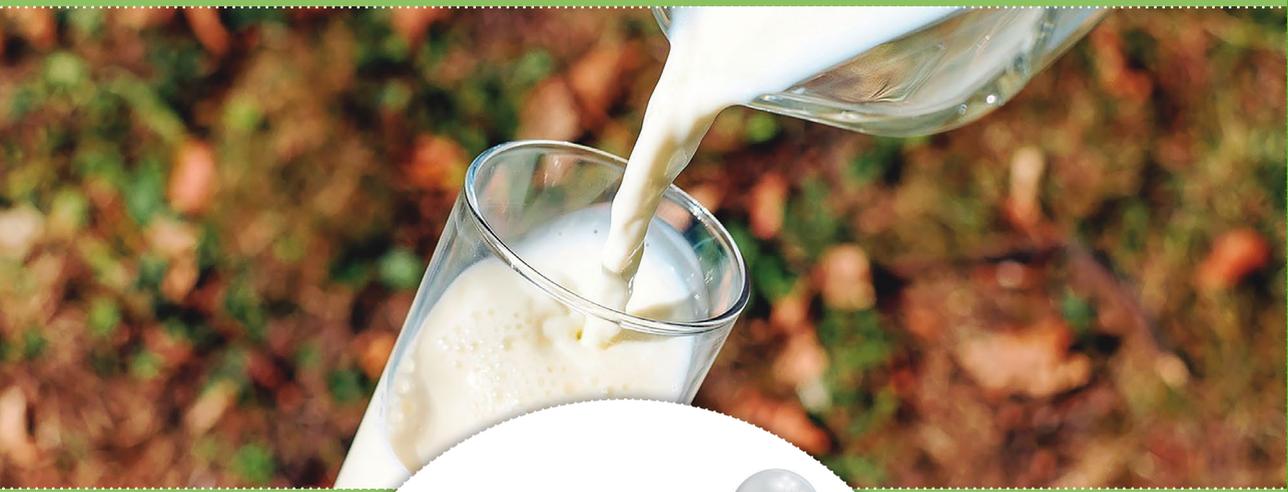
Ke, WC; Ding, WR; Xu, DM; Ding, LM; Zhang, P; Li, FD; Guo, XS. (2017). Effects of addition of malic or citric acids on fermentation quality and chemical characteristics of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 100(11): 8958-8966. doi: 10.3168/jds.2017-12875.

Lian, T; Zhang, W; Cao, Q; Wang, S; Dong, H; Yin, F. (2022). Improving production of lactic acid and volatile fatty acids from dairy cattle manure and corn straw silage: Effects of mixing ratios and temperature. *Bioresour. Technol.* 359:127449. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127449.

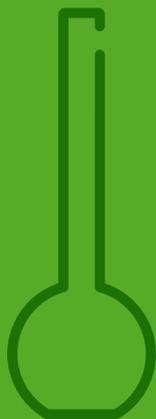
- Lima, EM; Vargas, JAC; Gomes, DI; Maciel, RP; Alves, KS; Oliveira, WF; Aguiar, GL; Reis GC; Oliveira, LRS; Mezzomo, R. (2021). Intake, digestibility, and milk yield response in dairy buffaloes fed *Panicum maximum* cv. Mombasa supplemented with seeds of tropical açai palm. *Trop. Anim. Health Prod.* 53(1): 178. doi: 10.1007/s11250-021-02626-1.
- Reis, RA; Bernardes, TF; Siqueira, GR. (2014). *Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros*. Editora Funep, 714 p.
- Silva, T; Santos EM. (2016). *Advances in Silage Production and Utilization*. Editora Intechopen, 208 p.
- Valente, ALP; Augustus F; Riedo, CRF. (2019) Quantitative analysis by chromatography. Available from: <[www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)>. Accessed: 17 October (2021)
- Wanapat, M; Cherdthong, A; Phesatcha, K; Kang, S. (2015). Dietary sources and their effects on animal production and environmental sustainability. *Anim. Nutr.* 1(3): 96-103. doi: 10.1016/j.aninu.2015.07.004.







# EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO LEITE BUBALINO USANDO A COMBINAÇÃO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC) E MEDIDAS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)



## **Julián Andrés Castillo Vargas**

*Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Medellín, Colômbia  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil  
Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína, Tocantins, Brasil*

## **Vinícius da Silva Botelho Duarte Gomes**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil  
Premix Nutrição Animal, Belém, Pará, Brasil*

## **Tiago Costa de Araújo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## **Rafael Mezzomo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## **Raylon Pereira Maciel**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## 1. Resumo

O desenvolvimento de novos métodos para estimar o número de variantes proteicas de caseína (CN) e proteínas no soro do leite de búfala é necessário para otimizar as propriedades tecnológicas e nutricionais dos derivados lácteos desta espécie. Desta forma, no presente capítulo, propõe-se um método para quantificar as principais variantes proteicas da caseína e as principais proteínas no soro do leite de búfalas, utilizando a combinação de medidas derivadas das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e medidas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). O método envolve uma extração líquido-líquido sequencial das frações proteicas usando solução tampão de BisTris, cloridrato de guanidina, citrato de sódio e dl-ditiotreitol. O extrato final obtido deve ser analisado por RP-HPLC-DAD, usando-se o valor de caseína e proteína totais obtido por NIRS para a quantificação das proteínas separadas e identificadas.

## 2. Introdução

As variantes proteicas de caseínas (CN) e proteínas do soro no leite de ruminantes são conhecidas por sua influência diferencial nas propriedades tecnológicas e nutricionais dos produtos derivados do leite (Fox e McSweeney, 2003). Portanto, é necessário identificá-las e quantificá-las de forma eficiente no leite de diferentes espécies de ruminantes. Entre os ruminantes, o búfalo tem sido objeto de especial atenção mundial recentemente, devido à sua capacidade de adaptação a diferentes condições geográficas, bem como pela ampla variedade de produtos lácteos que podem ser fabricados a partir de seu leite (Oliveira et al., 2020; Lima et al., 2021). Além disso, o leite de búfala tem

apresentado efeitos benéficos para à saúde humana, comparado ao leite bovino devido à sua composição química (Patiño et al., 2012), o que tem aumentado as demandas deste produto para consumo humano.

Portanto, é necessário identificá-las e quantificá-las de forma eficiente no leite de diferentes espécies de ruminantes. Entre os ruminantes, o búfalo tem sido objeto de especial atenção mundial...

Os fatos anteriormente mencionados têm estimulado o desenvolvimento de métodos precisos para a determinação e caracterização da proteína do leite de búfala, nos quais, atualmente, a Cromatografia Líquida em Fase Reversa acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS; Feligini et al., 2009) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (RP-HPLC-DAD; Bonfatti et al., 2013) têm mostrado resultados satisfatórios. No

entanto, o detector de espectrometria de massa não está disponível na maioria dos laboratórios analíticos devido aos seus altos custos. Além disso, a quantificação de proteínas usando apenas RP-HPLC-DAD requer padrões puros, que no caso do leite de búfala não estão disponíveis comercialmente (Bonfatti et al., 2013). Assim, para a quantificação usando curvas de calibração, esses padrões precisam ser isolados e purificados do leite de búfala por cromatografia líquida preparativa (Bonfatti et al., 2013), um método complexo que requer etapas especializadas e equipamentos não comumente disponíveis em laboratórios analíticos não especializados em extração e caracterização de metabolitos. Isto sugere, que métodos mais aplicáveis a condições reais precisam ser propostos.

