

RAFAEL MACHADO DORNELLAS

**DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS EM FORRAGEIRAS  
TROPICAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC-UV)**

Dissertação apresentada ao  
departamento de Química da  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
como parte dos requisitos necessários  
para a obtenção do título de Mestre em  
Química

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Co-orientador: Dr. Jaílton da Costa Carneiro

Juiz de Fora

2009

*Dedico a Deus acima de  
tudo, meus pais, familiares  
e amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Prof. Dra. Maria Auxiliadora por todo ensinamento, carinho e paciência dedicados a mim durante este período do mestrado. Além da compreensão nos momentos difíceis que passei sempre vindo com uma conversa amiga para confortar e ajudar.

Ao Prof. Dr. Renato Camargo Matos, por ter me ajudado nos momentos que precisei sempre disposto a ensinar e com seus conselhos que vou levar para minha vida pessoal e profissional.

Aos professores do departamento de química pelos ensinamentos que levarei comigo na minha vida profissional.

Aos funcionários do departamento de química, Fernando, Serginho, Mariângela, Gedair, Simone e Alice por sempre me ajudarem quando foram solicitados.

Aos funcionários da EMBRAPA gado de leite por terem me recebido bem e colaborado na medida do possível no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Jaílton da Costa Carneiro, pela atenção e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do NUPIS pelas boas conversas, amizade e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A Michele por ter me ajudado diretamente no desenvolvimento e execução do trabalho, além de sua amizade.

A Ana Elisa por ter me ajudado na execução do trabalho, pelo carinho, afeto e amizade.

Aos meus pais, Denise e Lúcio por me apoiarem, psicológica, afetiva e financeiramente na medida do possível, para que este sonho pudesse ser realizado. Agradeço também pelo amor, paciência e por acreditarem sempre em mim e na minha capacidade.

Aos meus outros familiares por me apoiarem sempre, além do carinho recebido.

Aos meus amigos Rômulo, Lippy e Harlen, pela ajuda no trabalho com conversas agradáveis, momentos de descontração, além da amizade vocês.

À Fapemig, CAPES e PROPESQ/UFJF pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A qualidade nutricional da forragem pode ser identificada através da análise dos carboidratos estruturais presentes nas espécies. Os carboidratos estruturais estão distribuídos nas plantas entre a celulose, composta de glicose, hemicelulose que tem na sua estrutura a arabinose e xilose, e a pectina que é formada por arabinose entre outros compostos. Estas frações da parede celular é que chegam ao intestino dos ruminantes e são absorvidas em sua plenitude, sendo de suma importância o conhecimento da concentração presente para melhorar o desempenho dos bovinos em regime de pastejo. O presente trabalho propõe uma metodologia de extração com ultra-som e chapa de aquecimento, separação e quantificação por HPLC de glicose, arabinose e xilose em forrageiras tropicais. A metodologia de análise foi desenvolvida em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção na região do UV e coluna de fase reversa C-18. A composição e pH da fase móvel, comprimento de onda na detecção foram parâmetros estudados na otimização do método, no qual a melhor condição foi obtida com eluição isocrática usando como fase móvel acetonitrila/solução aquosa  $H_3PO_4$  pH 2,15 (1:99). Para diminuir o tempo e o custo da etapa de tratamento das amostras foi estudada a extração utilizando chapa de aquecimento, que se mostrou um processo mais rápido, reprodutível e eficiente se comparado a extração utilizando a autoclave. Os parâmetros de derivatização pré-coluna usando o ácido p-aminobenzóico foram estudados, sendo a melhor condição observada com a concentração do ácido de  $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$ , em um tempo de reação de 10 minutos em uma temperatura de  $80^\circ \text{ C}$ . Foram realizados testes para avaliação do método, aplicando padronização externa, dentre eles avaliação da resposta linear, limites de detecção e quantificação, repetitividade, seletividade e recuperação. A metodologia implementada foi aplicada a análise de 68 amostras de 3 espécies de forrageiras, folha e caule: *Pennisetum purpureum* cv. anão e pioneiro; *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, *Panicum maximum* cv. *tânzania* e *massai*. As faixas de concentrações encontradas expressas em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca foram de 31,98 a 188,38 para glicose, 6,28 a 30,95 para arabinose e 42,66 a 176,04 para a xilose.

Palavras-chave: Forragem. Carboidratos estruturais. HPLC.

## ABSTRACT

The nutritional quality of forage can be identified through structural analysis of carbohydrates present in the species. The structural carbohydrates in plants are distributed between the cellulose, composed of glucose, hemicellulose that has in its structure arabinose and xylose, and pectin which is composed of arabinose and others compounds. These fractions of the cell wall is that wounds the intestines of ruminant animals and are absorbed in its fullness. It is extreme importance the knowledge of this concentration to improve the performance of cattle on a pasture. This paper proposes a method for extraction with ultrasound and the heating plate, HPLC separation and quantification of glucose, arabinose and xylose in tropical forages. The method of analysis was developed in a high performance liquid chromatography with UV detection and reverse-phase C-18. The composition and pH of the mobile phase, wavelength in the detection parameters were studied in the optimization of the method. The best condition was achieved with isocratic elution using as mobile phase acetonitrile / aqueous H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.15 (1:99). In order to reduce the time and cost of the treatment and extraction of samples, this process was studied using the heating plate, which showed a more rapid, reproducible and efficient compared than extraction using the autoclave. The parameters of pre-column derivatization using p-aminobenzoic acid were studied. The best condition seen with the concentration of acid of 0.12 mol.L<sup>-1</sup>, a reaction time of 10 minutes at a temperature of 80 ° C. Tests were performed to evaluate the method, using external standardization, including evaluation of linear response, detection and quantification limits, repeatability, selectivity and recovery. The methodology implemented was applied to analysis of 68 samples (3 species of forage), leaf and stem: *Pennisetum purpureum* Schum cv. anão e *Pennisetum purpureum* Schum cv. pioneiro, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, *Panicum maximum* cv. Tanzania and *Panicum maximum* cv. Masai. The concentration ranges found expressed in mg.g<sup>-1</sup> dry weight were: 31.98 to 188.38 for glucose, 6.28 to 30.95 for arabinose and 42.66 to 176.04 for xylose.

