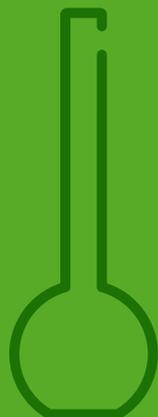


EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGV) EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO RUMINAL USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (RP-HPLC-DAD)



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 (μL)	Volume de água Milli-Q® (μL)
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 μL .
- 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 μL a 5 mL e suas respectivas pontas.
- Filtro de seringa e membrana (membrana PES), marca Whatman®, de 0,45 μm .
- 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 μm . 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 μL do extrato final em um vial cromatográfico.

5.3.2.2. Adicionar 500 μL 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 μL .

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.

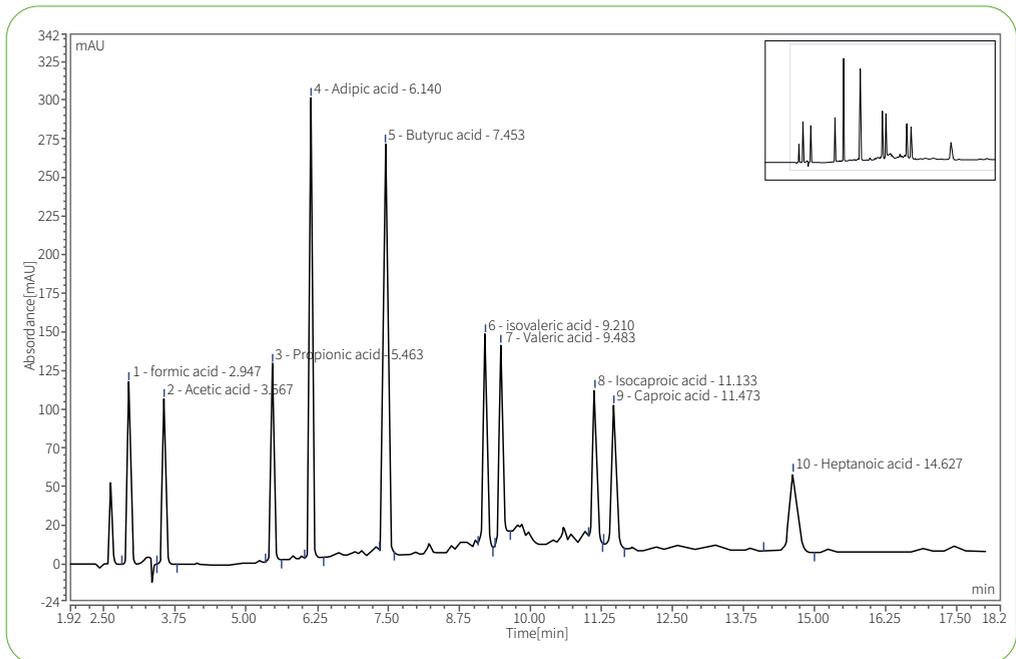
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A (Tampão fosfato)	Fase B (Acetonitrila)
Equilíbrio			
-2,000	0,750	95	5
Corrida cromatográfica			
0,000	0,750	95	5
6,500	0,750	60	40
12,000	0,750	60	40
12,001	0,750	60	40
13,000	0,750	95	5

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



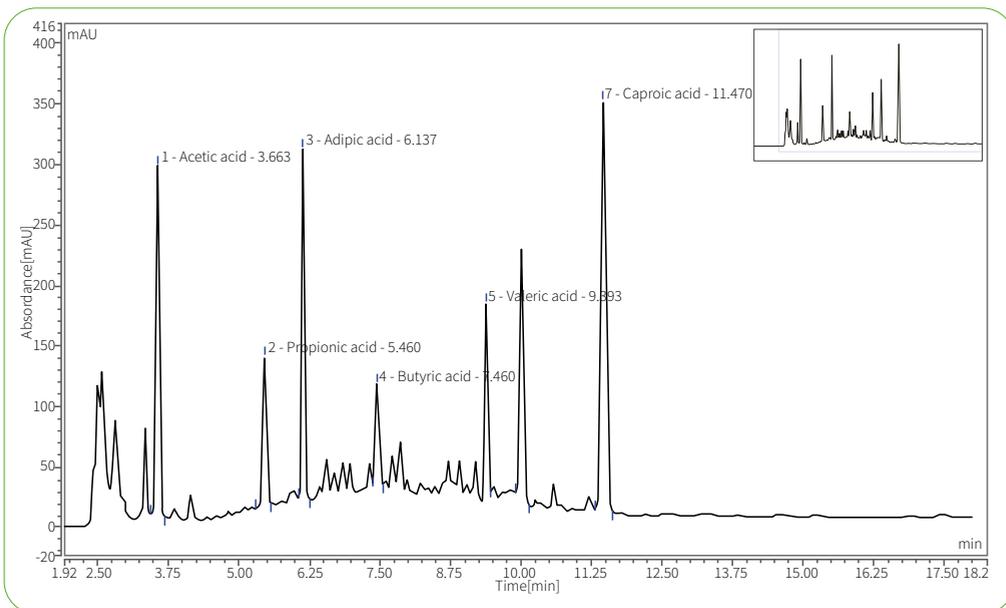
6.1.2. *Determinação 2:* Definir a concentração de cada composto nos diferentes padrões de calibração (0, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 mM neste protocolo).

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