Uma estratégia para superar a dificuldade acima mencionada, poderia estar focada na combinação das técnicas cromatográficas, com diversos métodos espectroscópicos de análise, dada sua seletividade e acurácia. Um destes métodos, pode ser a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), a qual tem sido usada amplamente para determinar a composição do leite de ruminantes (Melfsen et al. al., 2020). Em um relatório típico de análise química do leite por NIRS, os teores de proteína total e caseína podem ser determinados com precisão (Tsenkova et al., 2000). Assim, esta técnica pode ser facilmente associada a outras técnicas analíticas para melhorar o entendimento da composição proteica do leite de ruminantes.

A proteína total do leite de búfala consiste em cerca de 20% de proteínas do soro do leite, com os principais componentes  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) e 80% de caseínas, divididas nas principais subclasses  $\alpha$ -( $\alpha$ S1- e  $\alpha$ S2-),  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína (-CN), que estão dispostas em micelas (Swaisgood, 1982). Considerando que a RP-HPLC-DAD fornece estimativas precisas das proporções de variantes de caseína e proteínas do soro do leite, assim como a NIRS fornece um valor preciso dos teores de proteína total e caseína, a combinação de ambas as técnicas poderia facilitar a análise quantitativa das frações proteicas do leite de búfala, superando as limitações técnicas acima mencionadas quanto ao uso exclusivo de RP-HPLC-DAD ou LC-MS. Assim, o presente capítulo apresenta um método para quantificar diferentes variantes proteicas de caseína e principais proteínas do soro do leite de búfalas, utilizando a combinação das técnicas de RP-HPLC-DAD e NIRS.

## 3. Reagentes

### 3.1. Soluções para extração de proteínas

3.1.1. *Solução A:* Esta solução (pH = 7,0) contém tampão BisTris (lote B-9754, pureza > 98%, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,1 M, cloridrato de

guanidina (lote G-4505. Pureza > 99%, Sigma Aldrich®) na concentração de 6 M, citrato de sódio (Sigma Aldrich®) na concentração de 5,37 mM e dl-ditiotreitol (lote 43817, pureza > 98%, Sigma Aldrich®) na concentração de 19,5 mM.

Nota: Prepare esta solução diariamente.

3.1.2. *Solução B*: esta solução contém cloridrato de guanidina (lote G-4505. Pureza > 99%, Sigma Aldrich®) na concentração de 4,5 M. O solvente desta solução é uma mistura composta de acetonitrila (grau HPLC): água Milli-Q®: ácido trifluoroacético (TFA, Sigma Aldrich®) na proporção 100:900:1 (v:v:v).

Notas:

- a. Manuseie o TFA com extremo cuidado.
- b. Use uma cabine de extração para preparar esta solução.

### 3.2. Fases móveis para HPLC

3.2.1. *Fase móvel A*: preparar uma solução de TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®.

3.2.2. *Fase móvel B*: preparar uma solução de TFA a 0,1% v/v em acetonitrila (grau HPLC).

## 4. Equipamento

### 4.1. Equipamento de laboratório

- a. HPLC equipado com coluna de guarda C8, coluna C8, forno, amostrador automático com refrigerador de líquidos (mínimo: 4 °C) e detector de arranjo de diodos (DAD).
- b. Centrífuga (atingindo pelo menos 14,000 x g).
- c. Freezer (temperatura mínima de -20 °C).
- d. Vórtex.
- e. Balança analítica.

### 4.2. Materiais

- a. Tubos Safe-Lock Eppendorf® de 2,2 mL (dois por amostra).
- b. Suporte para tubos Eppendorf®.

- c. Balões volumétricos.
- d. Micropipetas automáticas e ponteiras.
- e. Vials, tampas e septos para cromatografia (um conjunto por amostra).
- f. Microespátula.

## 5. Procedimento

### 5.1. Extração de variantes proteicas

- 5.1.1. No dia da análise, se as amostras estiverem congeladas, descongelá-las a temperatura ambiente (25 °C).
- 5.1.2. Pegar uma alíquota de 1 mL de leite e transferi-la para uma bala Eppendorf® de 2,2 mL usando pipeta automática.
- 5.1.3. Adicionar 1 mL de solução A à bala Eppendorf® de 2,2 mL contendo a amostra de leite (1:1 - amostra: solução A).
- 5.1.4. Agitar a mistura em um vórtex por 10 s em velocidade média.
- 5.1.5. Incubar a mistura à temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h.

#### Nota:

A sala na qual a incubação está sendo executada pode ser climatizada (25 °C) usando uma unidade de ar-condicionado. A padronização das condições de incubação contribui à diminuição das variações ao longo dos diferentes dias de processamento.

5.1.6. Centrifugar a 14,000 x g por 5 min.

5.1.7. Uma camada de gordura superior é formada após a centrifugação. Em seguida, removê-la cuidadosamente usando uma microespátula.

5.1.8. Pegar 450 µL do sobrenadante e transferi-lo para uma nova bala Eppendorf® de 2,2 mL. A esta mesma bala, adicionar 1350 µL de solução B (1:3 - sobrenadante: solução B).

5.1.9. Transferir 1 mL da mistura para um vial cromatográfico para análise por HPLC.



5.1.10. Analisar as amostras por RP-HPLC-DAD. Nota: armazenar as amostras sob refrigeração a 4 °C até a análise.

## 5.2. Análise cromatográfica (condições)

- Temperatura da coluna: 45 °C.
- Volume de injeção: 5 µL.
- Fase estacionária: coluna Hypersil GOLD™ C8 (3 µm, 150 x 4,6 mm) equipada com coluna de guarda Hypersil GOLD™ C8 (5 µm, 10 mm).
- Comprimento de onda de trabalho: 214 nm.
- Modo: gradiente, fluxo constante: 0,500 mL/min (ver gradiente de eluição na tabela 1).

Tabela 1. Gradiente de eluição a ser usado na corrida cromatográfica. Fonte: Autores.

Nível	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Curvatura
1	-13,000		Equilíbrio		
2	-13,000	0,500	67	33	5
3	-12,001	0,500	67	33	5
4	-12,000	0,750	67	33	5
5	-11,001	0,750	67	33	5
6	-11,000	1,000	67	33	5
7	-10,001	1,000	67	33	5
8	-10,000	1,250	67	33	5
9	-9,001	1,250	67	33	5
10	-9,000	1,500	67	33	5
11	-8,001	1,500	67	33	5
12	-8,000	1,750	67	33	5
13	-7,001	1,750	67	33	5
14	-7,000	2,000	67	33	5
15	-3,001	2,000	67	33	5
16	-3,000	1,500	67	33	5
17	-2,001	1,500	67	33	5
18	-2,000	1,000	67	33	5
19	-1,001	1,000	67	33	5
20	-1,000	0,500	67	33	5
21	0,000	0,500	67	33	5

Nível	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Curvatura
22	0,000		Corrida cromatográfica		
23	0,000	0,500	67	33	5
24	5,000	0,500	65	35	5
25	5,001	0,500	65	35	5
26	9,000	0,500	63	37	5
27	9,001	0,500	63	37	5
28	18,000	0,500	60	40	5
29	18,001	0,500	60	40	5
30	22,000	0,500	59	41	5
31	22,001	0,500	59	41	5
32	27,500	0,500	59	41	5
33	27,501	0,500	59	41	5
34	28,000	0,500	57	43	5
35	28,001	0,500	57	43	5
36	36,000	0,500	55	45	5
37	36,001	0,500	55	45	5
38	40,000	0,500	55	45	5
39	40,000		Fim da corrida cromatográfica		

Notas:

- a. A = 0,1% TFA em água; B = 0,1% TFA em acetonitrila;
- b. Os tempos negativos correspondem a um processo de equilíbrio de fase estacionária, que deve ser feito antes da injeção de cada amostra. Durante este tempo, a amostra não é injetada no equipamento, porém, a amostra já deve estar no rack do cromatógrafo.