Keywords: Forage. Structural carbohydrates. HPLC.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b>	Representação esquemática de uma célula vegetal (A) e fotografia microscópica evidenciando a parede celular (B) [6].....	20
<b>FIGURA 1.2</b>	Carboidratos das plantas. FDA = fibra em detergente ácido, FDN = fibra em detergente neutro, CSDN = carboidratos solúveis em detergente neutro, FSDN = fibra solúvel em detergente neutro, Açúcares = mono e oligossacarídeos. Lignina em FDA e FDN não está incluída porque ela não é um carboidrato [8].....	21
<b>FIGURA 1.3</b>	Fórmulas estruturais da xilose, glicose e arabinose.....	22
<b>FIGURA 1.4</b>	Imagens das espécies selecionadas para o estudo: (A) <i>Pennisetum purpureum</i> cv. pioneiro, (B) <i>Pennisetum purpureum</i> cv. anão, (C) <i>Brachiaria brizantha</i> , (D) <i>Brachiaria decumbens</i> , (E) <i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia e (F) <i>Panicum maximum</i> cv. massai.....	26
<b>FIGURA 1.5</b>	Reação de formação do derivado de glicose com 2,4-DNPhi.	30
<b>FIGURA 1.6</b>	Reação de formação do derivado de glicose com PABA.....	30
<b>FIGURA 2.1</b>	Esquema de representação da extração adaptada para os carboidratos estruturais na amostra.....	36
<b>FIGURA 3.1</b>	Cromatogramas obtidos para uma mistura de soluções padrão de glicose, xilose e arabinose (0,10 mmol.L <sup>-1</sup> ) por eluição isocrática com ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2,15 (A), pH = 3,10 (B) e pH = 4,15 (C); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 300 nm.....	50
<b>FIGURA 3.2</b>	Cromatogramas da mistura padrão dos três carboidratos, na concentração de 0,32 mmol.L <sup>-1</sup> para glicose e xilose e 0,10 mmol.L <sup>-1</sup> para arabinose. FM: ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (1:99); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção : (A) 345, (B) 265, (C) 325, (D) 285 e (E) 305 nm.....	51

<b>FIGURA 3.3</b>	Cromatograma das condições otimizadas para separação da mistura padrão dos três carboidratos após derivatização pré-coluna com PABA na concentração de 0,32 mmol.L <sup>-1</sup> para glicose e xilose e 0,10 mmol.L <sup>-1</sup> para arabinose. FM: ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (1:99); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 305 nm.....	53
<b>FIGURA 3.4</b>	Gráfico das médias das concentrações (DPR) de glicose, arabinose e xilose obtidas para amostra <i>Cynodon dactylon</i> , em mg.g <sup>-1</sup> matéria seca de planta tratadas com autoclave e chapa de aquecimento.....	55
<b>FIGURA 3.5</b>	Cromatogramas: (A) mistura padrão dos três carboidratos derivatizados com 2,4-DNPhi, na concentração de 10,00 mmol.L <sup>-1</sup> . (B) Amostra <i>Cynodon dactylon</i> , derivatizada com 2,4-DNPhi. FM: ACN/THF/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (7,5:10:82,5); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 335 nm.....	57
<b>FIGURA 3.6</b>	Cromatogramas da mistura padrão dos três carboidratos na concentração 10,00 mmol.L <sup>-1</sup> derivatizados (A) solução 2,4-DNPhi, na concentração de 2,00 mmol.L <sup>-1</sup> com 20% de ACN, (B) solução 2,4-DNPhi, na concentração de 2,00 mmol.L <sup>-1</sup> com 80% de ACN. FM: ACN/THF/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (7,5:10:82,5); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 335 nm.....	59
<b>FIGURA 3.7</b>	Cromatogramas da mistura padrão de glicose, arabinose e xilose na concentração 10,00 mmol.L <sup>-1</sup> derivatizados com solução 2,4-DNPhi, na concentração de (A) 0,20 mmol.L <sup>-1</sup> , (B) 0,70 mmol.L <sup>-1</sup> e (C) 1,70 mmol.L <sup>-1</sup> . FM: ACN/THF/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (7,5:10:82,5); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 335 nm.	61
<b>FIGURA 3.8</b>	Estudo da concentração de PABA - Média dos sinais obtido para análise das soluções padrão mistura de glicose, xilose e arabinose (0,60 mmol.L <sup>-1</sup> ) em diferentes concentrações de PABA, 15 min tempo de reação em banho ultratermostático a 95°C. Condições do HPLC: FM: ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (1:99); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 305 nm.....	62

<b>FIGURA 3.9</b>	Estudo do tempo de reação com PABA – Média dos sinais obtido para análise das soluções padrão mistura de glicose, xilose e arabinose (0,60 mmol.L <sup>-1</sup> ) em diferentes tempo de reação em banho ultratermostático a 95°C e solução 0,12 mol.L <sup>-1</sup> de PABA. Condições do HPLC: FM: ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (1:99); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 305 nm.....	63
<b>FIGURA 3.10</b>	Estudo da temperatura de reação - Média dos sinais obtido para análise das soluções padrão mistura de glicose, xilose e arabinose (0,60 mmol.L <sup>-1</sup> ) em diferentes valores de temperatura em banho ultratermostático, solução 0,12 mol.L <sup>-1</sup> de PABA e tempo de reação 10 min. Condições do HPLC: FM: ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (1:99); fluxo: 1,5mL.min <sup>-1</sup> ; detecção: 305 nm.....	64
<b>FIGURA 3.11</b>	Representação do esquema otimizado para o processo de derivatização pré-coluna dos carboidratos estruturais, com PABA, extraídos das amostras de forrageiras.....	65
<b>FIGURA 3.12</b>	Gráficos dos resíduos das curvas analítica de glicose, arabinose e xilose.....	67
<b>FIGURA 3.13</b>	Gráficos do fator de resposta das curvas analíticas para glicose, arabinose e xilose.....	68
<b>FIGURA 3.14</b>	Curvas analíticas obtidas (n=3) para glicose, xilose (0,16; 0,32; 0,48; 0,64 e 0,80 mmol.L <sup>-1</sup> ) e arabinose (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,30 mmol.L <sup>-1</sup> ) por eluição isocrática em coluna C-18, com ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2.15 (1:99), fluxo 1,5 mL.min <sup>-1</sup> , detecção 305 nm.....	69
<b>FIGURA 3.15</b>	Cromatograma obtido para análise da amostra <i>Cynodon dactylon</i> (25,0 mg) para determinação do LDM e LQM e avaliação da repetitividade. Eluição isocrática em coluna C-18, com ACN/sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2.15 (1:99), fluxo 1,5 mL.min <sup>-1</sup> , detecção 305 nm.....	71

- FIGURA 3.16** Cromatogramas da amostra *Cynodon dactylon*, cv *Coast-cross* nos comprimentos de onda: a) 285nm, b) 305nm, c) 325nm. FM: ACN/sol. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH=2,05 (1:99), fluxo:1,5 mL.min<sup>-1</sup>; detecção: 305 nm..... 73
- FIGURA 3.17** Concentrações médias (n=2) de glicose, arabinose e xilose encontrados nas quatro repetições de caule e folha nas amostras de *Pennisetum purpureum* cv. anão, *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro, e nas três repetições de caule e folha nas amostras de *Panicum maximum* cv. tanzânia, *Panicum maximum* cv. massai..... 81
- FIGURA 3.18** Concentrações médias (n=2) de glicose, arabinose e xilose encontrados nas três repetições de caule e folha nas amostras de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*.... 82

