

# 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 capríico.

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 ( $\mu$ L) | Volume de água Milli-Q® ( $\mu$ 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  $\mu$ 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 °C).
- Balança analítica.
- Tubos de centrífuga de pelo menos 5 mL de capacidade.
- Micropipetas de 100  $\mu$ L a 5 mL e suas respectivas pontas.
- Filtro de seringa e membrana (membrana PES), marca Whatman®, de 0,45  $\mu$ 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:

- a. 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.
- b. 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.

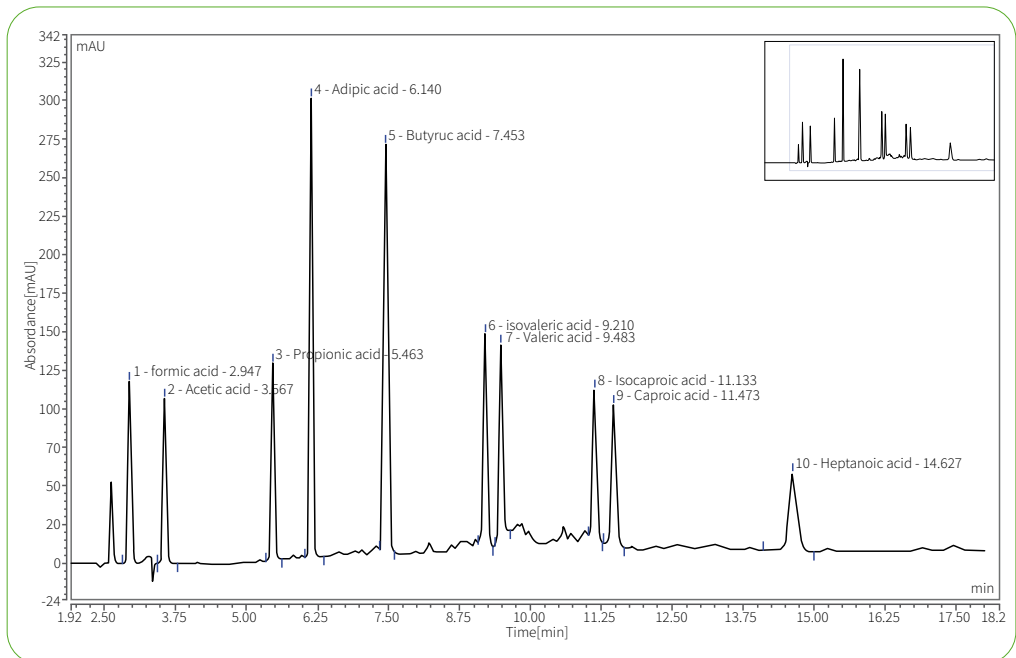
| Tempo (min)            | Fluxo (mL/min) | Fase A (Tampão fosfato) | Fase B (Acetonitrila) |
|------------------------|----------------|-------------------------|-----------------------|
| Equilíbrio             |                |                         |                       |
| -2,000                 | 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).

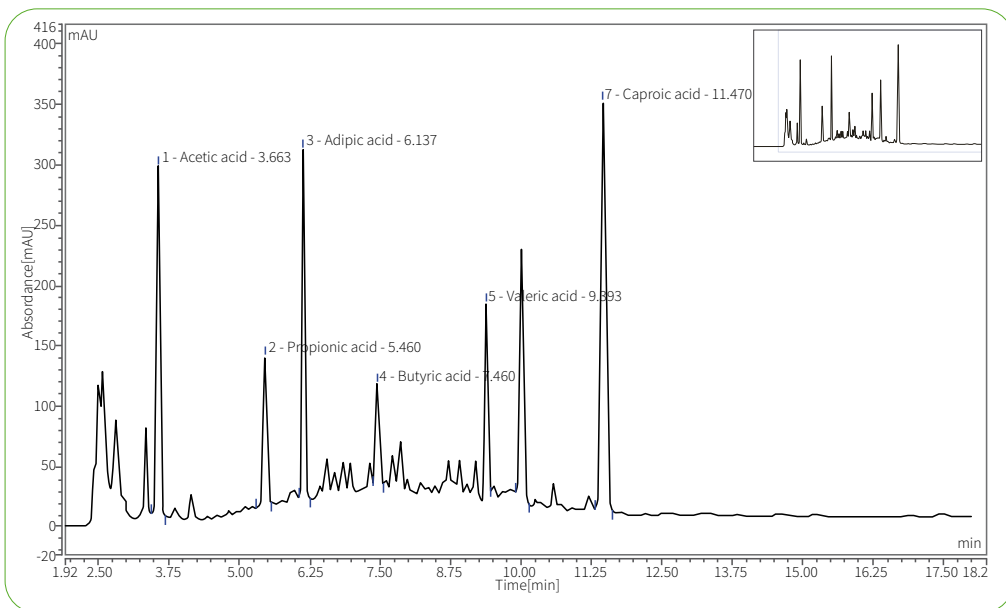


6.1.3. Realizar uma representação linear da área de pico versus concentração para cada um dos compostos (curva de calibração), e ajustar a melhor reta aos mesmos, usando o método dos mínimos quadrados. A partir desse processo, obter a equação da reta.

## 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