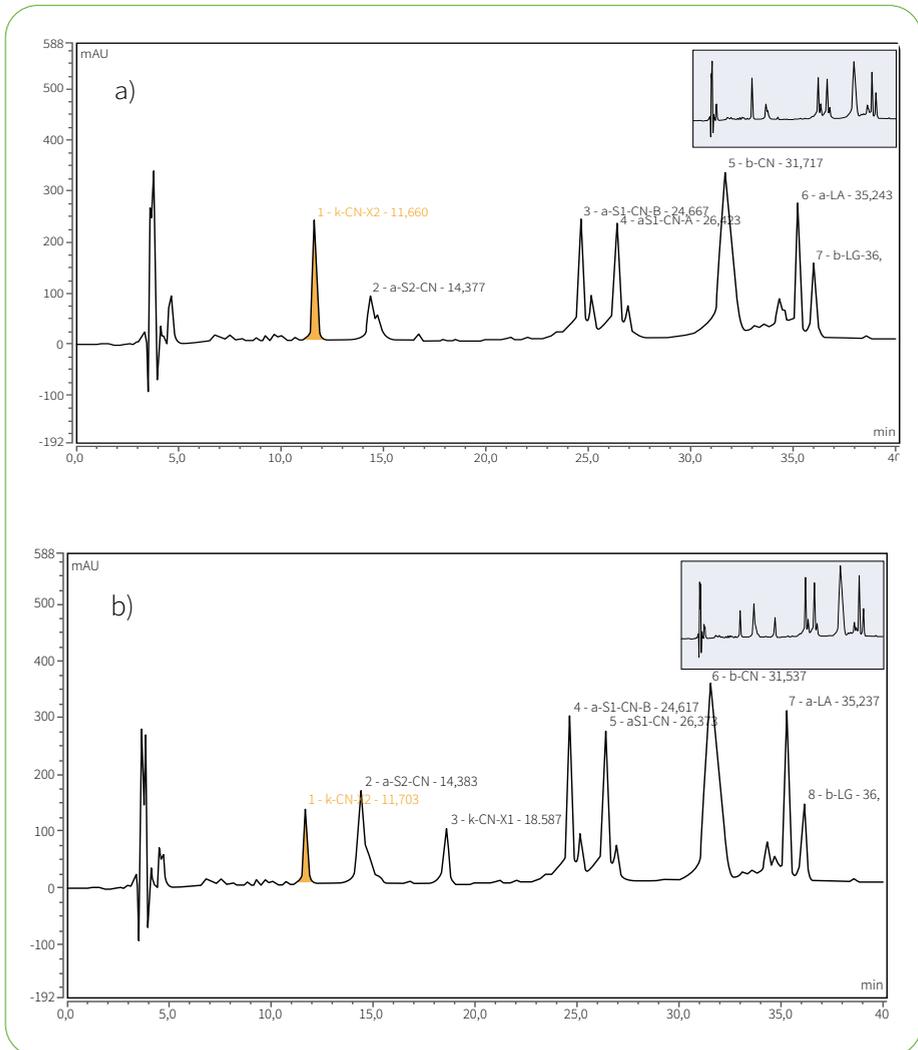
### 5.3 Análise NIRS

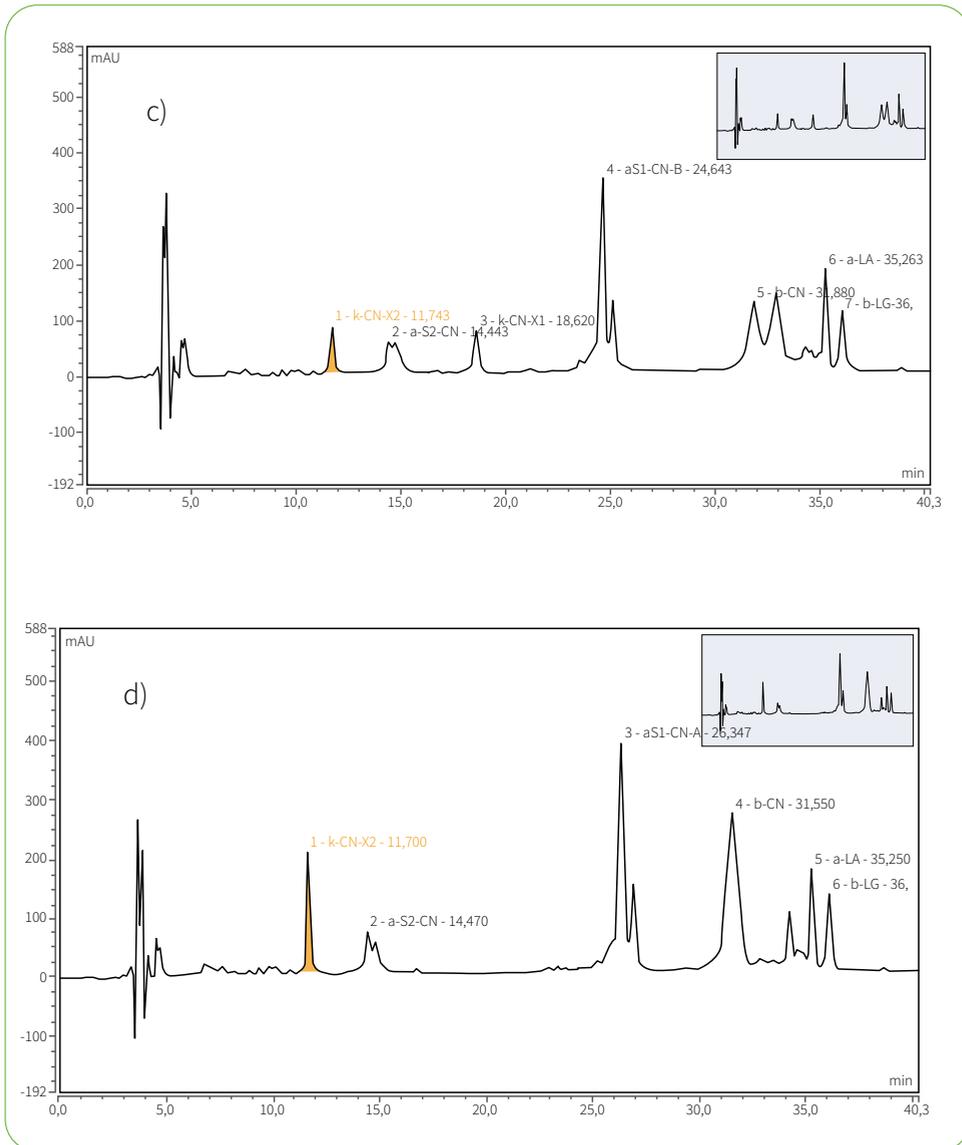
Determinar os teores de proteína total e caseína em g/100 g de leite, bem como sua densidade usando um equipamento NIRS (existem diversas marcas comerciais, para as quais diversos protocolos de análise são definidos). As descrições destes protocolos, escapam dos objetivos deste capítulo. Para mais detalhes do uso do NIRS em ciências da produção animal, consulte a Evangelista et al. (2022); Giannuzzi et al. (2022) e Yakubu et al. (2022).