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b>	Composição, degradação ruminal e digestão intestinal das frações de carboidratos.....	24
<b>TABELA 2.1</b>	Condições de eluição e solventes testados no estudo da proporção do solvente.....	34
<b>TABELA 2.2</b>	Classificação das amostras de forrageira analisadas.....	47
<b>TABELA 3.1</b>	Condição otimizada para análise de carboidratos estruturais por HPLC.....	52
<b>TABELA 3.2</b>	Parâmetros de separação obtidos para análise da mistura padrão de glicose e xilose 0,32 mmol.L <sup>-1</sup> e arabinose 0,10 mmol.L <sup>-1</sup> por HPLC com detecção no UV com derivatização pré-coluna com PABA, eluição isocrática, condição otimizada.....	52
<b>TABELA 3.3</b>	Concentrações médias (desvio padrão relativo percentual) de Glicose, Arabinose e Xilose na amostra <i>Cynodon dactylon</i> , em mg.g <sup>-1</sup> matéria seca de planta tratada por autoclave e chapa de aquecimento.....	55
<b>TABELA 3.4</b>	Parâmetros otimizados no estudo da derivatização das amostras de forrageira com PABA.....	65
<b>TABELA 3.5</b>	Média das concentrações (mg.g <sup>-1</sup> matéria seca) de glicose, xilose e arabinose obtidas para a amostra <i>Cynodon dactylon</i> , analisadas 2 a 58 dias após sua derivatização pré-coluna.....	66
<b>TABELA 3.6</b>	Limites de detecção e quantificação do método estabelecidos através da análise (n = 7) de 25,0 mg da amostra <i>Cynodon dactylon</i> .....	70
<b>TABELA 3.7</b>	Concentrações de glicose, arabinose e xilose na amostra <i>Cynodon dactylon</i> , (250,0 mg) em diferentes comprimentos de onda.....	71

<b>TABELA 3.8</b>	Percentual de recuperação (DPR) ao fortificar 250,0 mg da amostra <i>Cynodon dactylon</i> , com mistura padrão dos carboidratos em três níveis de concentração (glicose e xilose: 0,32; 0,48; 0,64 mmol.L <sup>-1</sup> e arabinose 0,10; 0,15; 0,20 mmol.L <sup>-1</sup> ).....	74
<b>TABELA 3.9</b>	Percentual de recuperação (DPR) do branco fortificado com mistura padrão de glicose, xilose e arabinose em um nível de concentração.....	74
<b>TABELA 3.10</b>	Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g <sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R1 das amostras <i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia, <i>Panicum maximum</i> cv. massai, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. anão, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. pioneiro, <i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Brachiaria decumbens</i> .....	77
<b>TABELA 3.11</b>	Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g <sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R2 das amostras <i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia, <i>Panicum maximum</i> cv. massai, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. anão, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. pioneiro, <i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Brachiaria decumbens</i> .....	78
<b>TABELA 3.12</b>	Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g <sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R3 das amostras <i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia, <i>Panicum maximum</i> cv. massai, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. anão, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. pioneiro, <i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Brachiaria decumbens</i> .....	79

<b>TABELA 3.13</b>	Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em $\text{mg.g}^{-1}$ matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R4 das amostras <i>Pennisetum purpureum</i> cv. anão, <i>Pennisetum purpureum</i> cv. pioneiro.....	80
<b>TABELA 3.14</b>	Comparação dos níveis de concentração de glicose, arabinose e xilose, obtidos em diferentes espécies de forrageiras.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As	Simetria
ACN	Acetonitrila
Ara	Arabinose
CG	Cromatografia gasosa
cv.	Cultivares
CSDN	Carboidratos solúveis em detergente neutro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	Fibras de detergente ácido
FDN	Fibras de detergente neutro
FM	Fase móvel
FSDN	Fibra solúvel em detergente neutro
Gli	Glicose
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ID	Intestino Delgado
IG	Intestino Grosso
LD	Limite de detecção do método
LQ	Limite de quantificação do método
MS	Matéria seca
MWD	Detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas
PABA	Ácido p-Aminobenzóico
R1	Repetição das amostras 1
R2	Repetição das amostras 2
R3	Repetição das amostras 3
R4	Repetição das amostras 4
Rs	Resolução
THF	Tetraidrofurano
tr	Tempo de retenção
tr <sub>r</sub>	Tempo de retenção relativo
US	Ultra-som
UV	Ultravioleta.

Vis	Visível
Xil	Xilose
2,4 DNPhi	2,4 Dinitrofenilhidrazina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1	CARBOIDRATOS.....	21
1.2	RUMINANTES E SEUS COMPARTIMENTOS ESTOMACAIS.....	23
1.3	CARBOIDRATOS E DIGESTIBILIDADE.....	24
1.4	ESPÉCIES SELECIONADAS PARA OS ESTUDOS.....	25
1.5	TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATO.....	27
1.6	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS.....	28
1.7	DERIVATIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS.....	29
1.8	OBJETIVOS.....	31
1.8.1	Objetivos específicos.....	31
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>32</b>
2.1	REAGENTES.....	32
2.2	OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR HPLC.....	32
2.2.1	Estudo da composição da fase móvel.....	33
2.2.1.1	Estudo da proporção do solvente na composição da fase móvel.....	33
2.2.1.2	Estudo do pH da fase móvel.....	34
2.2.1.3	Estudo do comprimento de onda.....	34
2.3	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DA AMOSTRA.....	35
2.3.1	Estudo da extração da amostra.....	35
2.3.1.1	Estudo comparativo entre extração com autoclave e chapa de aquecimento...	37
2.3.2	Estudo da derivatização dos carboidratos.....	37
2.3.2.1	Derivatização com 2,4-DNPhi.....	38
	a) Estudo da proporção de solvente orgânico na solução de 2,4-DNPhi.....	39
	b) Estudo da concentração da solução de 2,4-DNPhi.....	39
2.3.2.2	Derivatização com PABA.....	39
	a) Estudo concentração do PABA.....	40
	b) estudo do tempo de reação.....	40
	c) Estudo da temperatura de reação.....	41
	d) Estudo da estabilidade das amostras derivatizadas.....	41
2.4	AVALIAÇÃO DO MÉTODO.....	42

