

# 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.

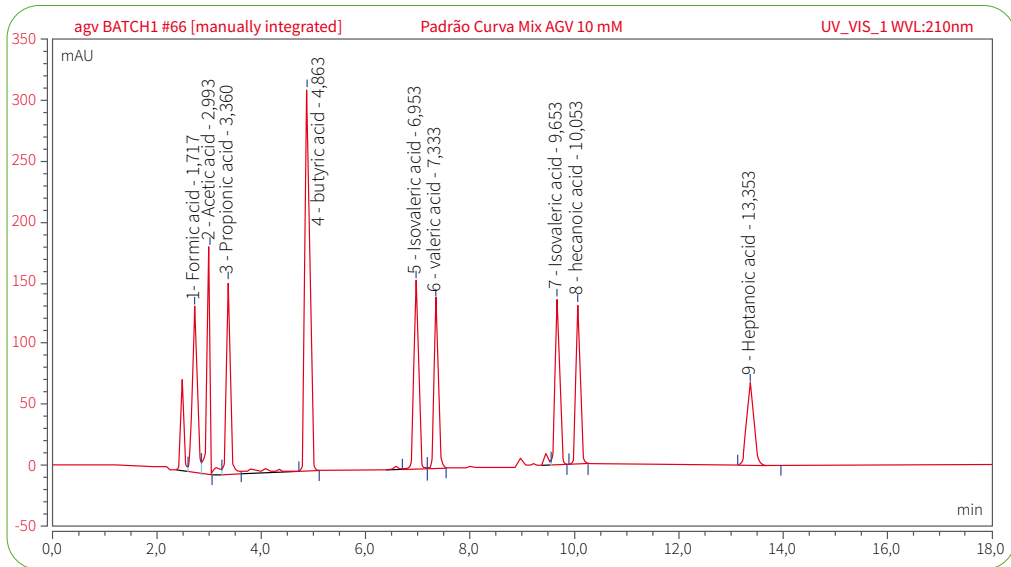
6.1.2. *Determinação 2:* Definir a concentração de cada composto nos diferentes padrões de calibração (0, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 mM neste protocolo).

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.

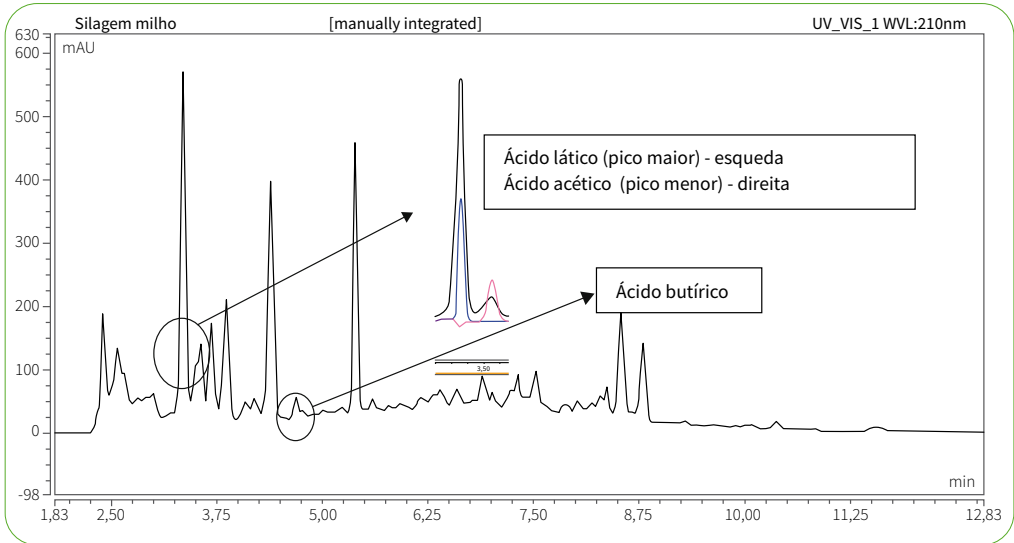
6.2.3. A concentração final de cada AGV pode ser calculada, usando a seguinte equação:

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

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.