## 6. Cálculos

**6.1. Determinar a área de pico para cada proteína no cromatograma, incluindo variantes de caseínas ( $\kappa$ -CN X2,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN X1,  $\alpha_{s1}$ -CN B,  $\alpha_{s1}$ -CN A e  $\beta\gamma$ -CN) e proteínas no soro do leite ( $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) (Figura 1). Leve em consideração que algumas variantes de caseína podem estar ausentes na amostra.**

**Figura 1.** Perfis cromatográficos do leite bubalino de diferentes búfalas (a, b, c e d). Considere que nem todas as variantes de caseína são expressas ao longo do leite de diferentes animais. Fonte: Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) Software





**6.2. Para o cálculo das quantidades de variantes de caseína ( $\kappa$ -CN X2,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN X1,  $\alpha_{s1}$ -CN B,  $\alpha_{s1}$ -CN A e  $\beta\gamma$ -CN), usar o seguinte procedimento:**

6.2.1. Calcular a área total dos picos das variantes de caseína (soma das áreas dos picos).

6.2.2. Calcular a proporção de cada variante de caseína de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Proporção de variante de caseína} = \frac{\text{área de pico de variante de caseína}}{\text{soma de áreas de pico de variantes de caseína}}$$

6.2.3. Calcular a concentração de cada variante de caseína em g/100 g de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração da variante de caseína (g/100g de leite)} = \text{Teor de caseína (g/100 g de leite)} \\ \times \text{Proporção da variante de caseína}$$

6.2.4. Facultativo: pode calcular a concentração da variante caseína em g/L de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração da variante de caseína (g/L leite)} = (\text{Concentração da variante de caseína} \\ \text{(g/100 g de leite)}) \times (\text{densidade do leite (g/mL)}) \times 10$$

### **6.3. Para o cálculo das quantidades de variantes de proteínas do soro de leite ( $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg), usar o seguinte procedimento:**

6.3.1. Calcular a área total de variantes de proteínas do soro de leite (soma das áreas de pico).

6.3.2. Calcular a proporção de cada variante de proteína do soro de leite de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Proporção de variante de proteína do soro de leite} \\ = \frac{\text{área de pico de variante de proteína do soro de leite}}{\text{soma das áreas de pico de proteína do soro de leite}}$$

6.3.3. Calcular a proteína total do soro de leite assumindo que a proteína total do leite = caseína + proteína do soro de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Teor de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)} = \text{proteína total do leite (g/100 g de leite)} \\ - \text{caseína (g/100 g de leite).}$$

6.3.4. Calcular a concentração de cada variante de proteína do soro de leite em g/100 g de leite, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Concentração de variante de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)} = \text{Teor de proteína do} \\ \text{soro de leite (g/100 g de leite)} \times \text{Proporção de variante de proteína do soro de leite}$$

6.3.5. Opcional: pode calcular a concentração de variantes de proteína do soro de leite em g/L de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração de variante de proteína do soro de leite (g/L leite)} = (\text{Concentração de variante de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)}) \times (\text{densidade do leite (g/mL)}) \times 10$$

## 7. Tempo de análise

- Preparação de soluções e materiais: 30 min
- Exatracão de variantes de proteínas: um lote de 24 amostras: 101 min.
- Tempo total da análise cromatográfica (por amostra): 53 min (13 min de equilíbrio + 40 min de corrida cromatográfica).
- Análise NIRS: 5 min.

## 8. Comentários adicionais

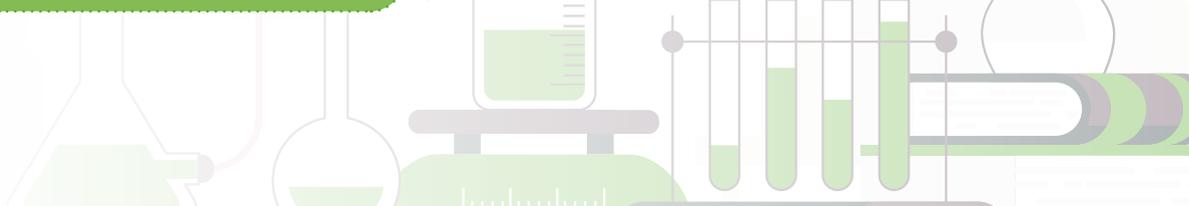
8.1. Tomar especial cuidado com a amostragem homogênea. Em alguns casos, quando o leite foi armazenado por longos períodos ou o leite é descongelado, ele tende a formar materiais particulados sólidos. Se houver formação de material particulado, agite vigorosamente o recipiente do leite para coletar uma amostra representativa. Caso contrário, descarte a amostra.

8.2. O programa de equilíbrio antes de cada execução de amostra é estritamente necessário para obter uma separação bem-sucedida das proteínas do leite.

Portanto, é necessário identificá-las e quantificá-las de forma eficiente no leite de diferentes espécies de ruminantes. Entre os ruminantes, o búfalo tem sido objeto de especial atenção mundial...

8.3. Verifique os limites máximos de fluxo de sua coluna antes de usá-la. Considere, que o programa envolve um fluxo máximo de 2,0 mL/min, o qual pode ser superior ao limite máximo de uma coluna diferente à proposta neste protocolo.

8.4. Se o seu equipamento de HPLC não contém um módulo de amostrador automático com refrigeração, você pode usar um refrigerador convencional e injetar as amostras manualmente. As amostras processadas devem ser armazenadas a 4 °C.



## 9. Agradecimentos

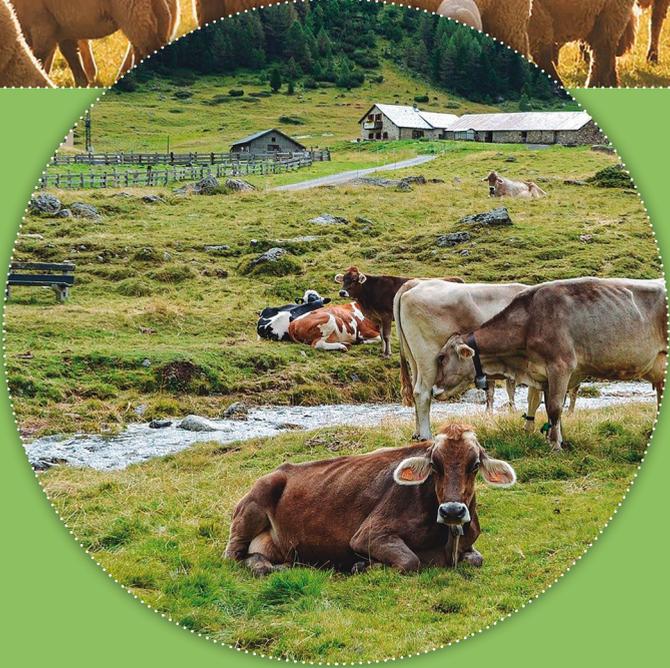
Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo apoio financeiro para desenvolver esta metodologia.

## 10. Referências

- Bonfatti, V; Giantin, M; Rostellato, R; Dacasto, M; Carnier, P. (2013). Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC. *Food Chem.* 136(2): 364-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.002.
- Bonfatti, V; Grigoletto, L; Cecchinato, A; Gallo, L; Carnier, P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *J. Chromatogr A.* 1195(1-2):101-6. doi: 10.1016/j.chroma.2008.04.075.
- Evangelista, C; Basiricò, L; Bernabucci, U. (2021). An Overview on the Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) on Farms for the Management of Dairy Cows. *Agriculture.* 11(4):296. doi: 10.3390/agriculture11040296
- Feligini, M; Bonizzi, I; Buffoni, JN; Cosenza, G; Ramunno, L. (2009). Identification and quantification of alphaS1, alphaS2, beta, and kappa-caseins in water buffalo milk by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57(7): 2988-92. doi: 10.1021/jf803653v.
- Fox, PF; McSweeney, PLH. (2003). *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins.* Editora: Kluwer Academic, New York, NY.
- Giannuzzi, D; Mota, LFM; Pegolo, S; Gallo, L; Schiavon, S; Tagliapietra, F; Katz, G; Fainboym, D; Minuti, A; Trevisi, E; Cecchinato, A. (2022). In-line near-infrared analysis of milk coupled with machine learning methods for the daily prediction of blood metabolic profile in dairy cattle. *Sci Rep.* 12(1):8058. doi: 10.1038/s41598-022-11799-0.
- Lima, EM; Vargas, JAC; Gomes, DI; Maciel, RP; Alves, KS; Oliveira, WF; Aguiar, GL; Reis, GC; Oliveira, LRS; Mezzomo, R. (2021). Intake, digestibility, and milk yield response in dairy buffaloes fed *Panicum maximum* cv. Mombasa supplemented with seeds of tropical açai palm. *Trop. Anim. Health Prod.* 53(1): 178. doi: 10.1007/s11250-021-02626-1.