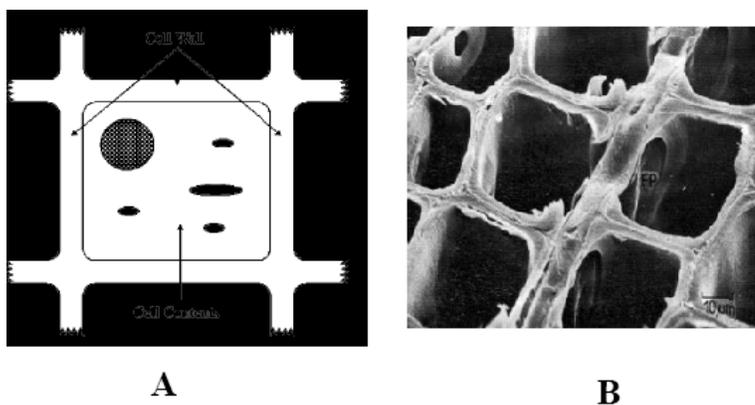
2.4.1	Padronização externa.....	42
2.4.1.1	Estudo da resposta linear do método.....	42
2.4.1.2	Curvas analíticas.....	43
2.4.1.3	Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade.....	43
2.4.1.4	Seletividade do método.....	44
2.4.1.5	Estudo de recuperação das amostras fortificadas.....	45
2.5	AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS.....	45
2.5.1	Classificação das amostras.....	46
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
3.1	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E PROPORÇÃO DOS SOLVENTES.....	48
3.1.1	Estudo do pH da fase móvel.....	49
3.1.2	Estudo do comprimento de onda.....	51
3.1.3	Condição otimizada para análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	52
3.2	EXTRAÇÃO DA AMOSTRA.....	54
3.2.1	Estudo comparativo da extração usando autoclave e chapa de aquecimento.....	54
3.2.2	Estudo da derivatização dos carboidratos.....	56
3.2.2.1	Derivatização dos carboidratos com 2,4-DNPhi.....	56
	a) Estudo da proporção de solvente orgânico na solução de 2,4-DNPhi.....	58
	b) Estudo da concentração da solução de 2,4-DNPhi.....	60
3.2.2.2	Derivatização dos carboidratos com PABA.....	62
	a) Estudo concentração do agente derivatizante.....	62
	b) Estudo do tempo de reação.....	63
	c) Estudo da temperatura de reação.....	64
	d) Estudo da estabilidade das amostras derivatizadas.....	65
3.3	AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO EXTERNA.....	66
3.3.1	Resposta linear do método.....	66
3.3.2	Curvas analíticas.....	68
3.3.3	Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade.....	69
3.3.4	Seletividade.....	71

3.3.5	Estudo de recuperação das amostras fortificadas.....	74
3.4	<b>DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, ARABINOSE E XILOSE NAS</b> <b>AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS.....</b>	<b>75</b>
3.4.1	Análise das amostras.....	83
3.4.1.1	Pennisetum purpureum cv. Anão.....	83
3.4.1.2	Pennisetum purpureum cv. Pioneiro.....	84
3.4.1.3	Brachiaria brizantha.....	85
3.4.1.4	Brachiaria decumbens.....	86
3.4.1.5	Panicum maximum cv. Tanzânia.....	86
3.4.1.6	Panicum maximum cv. Massai.....	87
3.4.2	Considerações.....	88
3.4.3	Comparação com outros estudos.....	89
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Características químico-bromatológicas são importantes atributos das forrageiras pois influenciam o valor nutritivo da forragem e também contribuem para o baixo desempenho dos bovinos em regime de pastejo. Os carboidratos estruturais e a lignina estão entre os componentes químicos das forragens. Sendo assim, são necessárias, para melhor caracterização das forrageiras, avaliações que permitam o conhecimento detalhado da composição química das forragens [1, 2].

A parede celular pode constituir-se de 30 a 80 % da matéria seca da planta forrageira, onde os carboidratos se concentram na celulose, hemicelulose e pectina. Além disto, podem constituir a parede celular (FIGURA 1.1) componentes químicos de natureza diversa, tais como tanino, nitrogênio, lignina, sílica e outros. A lignina constitui um polímero fenólico que se associa aos carboidratos estruturais, celulose e hemicelulose, durante o processo de formação da parede celular, alterando significativamente a digestibilidade destes carboidratos das forragens [3 - 5].

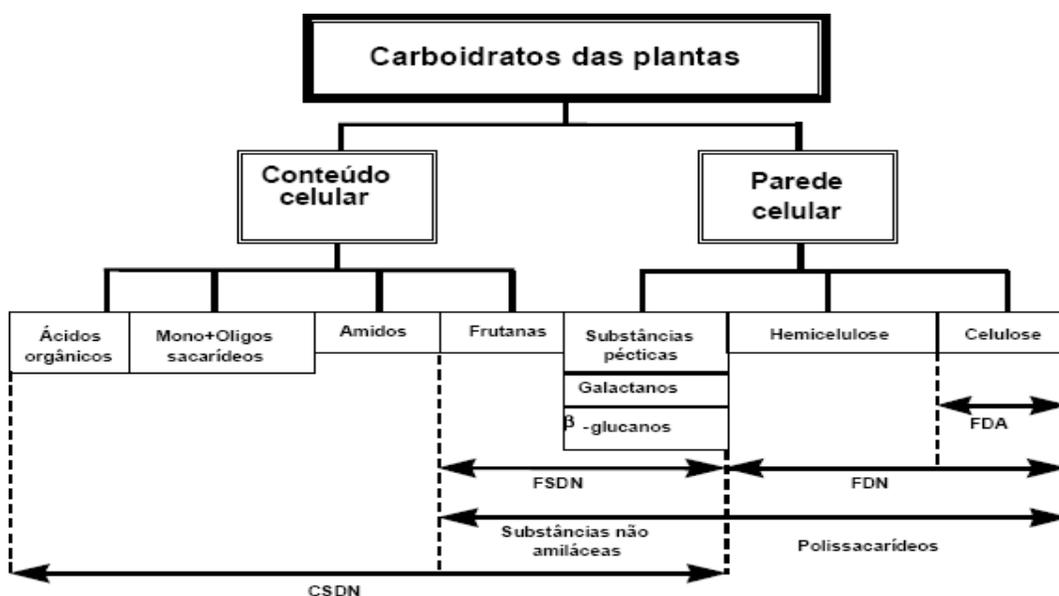


**FIGURA 1.1:** Representação esquemática de uma célula vegetal (A) e fotografia microscópica evidenciando a parede celular (B) [6].

## 1.1 CARBOIDRATOS

Os carboidratos são os principais constituintes das plantas forrageiras, correspondendo de 50 a 80% da massa sólida das forrageiras e cereais. As características nutritivas dos carboidratos das forrageiras dependem dos açúcares que as compõem, das ligações entre eles estabelecidas e de outros fatores de natureza físico-química. Assim, os carboidratos das plantas podem ser agrupados em duas grandes categorias conforme a sua menor ou maior degradabilidade, em estruturais e não estruturais, respectivamente [7].

Os carboidratos não estruturais incluem os carboidratos encontrados no conteúdo celular, desde os mais simples, como glicose e frutose, e os carboidratos de reserva das plantas, como o amido, a sacarose e as frutanas. Os carboidratos estruturais incluem aqueles encontrados normalmente constituindo a parede celular, representados principalmente pela pectina, hemicelulose e celulose (FIGURA 1.2), que são normalmente os mais importantes na determinação da qualidade nutritiva das forragens [7].