- Melfsen, A; Hartung, E; Haeussermann, A. (2012). Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 95(11): 6465-76. doi: 10.3168/jds.2012-5388.
- Oliveira, WF; Lima, EM; Freitas, DR; Dos Santos, SS; Reis, GC; Gomes, DI; Alves KS; Maciel, RP; Vargas, JAC; Mezzomo, R. (2020). Production, chemical composition, and economic viability of Minas Frescal cheese from buffaloes supplemented with açai seed. *Trop. Anim. Health Prod.* 52(5): 2379-2385. doi: 10.1007/s11250-019-02178-5.
- Patiño, EM; Judis, MA; Negrette, MS; Pochon, DO; Cedres, JF; Rebak, G; Romero, AM; Doval, MM; Crudeli, GA. (2012). Influence of fish oil in the concentration of conjugated linoleic acid and omega 6 and 3 in buffalo milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64, 427-433. doi: 10.1590/S0102-09352012000200024.
- Swaisgood, HE. (1982). Chemistry of milk proteins. In: *Developments in dairy chemistry*. Vol 1. Ed. P.F. Fox, Editora: London: Applied Science Publishers. pp 1-59.
- Tsenkova, R; Atanassova, S; Itoh, K; Ozaki, Y; Toyoda, K. (2000). Near infrared spectroscopy for biomonitoring: cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *J. Anim. Sci.* 78(3): 515-22. doi: 10.2527/2000.783515x.
- Yakubu, HG; Kovacs, Z; Toth, T; Bazar, G. (2022). The recent advances of near-infrared spectroscopy in dairy production-a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62(3): 810-831. doi: 10.1080/10408398.2020.1829540

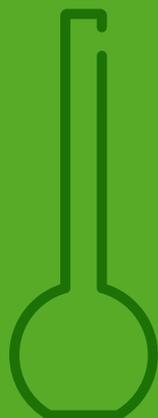




---

# PROTOCOLO PARA O ESTUDO DA BIOHIDROGENAÇÃO RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS DE SUPLEMENTOS LIPÍDICOS MISTURADOS COM FORRAGEIRAS USANDO UMA ABORDAGEM *IN VITRO*

---



**Julián Andrés Castillo Vargas**

*Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colômbia*

*Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colômbia*

## 1. Resumo

A biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados da dieta tem um efeito importante na qualidade composicional final da carne e do leite de ruminantes. Assim, diversas abordagens metodológicas têm sido desenvolvidas para compreender e modular esse processo bioquímico que ocorre no rúmen. Portanto, no presente capítulo, é apresentado um protocolo para realizar um ensaio *in vitro* para entender a biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen. O protocolo permite avaliar os efeitos de diferentes relações entre os ácidos linoleico e alfa-linolênico em suplementos sobre a produção de intermediários de ácidos graxos derivados da biohidrogenação desses ácidos graxos insaturados no rúmen, usando uma abordagem *in vitro*. Neste protocolo, propõem-se os passos experimentais para simular a escala laboratorial, o processo de fermentação ruminal e, assim, a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, os quais são posteriormente separados, identificados e quantificados usando cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID).

## 2. Introdução

A compreensão do processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (UFA) no rúmen fornece informações valiosas sobre a utilização de suplementos lipídicos pelo ruminante (Harvatine e Allen, 2006; Vargas et al., 2012; Vargas et al., 2018; Vargas et al., 2019). Para isso, várias estratégias experimentais foram propostas usando abordagens *in vivo*, *in situ* e *in vitro* (Enjalbert et al., 2003; Baldin et al., 2018; Vargas et al., 2018). Cada uma possui vantagens e limitações profundamente discutidas em diferentes revisões (Fievez et al., 2007; Jenkins et al., 2008 e Dewanckele et al., 2020); no entanto,

a abordagem *in vitro* tem ganhado atenção especial nos últimos anos por ser econômica, rápida, não requerer de operadores especializados para conduzir o ensaio e fornecer resultados potencialmente aplicáveis em condições *in vivo*. Essas características permitiram o desenvolvimento de múltiplos ensaios *in vitro* explorando os efeitos de diferentes misturas lipídicas na cinética de biohidrogenação de UFA no rúmen, cujos resultados têm sido utilizados para desenhar estratégias nutricionais para melhorar a produção de ruminantes e a qualidade dos produtos derivados (Ferlay et al., 2017).

Essas características permitiram o desenvolvimento de múltiplos ensaios *in vitro* explorando os efeitos de diferentes misturas lipídicas na cinética de biohidrogenação...

Tilley e Terry (1963) desenvolveram um protocolo de ensaio *in vitro* que tem sido amplamente utilizado para avaliar a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes de diferentes alimentos e forragens para ruminantes. Este método envolve duas etapas gerais: a primeira inclui a fermentação da forragem ou ração em inóculo ruminal sob condições anaeróbicas para simular a digestão ruminal. A segunda envolve uma digestão do conteúdo não degradado na primeira etapa com uma mistura de pepsina e HCl para simular a digestão no trato digestório posterior. A partir das etapas supracitadas, a primeira etapa desse processo (fermentação ruminal) é comumente utilizada para entender a biohidrogenação *in vitro* de UFA apresentando resultados bem-sucedidos (Ribeiro et al., 2007; Vargas et al., 2012 e Vargas et al., 2018). Assim, o objetivo deste capítulo é apresentar um protocolo geral para realizar um ensaio *in vitro* baseado no método de Tilley e Terry (1963) que envolve a separação, identificação e quantificação de UFA precursores, intermediários e produtos da biohidrogenação ruminal, usando cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID).

## 3. Reagentes

3.1. Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ; cilindro de gás).

3.2. *Preparação de tampão McDougall (McDougall, 1948) (Sigma Aldrich®):*

3.2.1. *No dia anterior da análise:* preparar uma pré-solução em água destilada, incluindo os seguintes sais:  $\text{NaHCO}_3$  (9,80 g/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2,77 g/L), KCl (0,57 g/L), NaCl (0,47 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,12 g/L). Manter a pré-solução em balão volumétrico de 1 L sob refrigeração.

3.2.2. *No dia da análise:* adicionar a pré-solução a um béquer de 1 L e, em seguida, adicionar 0,16 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dissolvendo este sal sob agitação contínua com aquecimento suave quando necessário. Quando o  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  estiver dissolvido e a solução atingir a temperatura ambiente, adicionar 1,0 g de ureia à mistura. Dissolver a ureia e transferir a mistura total para o balão volumétrico de 1 L. Completar a pré-solução para 1 L com água destilada. Finalmente, transferir o tampão preparado para um frasco de plástico ou vidro e mantê-lo a 39 °C em banho-maria termostatado até a preparação do inóculo.

3.3. *Solução de  $\text{HgCl}_2$  (2% p/v; Sigma Aldrich®):* pesar 2 g de  $\text{HgCl}_2$  e dissolvê-lo em 100 mL de água destilada.

3.4. Metanol (Sigma Aldrich®).

- 3.5. Tolueno (Sigma Aldrich®).
- 3.6. Ácido sulfúrico a 99,9% (Sigma Aldrich®).
- 3.7. Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich®).
- 3.8. Hexano (Sigma Aldrich®).
- 3.9. Diclorometano (Sigma Aldrich®).
- 3.10. Nitrogênio 5,0.
- 3.11. Hélio 5,0 (para a análise de ácidos graxos por GC-FID).
- 3.12. Mistura padrão comercial de ácidos graxos (Nu-Check® Prep, GLC-603).
- 3.13. Padrão interno (ácido graxo cis-10-17:1, 19:0 ou 23:0; Sigma Aldrich®).

## 4. Equipamento

### 4.1. Equipamento de laboratório

- a. Banho de água termostatado.
- b. Balança analítica.
- c. Sistema de gaseificação para CO<sub>2</sub> (composto por cilindro de gás CO<sub>2</sub> ligado a tubo plástico e ponteira de pipeta).
- d. Pipetas automáticas para transferência de líquido viscoso com ponteiras capilares (SOCOREX®).
- e. Micropipetas com ponteiras.
- f. Ultrafreezer.
- g. Agitador magnético com aquecimento.
- h. Potenciômetro.
- i. Termômetro digital.
- j. Liofilizador.
- k. Cromatógrafo gasoso equipado com amostrador automático, detector de ionização de chama e coluna.

## 4.2. Materiais

- a. Tubos de plástico de 100 mL com rolhas de borracha contendo um furo. O furo é essencial para a regulação da pressão interna do gás durante a incubação *in vitro*.
- b. Gaze ou pano para coar.
- c. Garrafa térmica.
- d. Balão volumétrico de 1 L.
- e. Béquer de 1L.
- f. Frasco de vidro ou plástico de 1 L.
- g. Proveta, pipeta graduada ou bureta de pelo menos 50 mL.
- h. Balas Safe-Lock Eppendorf® de 2 mL
- i. Suporte para balas Eppendorf®.
- j. Micro espátula.
- k. Suporte para tubos de ensaio.
- l. Tubos com tampa de rosca de 16 x 160 mm.
- m. Vials com insertos de vidro, septos e tampas plásticas.

## 5. Procedimento

### 5.1. Atividades a serem realizadas no dia anterior do ensaio *in vitro*

5.1.1. Em tubos de plástico de 100 mL, pesar cuidadosamente 500 mg de uma forragem seca e moída (por exemplo, capim kikuyu), usando balança analítica.

5.1.2. Selar os tubos com rolhas de borracha com um orifício e mantê-los em um suporte para tubos de ensaio (Figura 1).

5.1.3. Preparar as misturas de lipídios que deseja testar (tratamentos) usando pipetas de transferência automática de líquido viscoso e mantê-las em recipientes de vidro sob refrigeração.



Figura 1. Tubos com tampas de borracha com um orifício, dentro do banho termostático a ser usado nas incubações *in vitro*. Atenção: todo o corpo do tubo deve estar submerso na água a 39 °C no dia da análise. Fonte: Autor.



## **5.2. Atividades a serem realizadas no dia do ensaio *in vitro***

5.2.1. Pré-aquecer o tampão McDougall a 39 °C em banho-maria termostático, conforme indicado na seção 3.2.2 da seção de reagentes.

5.2.2. Adicionar as misturas lipídicas aos tubos plásticos de 100 mL preparados no dia anterior da análise e que contêm as amostras de forragem. Para a adição dos lipídios, usar as pipetas de transferência automática de líquido viscoso.

### **5.2.3. Coleta de líquido ruminal**

De um ruminante fistulado (bovino, ovino ou caprino), coletar pelo menos 50 mL de líquido ruminal, filtrando-o através de três camadas de gaze ou pano convencional. Fazer a coleta em uma garrafa térmica pré-aquecida a 39 °C e transportá-la para o laboratório o mais rápido possível.

**Nota:**

- a. Para o pré-aquecimento da garrafa térmica, encha-a com água pré-aquecida a 39 °C, e esvazie-a no momento da coleta do líquido ruminal.
- b. A amostra de líquido ruminal deve ser composta por líquido ruminal de três regiões ruminais: anterior e metade do saco ventral e do saco craniano (Zijderveld et al., 2011).

**5.2.4. Preparação do inóculo**

Em frasco plástico ou de vidro mantido a 39 °C em banho termostatado, misturar o líquido ruminal coletado na etapa 5.2.3 com o tampão McDougall na proporção 1:4, para constituir o inóculo a ser utilizado durante a incubação *in vitro*. Depois disso, ajustar o pH do inóculo para 6,8 borbulhando CO<sub>2</sub>. Manter a garrafa com o inóculo fechada e a 39 °C em um banho termostatado (Figura 2).

Figura 2. Inóculo preparado para incubações *in vitro*. Atenção: duas mangueiras foram ajustadas ao recipiente do inóculo, uma para borbulhar CO<sub>2</sub> e outra para servir o inóculo nos tubos de incubação. Fonte: Autor.

**5.2.5. Preparação dos sistemas de incubação e ensaio *in vitro***

5.2.5.1. Colocar os tubos plásticos de 100 mL com a mistura de forragem e lipídios no banho termostatado a 39 °C, utilizando o suporte apropriado. Assegurar-se de que os tubos estejam equilibrados a 39 °C, colocando-os no banho termostatado pelo menos 15 min antes do ensaio *in vitro*.

5.2.5.2. Tomar um tubo de 100 mL do banho de incubação e adicionar 50 mL de inóculo pré-aquecido a 39 °C usando uma proveta, pipeta graduada ou bureta de 50 mL, equilibrada a 39 °C. Gasear o tubo com CO<sub>2</sub>, selá-lo com a rolha de borracha e colocá-lo de volta ao banho termostatado a 39 °C. Repetir este processo com os outros tubos. Os tubos devem ser agitados manualmente a cada 2 horas.

5.2.5.3. Para avaliar as alterações das concentrações de ácidos graxos ao longo do tempo (por exemplo, 0, 2, 4, 6, 8 e 16 h), interrompa a biohidrogenação de UFA em momentos diferentes. Para isso, retirar o tubo plástico do banho termostatado e adicionar 500 µL de uma solução de HgCl<sub>2</sub> a 2% m/v e colocar o tubo em banho de gelo (Figura 3). Atenção: solução tóxica, manipule com luvas de nitrilo.

Figura 3. Banho de gelo para tubos de incubação após adição de solução de HgCl<sub>2</sub> 2% m/v para interromper a biohidrogenação de ácidos graxos. Fonte: Autor.