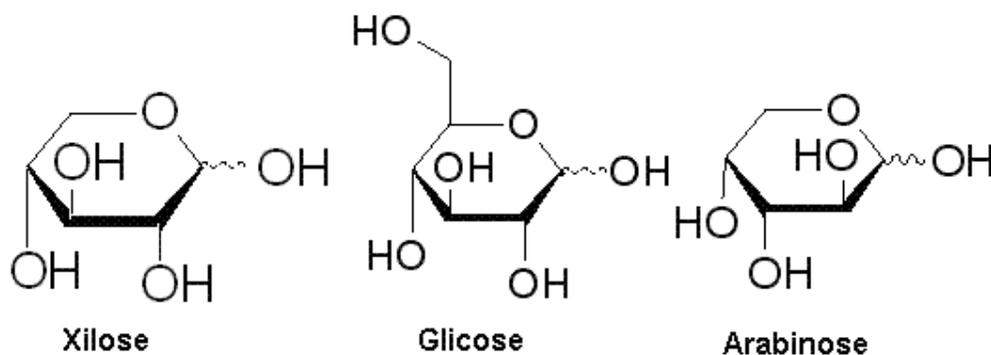
**FIGURA 1.2:** Carboidratos das plantas. FDA = fibra em detergente ácido, FDN = fibra em detergente neutro, CSDN = carboidratos solúveis em detergente neutro, FSDN = fibra solúvel em detergente neutro, carboidratos = mono e oligossacarídeos. Lignina em FDA e FDN não está incluída porque ela não é um carboidrato [8].

A glicose, um monossacarídeo ou simplesmente açúcar, é o carboidrato mais importante e um dos principais produtos da fotossíntese, sendo utilizada pelas células como fonte de energia e intermediário metabólico. A glicose, juntamente com a frutose e a galactose, é o carboidrato fundamental para a formação dos carboidratos maiores como sacarose, maltose e amido [2, 9 e 10].

A celulose é um polímero de  $\beta$ -glicose, formada através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, sendo que sua hidrólise completa produz glicose. A celulose tem uma estrutura linear ou fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias juxtapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis a água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais [2, 9 e 10].

A xilose também é amplamente distribuída nas plantas forrageiras, porém, não é encontrada na forma livre, e sim como unidades de polissacarídeos associados a hemicelulose. A hemicelulose é uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, que podem ser lineares ou ramificados, são amorfos e possuem peso molecular relativamente baixo. As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose dando elasticidade e impedindo que elas se toquem [2, 9 e 10].

A arabinose geralmente ocorre na forma de complexos presentes na hemicelulose e pectina. A pectina é um polissacarídeo ramificado constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. As ramificações da pectina servem para aprisionar a água ao redor da parede celular, a fim de tornar o meio mais gel [2, 9 e 10]. A FIGURA 1.3 apresenta as estruturas dos três carboidratos analisados neste trabalho.



**FIGURA 1.3:** Fórmulas estruturais da xilose, glicose e arabinose.

## 1.2 RUMINANTES E SEUS COMPARTIMENTOS ESTOMACAIS

Os ruminantes são mamíferos herbívoros que possuem vários compartimentos estomacais, denominados de multi-estomacais ou poligástricos. O estômago dos ruminantes possuem quatro compartimentos que são denominados: o rúmen, retículo, omaso e abomaso.

O rúmen ou pança é o primeiro compartimento do estômago dos ruminantes, onde vivem bactérias, protozoários (principalmente ciliados) e fungos que fermentam os carboidratos não estruturais e estruturais presentes na forragem. Periodicamente o animal faz o alimento voltar à boca para ser mastigado e, quando a massa alimentar está suficientemente triturada e a parede celular da forragem já está bem fermentada pelos microorganismos, esta massa é então enviada para outro compartimento estomacal, o omaso [11, 12].

O retículo é o segundo compartimento estomacal, que consiste em uma membrana que separa o rúmen do omaso, não exercendo nenhuma função na digestão [11, 12].

O omaso é a terceira divisão do estômago dos ruminantes, localizada entre o barrete e o abomaso. No omaso ocorre a absorção do excesso de água do bolo alimentar, que é passado então para o último compartimento estomacal, o abomaso [11, 12].

O abomaso é a quarta câmara do estômago dos ruminantes, onde ocorre a digestão. É um saco alongado, com estrutura e funções comparáveis às do estômago de não-ruminantes. Após o término do processo de fermentação e digestão das forragens realizados nestes três compartimentos estomacais dos ruminantes, o bolo alimentar é enviado para o intestino delgado e posteriormente ao intestino grosso, completando a absorção dos nutrientes pelos ruminantes [11, 12].

### 1.3 CARBOIDRATOS E DIGESTIBILIDADE

A composição, degradação ruminal e digestão intestinal de frações de carboidrato estão divididas por carboidratos não estruturais, carboidratos estruturais, além de outras espécies químicas presentes. A TABELA 1.1 mostra estas divisões [7]. As frações A, B<sub>1</sub> e parte de B<sub>2</sub> são consideradas carboidratos não estruturais, além de outros elementos presentes. De acordo com o modelo adotado para definir a composições das frações de carboidrato, a fração A consiste de carboidratos não estruturais, as frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> consistem de amido, pectinas, e glucanas, a fração B<sub>3</sub> consiste em fibra indisponível, celulose e hemicelulose, e a fração C consiste em lignina e fibra associada à lignina [13].

**TABELA 1.1:** Composição, degradação ruminal e digestão intestinal das frações de carboidratos em forrageiras.

Fração	Composição	Degradabilidade Ruminal, %/hora	Digestibilidade Intestinal, %
A <sub>1</sub>	Carboidratos	99 a 100	≤ 1
A <sub>2</sub>	Ácidos orgânicos	1 a 2	100
B <sub>1</sub>	Amido	20 a 40	75
B <sub>2</sub>	Fibra disponível, pectina e glucanas	40 a 60	ID = 0%, IG = 100%
B <sub>3</sub>	Fibra indisponível, celulose e hemicelulose	2 a 10	ID = 0%, IG = 100%
C	Lignina, fibra associada a lignina	0	0

ID = Intestino Delgado, IG = Intestino Grosso.

Como podemos observar na TABELA 1.1, a degradação dos carboidratos não estruturais, presentes na fração A é muito rápida, de 99 a 100 % por hora de ruminação, sendo que, quase na sua totalidade é absorvida pelos microorganismos presentes no rumem, não sendo então aproveitados nutritivamente para o animal [7, 8 e 13].

A fração B<sub>2</sub> possui uma degradação menor, 40 a 60 % por hora de ruminação, com a absorção de 100% da fração não degradada pelo rumem no animal. Porém esta fração contém pouco carboidrato estrutural, presente apenas a arabinose na pectina. A arabinose se apresenta em pequenas quantidades nas plantas forrageiras, representando uma contribuição mínima na nutrição animal [7, 8 e 13].

A fração B<sub>3</sub> possui uma degradação mínima no rumem de 2 a 10 % por hora de ruminação e uma absorção de 100 % da fração não degradada pelo rumem no animal. Sendo esta fração da forrageira constituída na sua totalidade de celulose e hemicelulose, que são constituídas principalmente dos carboidratos estruturais, glicose, arabinose e xilose. A identificação e quantificação destes três carboidratos é de suma importância para o conhecimento do valor nutricional de cada espécie de forrageira [7, 8 e 13].

#### 1.4 Espécies de forrageiras selecionadas para os estudos

A natureza e concentração dos carboidratos estruturais da parede celular são os principais determinantes da qualidade dos alimentos volumosos, especialmente de forragens [7].

As forrageiras de clima tropical, em relação às espécies de clima temperado, são caracterizadas por apresentarem baixos teores de carboidratos solúveis e pela elevada proporção de parede celular, conseqüentemente, de carboidratos estruturais. O elevado conteúdo de parede celular das gramíneas tropicais está associado a aspectos de natureza anatômica das espécies em razão da alta proporção de tecido vascular característico das plantas C<sub>4</sub> [7].

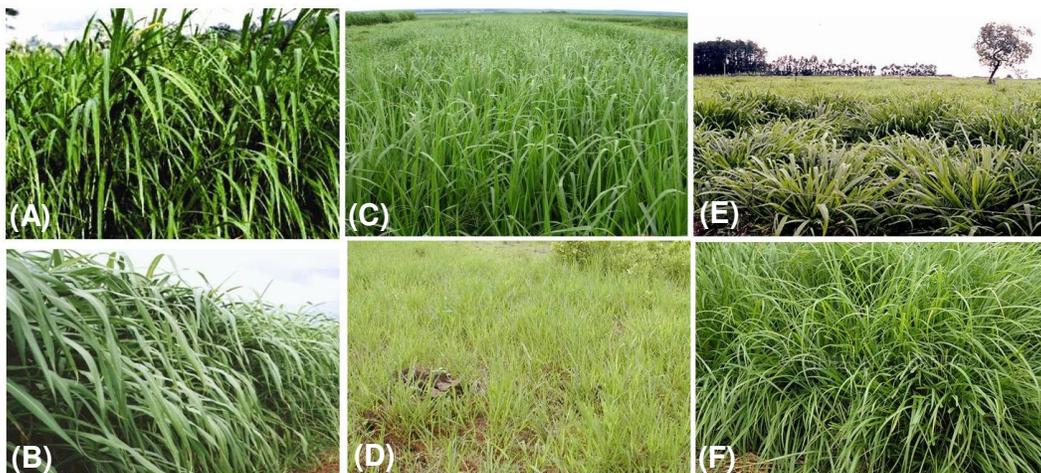
Os níveis de carboidratos estruturais são bem mais elevados em gramíneas do que em leguminosas, e no caule em relação às folhas. Com o avançar da maturidade, verificam-se aumentos nos teores de carboidratos estruturais e redução nos carboidratos de reserva, o que depende, em grande parte, das proporções de caule e folhas. Isso se reflete na digestibilidade da forragem, que declina de maneira especialmente mais drástica para as gramíneas do que para as leguminosas [14].

Escolheu-se para este trabalho a análise de três espécies de forrageiras tropicais, *Pennisetum purpureum* com os cultivares (cv.) anão e pioneiro, conhecida comercialmente como capim-elefante; *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*; *Panicum maximum* cv. tanzânia e massai, para se avaliar a concentração dos carboidratos. Estas espécies foram selecionadas, pois possuem um elevado potencial produtivo e nutritivo [15 - 20].

O *Pennisetum purpureum* destaca-se pelo alto potencial de produção de forragem, bom valor nutritivo e facilidade de adaptação às condições climáticas predominantes no Brasil [21 – 25].

A espécie *Panicum maximum* tem sido utilizada há muito tempo no Brasil, apresenta alto potencial de produção, boa adaptação a uma grande faixa de climas, conta com várias cultivares, sendo que muitas ainda não são suficientemente conhecidas em sua fisiologia [26, 27].

As gramíneas do gênero *Brachiaria* são largamente utilizadas em pastagens na América Tropical. É também o gênero mais usado no Brasil e que contribuiu significativamente para a expansão das áreas de pastagens no Brasil Central [28]. É uma forrageira de grande potencial, principalmente em período de seca [29].



**FIGURA 1.4:** Imagens das espécies selecionadas para o estudo: (A) *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro, (B) *Pennisetum purpureum* cv. anão, (C) *Brachiaria brizantha*, (D) *Brachiaria decumbens*, (E) *Panicum maximum* cv. tanzânia e (F) *Panicum maximum* cv. massai.

## 1.5 TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATOS

Na literatura são descritas várias técnicas para a identificação e quantificação de carboidratos em diferentes matrizes como a eletroquímica utilizando eletrodos bioenzimáticos [30], análise por injeção em fluxo com detector amperométrico e reator enzimático [31], eletroforese capilar com detector ultravioleta (UV/Vis) [32], cromatografia a gás (CG) com detector de ionização de chama após derivatização da amostra [33, 34], cromatografia a gás (CG) acoplada ao espectrômetro de massa [35], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector UV/Vis [36 – 38], HPLC acoplada ao espectrômetro de massa [39], HPLC com detecção por índice de refração [40, 41].

Dentre as técnicas aplicadas para a quantificação dos carboidratos em forrageiras ou matrizes similares a cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais difundida.

Por não apresentarem grupos cromóforos e nem grupos fluoróforos, os carboidratos não podem ser detectados diretamente por detectores fotométricos ou fluorimétricos. Geralmente os métodos mais utilizados empregam detectores de índice de refração, apesar deste tipo de detector apresentar baixa sensibilidade e ser incompatível com uso de gradientes de eluição da fase móvel [42].

Estes fatores são importantes e limitantes quando se trata de análise de amostras complexas e com baixos níveis de concentração. Altas sensibilidades são atingidas pela marcação dos analitos com grupos cromóforos ou fluoróforos, através das técnicas de derivatização pré-coluna ou pós-coluna em HPLC. As vantagens da derivatização pré-coluna são modificação ou remoção da matriz da amostra e enriquecimento seletivo dos derivados [42, 43].

O processo de extração e quantificação dos carboidratos estruturais utilizando detergente neutro é o mais usado. Este processo consiste na diferença de peso dos carboidratos solúveis em detergente neutro, que são os não estruturais, e a fibra insolúvel em detergente neutro [8]. Assim se obtém o valor dos carboidratos estruturais totais, não conseguindo um valor mais preciso sobre a composição exata dos mesmos.