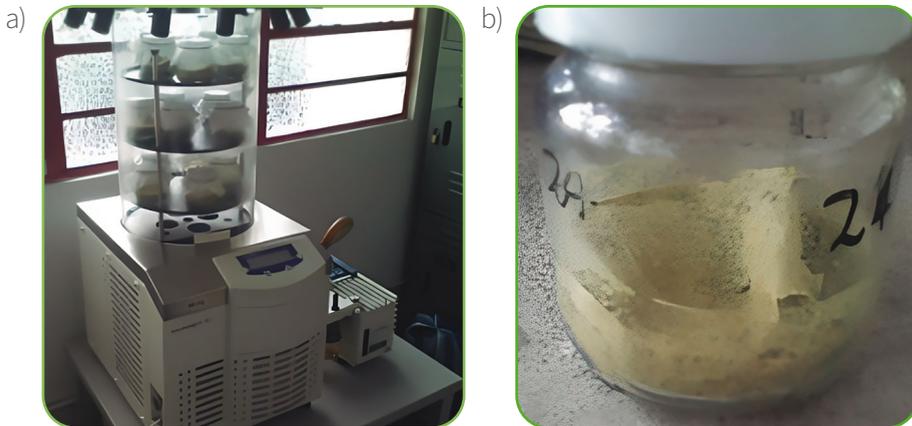
5.2.5.4. Transferir o conteúdo de cada tubo para um frasco de vidro de 100 mL e congelar a -60 °C em ultrafreezer.

### 5.3. Atividades a serem realizadas após o dia do ensaio *in vitro*

#### 5.3.1. Preparação de sistemas de incubação para análise de ácidos graxos usando GC-FID

5.3.1.1. Colocar o frasco de vidro de 100 mL com o inóculo congelado a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  em uma bandeja do liofilizador, cobrindo a boca do frasco com uma toalha de papel absorvente e ajustando-o com um elástico (Figura 4a). O tempo de liofilização é de 48h, podendo variar de acordo com o tipo e número de amostras no liofilizador. No entanto, o processo só pode ser interrompido quando toda a água for retirada do frasco (Figura 4b).

Figura 4. Liofilização do conteúdo de incubação. a) configuração dos frascos no liofilizador (atenção: a boca do frasco foi coberta com uma toalha de papel absorvente e ajustada à boca com um elástico). b) sistema de incubação resultante liofilizado. Fonte: Autor.



5.3.1.2. Após a liofilização, colocar o frasco com o conteúdo liofilizado em ultrafreezer a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise dos ácidos graxos.

#### 5.3.2. Extração, metilação e quantificação de ácidos graxos de sistemas de incubação liofilizados (Figura 5; Garcés e Mancha, 1993; Yamasaki et al. 1999):

5.3.2.1. Pesar 50 mg de sistema de incubação liofilizado e uma quantidade apropriada de padrão interno (caso for usar esse método de quantificação) em um tubo de tampa de rosca de 16 x 160 mm.

5.3.2.2. Adicionar ao tubo as seguintes quantidades de reagentes: 2148  $\mu\text{L}$  de metanol, 990  $\mu\text{L}$  de tolueno, 66  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico a 99,9% m/m, 1000  $\mu\text{L}$  dimetilsulfóxido (DMSO) e 2 mL de hexano.

5.3.2.3. Selar o tubo e aquecê-lo a 80 °C durante 2 horas em banho-maria.

5.3.2.4. Após as 2 h, deixar o tubo equilibrar à temperatura ambiente e recuperar a camada de hexano (camada superior da mistura) em um tubo Safe-Lock Eppendorf® de 2 mL.

5.3.2.5. Evaporar o hexano sob fluxo de nitrogênio e redissolver o resíduo resultante em 500 µL de diclorometano.

5.3.2.6. Transferir 250 µL de solução de diclorometano para um vial cromatográfico com um inserto de vidro apropriado, septo e tampa plástica.

5.3.2.7. Injetar a mistura em um GC-FID usando as seguintes condições cromatográficas:

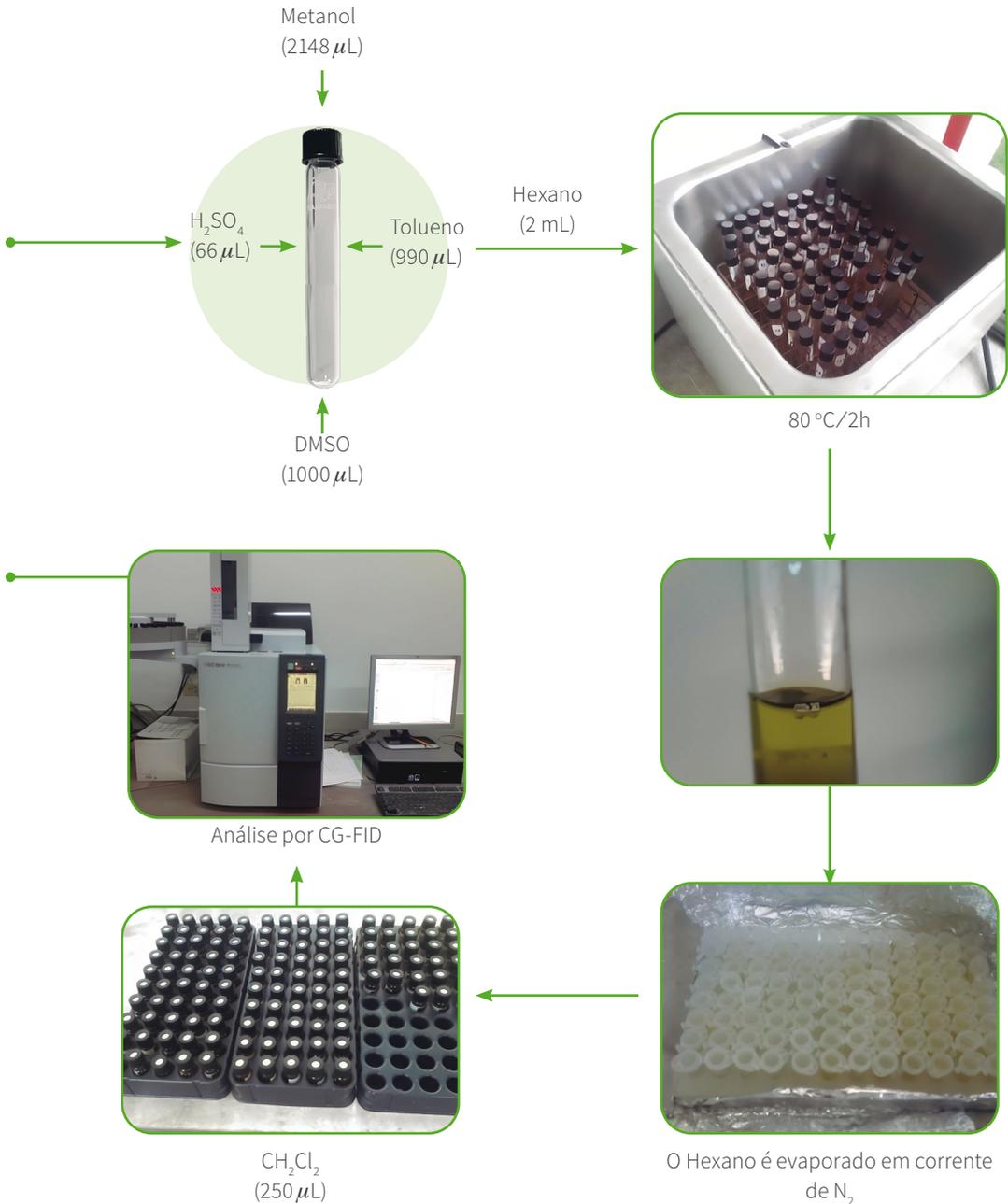
- a. Equipamento: Cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2014 (Shimadzu Manufacturing, Inc., Canby, OR, EUA) com amostrador automático.
- b. Coluna: capilar de sílica fundida (Rt-2560, 100 mx 0,25 mm id x 0,2 µm de espessura de filme; Restec®, Inc, Belefonte, PA, EUA).
- c. Gás carreador: Hélio 5,0.
- d. Fluxo do gás carreador: 1,12 mL/min.
- e. Programa cromatográfico:
- f. Temperaturas do detector e do injetor: 260 e 270 °C, respectivamente.
- g. Modo Split: 30:1.
- h. Volume de injeção: 1,0 µL.
- i. Programa de temperatura: A temperatura do forno é programada em um valor inicial de 140 °C permanecendo por 5 min, e após esse tempo, deve ser aumentada 4 °C/min por mais 5 min, até uma temperatura de 220 °C. Em seguida, deve ser aumentada 2 °C/min por 10 min, até uma temperatura final de 240 °C.