O departamento de energia dos Estados Unidos da América, no ano de 2006, padronizou uma metodologia de extração e determinação de carboidratos estruturais em plantas, empregando o HPLC com detecção por índice de refração, com um tempo de análise de 35 minutos para cada injeção no aparelho [44].

No Brasil, apenas Brito e colaboradores [40], publicou um artigo, no qual quantificou os carboidratos estruturais, glicose, arabinose e xilose, presente nas três frações da parede celular, celulose, hemicelulose e pectina, em amostras de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. A técnica empregada pelos autores foi HPLC com detecção por índice de refração.

No contexto internacional, até a presente data, apenas três trabalhos foram publicados, quantificando os carboidratos estruturais, glicose, arabinose e xilose, presente nas três frações da parede celular, celulose, hemicelulose e pectina, porém nenhum analisou forrageiras tropicais que são comumente cultivadas no Brasil.

Mandebvu e colaboradores [35] quantificou os três carboidratos estruturais na planta inteira (caule + folha) nas espécies *Cynodon spp cv. Tifton 85* e *Cynodon spp cv. Coastal* utilizando cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa.

Dien e colaboradores [34] quantificou os carboidratos nas espécies *Medicago sativa* L. (Alfalfa), *Phalaris arundinacea* L. (Reed canarygrass) e *Panicum virgatum* L. (Switchgrass) utilizando cromatografia a gás com detector de ionização de chama. Casler e colaboradores [41], quantificou os carboidratos na espécie *Bromus Inermis cv. Less* por HPLC com detecção por índice de refração.

No presente trabalho é proposto um método por HPLC com detecção UV para separação e quantificação dos carboidratos estruturais após derivatização pré-clouona de glicose, xilose e arabinose presentes nas três frações da parede celular, celulose, hemicelulose e pectina, em amostras de forrageiras tropicais.

## 1.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS

Amostras complexas, como as forrageiras, necessitam de tratamento prévio para eliminar possíveis interferentes para a análise e também liberar da parede celular, os analitos de interesse. Para a análise de carboidratos estruturais em forrageiras utiliza-se normalmente extração com etanol e hidrólise ácida.

O processo de extração para carboidratos estruturais utilizado em matrizes de forrageiras foi inicialmente proposto por Theander & Westerlund e colaboradores [45] e posteriormente foi aperfeiçoado por Hatfield e colaboradores [46] e por Brito e colaboradores [40]. O procedimento consiste inicialmente na extração dos carboidratos não estruturais, pigmentos e ácidos orgânicos com etanol 80% (V/V),

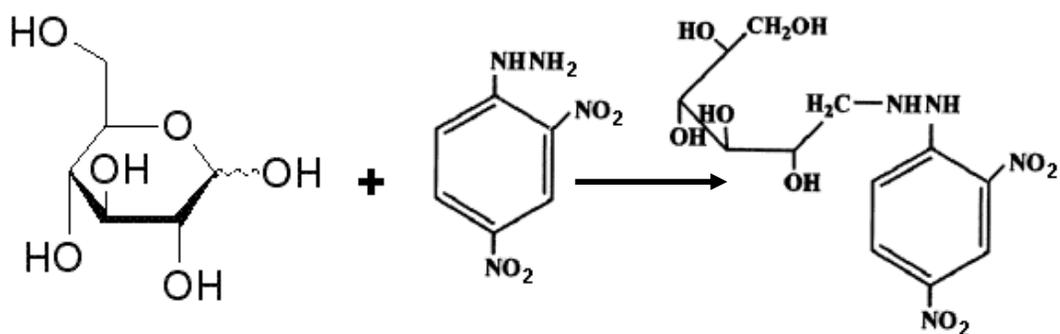
utilizando um banho de ultra-som para acelerar este processo. Posteriormente submete-se o extrato sólido a uma hidrólise ácida em autoclave, utilizando ácido sulfúrico  $12,00 \text{ mol.L}^{-1}$ , onde ocorre à liberação da lignina da parede celular, chamada lignina Klason e a hidrólise dos polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, tornando assim possível a análise dos carboidratos estruturais.

## 1.7 DERIVATIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS

Como citado no item 1.5, a derivatização dos carboidratos se faz necessária para a análise em detectores fotométricos, devido ausências de grupos cromóforos em sua estrutura. O processo de derivatização pode ocorrer pré-coluna, ou seja, no preparo da amostra, antes de ser injetado no HPLC, ou por uma bobina de reação acoplada à coluna cromatográfica. Já na derivatização pós-coluna, uma bobina de reação contendo o agente derivatizante é acoplada entre a coluna cromatográfica e o detector, realizando a derivatização dos analitos após sua separação [42, 43].

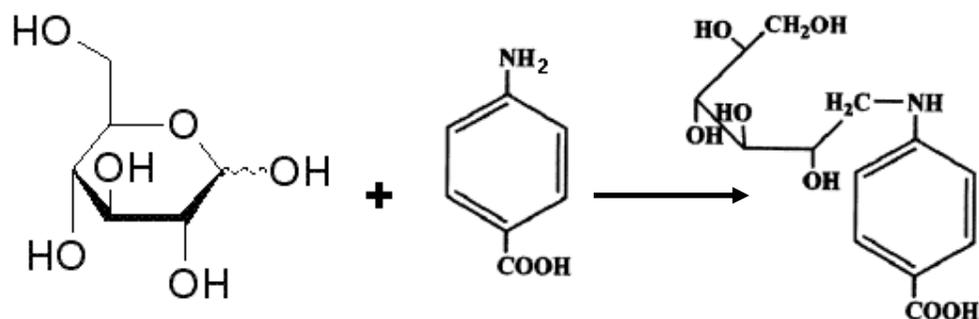
Vários agentes derivatizantes podem ser utilizados neste processo de derivatização pré-coluna, sendo os escolhidos para este trabalho os reagentes: ácido p-aminobenzóico (PABA), 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4 DNPhi).

O reagente 2,4 DNPhi permite a formação de um cromóforo com capacidade de absorver radiação na região do UV, sendo amplamente utilizada na derivatização de aldeídos para a determinação em HPLC com detecção UV [47]. Até o momento não há descrição na literatura para o uso deste reagente na derivatização de carboidratos para a análise em HPLC com detecção UV, sendo então neste trabalho verificado a possibilidade da utilização do mesmo para a derivatização dos analitos em forrageiras. A FIGURA 1.5 apresenta a reação entre 2,4-DNPhi e a glicose, para a formação do seu derivado.



**FIGURA 1.5:** Reação de formação do derivado de glicose com 2,4-DNPh.

O reagente PABA também permite a formação de grupos cromóforos em carboidratos e é amplamente utilizado para a análise de carboidratos com detectores fotométricos [36 – 38, 42, 43]. A FIGURA 1.6 apresenta a reação entre PABA e a glicose, para a formação do seu derivado.