5.3.2.8. *Identificação de ácidos graxos:* Os ácidos graxos nas amostras podem ser identificados por comparação de seus tempos de retenção com os observados em padrões comerciais como Nu-Check® Prep (Elysian, MN, EUA; GLC-603).

5.3.2.9. *Quantificação de ácidos graxos:* A quantificação pode ser feita por comparação direta das áreas de pico para obter as proporções relativas de ácidos graxos. A concentração de ácidos graxos ou quantidades absolutas podem ser obtidas usando curvas de calibração apropriadas preparadas a partir de padrões comerciais (método padrão externo) ou usando ácidos graxos cis-10-17:1, 19:0 ou 23:0 como padrão interno (método padrão interno). Para este método, uma quantidade apropriada de

ácidos graxos precisa ser adicionada no início da extração de ácidos graxos e do procedimento de metilação (Seção 5.3.2.1).

Figura 5. Esquema de extração e quantificação de ácidos graxos nos sistemas de incubação. Fonte: Autor.



### 5.3.3. Análise da cinética de ácidos graxos

Finalmente, as concentrações de ácidos graxos podem ser calculadas em função do tempo para definir possíveis mudanças de precursores, intermediários e produtos associados à biohidrogenação ao longo do tempo, bem como os efeitos do tratamento nessas mudanças. A associação entre a concentração de ácidos graxos e o tempo pode ser ainda analisada sob diferentes abordagens estatísticas e de modelagem matemática. Para um maior entendimento e uso dessas abordagens, sugere-se a revisão dos trabalhos publicados por Ribeiro et al. (2007); Moate et al. (2008); Jenkins et al. (2008) e Vargas et al. (2018).

## 6. Tempo de análise

- a. Preparação do material: 40 min.
- b. Preparação de soluções e inóculo: 30 min.
- c. Preparação de sistemas de incubação: 5 min por tubo de incubação.
- d. Desenvolvimento das incubações: depende dos pontos de tempo definidos no experimento.
- e. Extração e metilação de ácidos graxos: 50 h por amostra (incluindo liofilização, bem como extração e metilação de ácidos graxos. Este tempo pode variar dependendo do liofilizador utilizado e do número de amostras simultaneamente liofilizadas).
- f. Análise cromatográfica de ácidos graxos: 50 min por amostra.

## 7. Comentários adicionais

Tomar especial cuidado de manter a temperatura a 39 °C em todos os instrumentos e inóculo usados durante as incubações *in vitro* para evitar a morte potencial de microrganismos no inóculo devido a choque térmico.

## 8. Agradecimentos

O autor agradece à Divisão de Investigación de Bogotá (DIB) da Universidad Nacional de Colombia e ao Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación

(Colciencias) pelo financiamento derivado do Projeto “Efecto de la suplementación de vacas lactantes con fuentes ricas en ácidos grasos insaturados sobre el perfil de la leche, transcripción de enzimas lipogénicas, actividad SRBP1 y su relación con diferentes componentes del perfil de ácidos grasos en leche” (código: 1115-452-21319) administrado pela Universidad de Antioquia.

## 9. Referências

- Baldin, M; Rico, DE; Green, MH; Harvatine, KJ. (2018). Technical note: An in vivo method to determine kinetics of unsaturated fatty acid biohydrogenation in the rumen. *J. Dairy Sci.* 101(5): 4259-4267. doi: 10.3168/jds.2017-13452
- Dewanckele, L; Toral, PG; Vlaeminck, B; Fievez, V. (2020). Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. *J Dairy Sci.* 103(9): 7655-7681. doi: 10.3168/jds.2019-17662
- Enjalbert, F; Eynard, P; Nicot, MC; Troegeler-Meynadier, A; Bayourthe, C. (2003). In vitro versus in situ ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from a raw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. *J. Dairy Sci.* 86(1): 351-9. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(03)73613-3
- Ferlay, A; Bernard, L; Meynadier, A; Malpuech-Brugère, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie.* 141: 107-120. doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.006
- Fievez, V; Vlaeminck, B; Jenkins, T; Enjalbert, F; Doreau, M. (2007). Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation in vivo, in vitro and in situ. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109(8): 740-756. doi: 10.1002/ejlt.200700033
- Garcés, R; Mancha, M. (1993). One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211(1): 139-143. doi: 10.1006/abio.1993.1244
- Harvatine, KJ; Allen, MS. (2006). Fat Supplements Affect Fractional Rates of Ruminal Fatty Acid Biohydrogenation and Passage in Dairy Cows. *J. Nutr.* 136(3): 677-685. doi: 10.1093/jn/136.3.677
- Jenkins, TC; Wallace, RJ; Moate, PJ; Mosley, EE. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86(2): 397-412. doi: 10.2527/jas.2007-0588
- McDougall, EI. (1948). Studies on Ruminant Saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43: 99-109.

- Moate, PJ; Boston, RC; Jenkins, TC; Lean, IJ. (2008). Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogenation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J Dairy Sci.* 91(2): 731-42. doi: 10.3168/jds.2007-0398
- Ribeiro, CVDM; Eastridge, ML; Firkins, JL; St-Pierre, NR; Palmquist, DL. (2007). Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* 90(3): 1405-16. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71626-0
- Tilley, JMA; Terry, RA. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Crassl. Soc.* 18: 104-111. doi: 10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x
- Vargas, JAC. (2019). Using multivariate factor analysis to characterize the unbranched fatty acid profile in bovine rumen fluid. *Rev. Colomb. Cienc. Pecuaria.* 32(3): 175-183. doi: 10.17533/udea.rccp.v32n3a02
- Vargas, JAC; Olivera-Angel, M; Ribeiro, CVDM; Caicedo, EED. (2018). In vitro rumen biohydrogenation kinetics of mixed linoleic and alfa-linolenic acids. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 31(3): 213-222. doi: 10.17533/udea.rccp.v31n3a06
- Vargas, JAC; Olivera, M. (2017). Polyunsaturated fatty acid type and ratio in lipid supplements alter the in vitro dry matter digestibility of kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus*). *Livest. Res. Rural. Dev.* 29: 129. <http://www.lrrd.org/lrrd29/7/jcfc29129.html>
- Vargas, JAC; Olivera, M; Pabón, ML; Carulla, JE. (2012). Reducción de la biohidrogenación del ácido linoleico y alfa linolénico por la adición de diferentes proporciones de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico. *Rev. Colomb. Quim.* 41: 395-408.
- Yamasaki, M; Kishihara, K; Ikeda, I; Sugano, M; Yamada, K. (1999). A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *JAOCS.* 76: 933-938. doi: 10.1007/s11746-999-0109-0
- Van Zijderveld, SM; Fonken, B; Dijkstra, J; Gerrits, WJ; Perdok, HB; Fokkink, W; Newbold, JR. (2011). Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(3): 1445-54. doi: 10.3168/jds.2010-3635





**Sello Editorial**

Universidad Nacional  
Abierta y a Distancia

**Sede Nacional José Celestino Mutis**

**Calle 14 Sur 14-23**

**PBX: 344 37 00 - 344 41 20**

**Bogotá, D.C., Colombia**

**[www.unad.edu.co](http://www.unad.edu.co)**