**FIGURA 1.6:** Reação de formação do derivado de glicose com PABA.

## 1.8 OBJETIVOS

Desenvolvimento e aplicação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do UV, para determinação simultânea de glicose, arabinose e xilose, após derivatização pré-coluna, em amostras de forrageiras tropicais utilizadas na alimentação de ruminantes no Estado de Minas Gerais.

### 1.8.1 Objetivos específicos:

1. Otimizar os parâmetros de separação e determinação simultânea dos carboidratos estruturais por cromatografia líquida de fase reversa (C-18) com detecção na região do UV.

2. Estudar as condições de reação para o processo de derivatização dos analitos utilizando cada um dos agentes derivatizantes: 2,4 DNPh e PABA.

3. Otimizar as etapas de tratamento e extração das amostras de forrageiras para análise por HPLC utilizando chapa de aquecimento e comparar os dados obtidos com o método convencional empregando autoclave.

4. Aplicar a metodologia otimizada para determinação de xilose, arabinose e glicose nas frações caule e folha de três espécies de forrageiras tropicais.

5. Verificar do grau de correlação na concentração dos carboidratos entre as frações caule e folha das espécies e entre cada carboidrato em cada fração analisada.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 REAGENTES

Ácido p-aminobenzóico (PABA), cianoborohidreto de sódio e os padrões de glicose, arabinose, xilose foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.). Acetonitrila (ACN) grau HPLC, foi adquirida da J. T. Baker (Edo. Méx., México). Dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio, álcool etílico, foram adquiridos da Vetec (SP, Brasil). Água deionizada produzida em um ultrapurificador (Milli-Q – Quantum Ex) foi utilizada no preparo das soluções.

### 2.2 OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR HPLC

A metodologia de análise foi desenvolvida em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Agilent 1100 Series), equipado com o software Agilent Chemstation LC Systems, empregando uma coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), injetor manual com alça de amostragem de 20  $\mu$ L e detector fotométrico UV-Vis de múltiplos comprimentos de ondas (MWD).

A identificação dos carboidratos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção obtidos pela injeção de soluções padrões individuais de cada um dos carboidratos derivatizados, com os sinais obtidos para injeção das soluções padrões mistura e das amostras em diferentes comprimentos de onda.

No processo de desenvolvimento da metodologia, alguns parâmetros cromatográficos foram avaliados, como tempo de retenção (tr), simetria (As), resolução (Rs), seletividade e tempo de análise. É recomendado que o valor do fator de simetria esteja compreendido entre 0,90 e 1,30 e a resolução ideal seja superior a 2, evitando-se valores abaixo de 1 para picos de difícil separação [48].

As soluções padrões dos carboidratos utilizadas nos estudos da otimização da análise por HPLC foram preparadas com água deionizada e sua derivatização com PABA foi feita conforme descrita na literatura [42].

### 2.2.1 Estudo da composição da fase móvel

Os estudos foram baseados nos trabalhos descritos na literatura [40, 42, 44, 49 - 52]. Os testes iniciais envolveram a otimização da separação da glicose (Gli), arabinose (Ara) e xilose (Xil) empregando uma fase móvel (FM) composta por um ou mais solventes orgânicos (solvente B) e por uma solução aquosa de ácido ou tampão (solvente A). De acordo com os estudos relatados por MEYER e colaboradores [42], a separação dos derivados dos carboidratos obtidos com PABA apresentaram menores valores de tempo de retenção em baixos valores de pH. Desta forma optamos em trabalhar na faixa de pH entre 2,00 e 4,00. Nesta faixa de pH foram testados diferentes solventes orgânicos (metanol, ACN, tetraidrofurano) e soluções de ácido fosfórico com diferentes valores de pH dentro da faixa pré-estabelecida.

#### 2.2.1.1 Estudo da proporção do solvente na composição da fase móvel

Utilizou-se um gradiente exploratório para cada condição estudada (solvente B/solvente A), eluindo-se uma mistura padrão dos carboidratos na concentração de  $0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$  para glicose e xilose e  $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$  para arabinose. As condições combinações de solventes empregadas como fase móvel neste estudo foram: a) ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15; b) tetraidrofurano (THF)/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 e c) Metanol/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15.

Na eluição por fase reversa, o gradiente exploratório consiste na variação linear da proporção do solvente orgânico (B) em um determinado período de tempo. Inicialmente partiu-se de um pequena proporção do solvente B, 1%, até atingir 99% em 60 min, atingindo-se a inversão das proporções iniciais no final da injeção.

A partir da melhor condição de separação observada em cada gradiente, foram testadas condições isocráticas alterando a proporção do solvente orgânico até encontrar-se uma melhor separação dos compostos, principalmente dos picos de arabinose e xilose, que eram de difícil separação.

A TABELA 2.1 apresenta as condições de fase móvel testadas no estudo da proporção de fase móvel.

**TABELA 2.1:** Condições de eluição e solventes testados no estudo da proporção do solvente.

Eluição	Solvente B/solvente A	Proporção inicial (%)	Proporção final (%)	Tempo de análise (min)
Gradiente Exploratório - 1	Metanol/Sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,15	1:99	99:1	60
Gradiente Exploratório - 2	Tetraidrofurano/Sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,15	1:99	99:1	60
Gradiente Exploratório - 3	Acetonitrila/ Sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,15	1:99	99:1	60

### 2.2.1.2 Estudo do pH da fase móvel

Como foi citado no item 2.2.1, a separação dos derivados dos carboidratos obtidos com PABA apresentaram menores valores de tempo de retenção em pH mais baixos, entre 2,00 e 4,00. Assim para verificar a influência do pH na separação dos derivados dos carboidratos com PABA foram realizadas análises para uma mistura de soluções padrão dos carboidratos na concentração de 0,10 mmol.L<sup>-1</sup>, utilizando a FM composta da mistura ACN/sol. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na proporção de (1:99). A solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> foi preparada variando o pH entre 2,15; 3,10 e 4,15. Para condição de pH testada foi analisada três réplicas autênticas da solução padrão mistura dos carboidratos.

### 2.2.1.3 Estudo do comprimento de onda

O estudo do comprimento de onda foi realizado analisando no HPLC, três réplicas autênticas de uma mistura dos padrões de carboidratos derivatizados com PABA, utilizando o procedimento de derivatização como descrito na literatura [42], na concentração 0,32 mmol.L<sup>-1</sup> para glicose e xilose e 0,10 mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose.

A partir de trabalhos publicados na literatura, verificou que o comprimento de onda de maior absorção para os compostos analisados estaria entre 300 e 310 nm [42, 53]. Assim as soluções padrões dos carboidratos foram analisadas no HPLC com o detector de múltiplos comprimentos de onda, variando os canais de 5 em 5 nm para cada análise. A faixa de comprimentos de onda avaliada neste estudo foi de 265 a 345 nm.

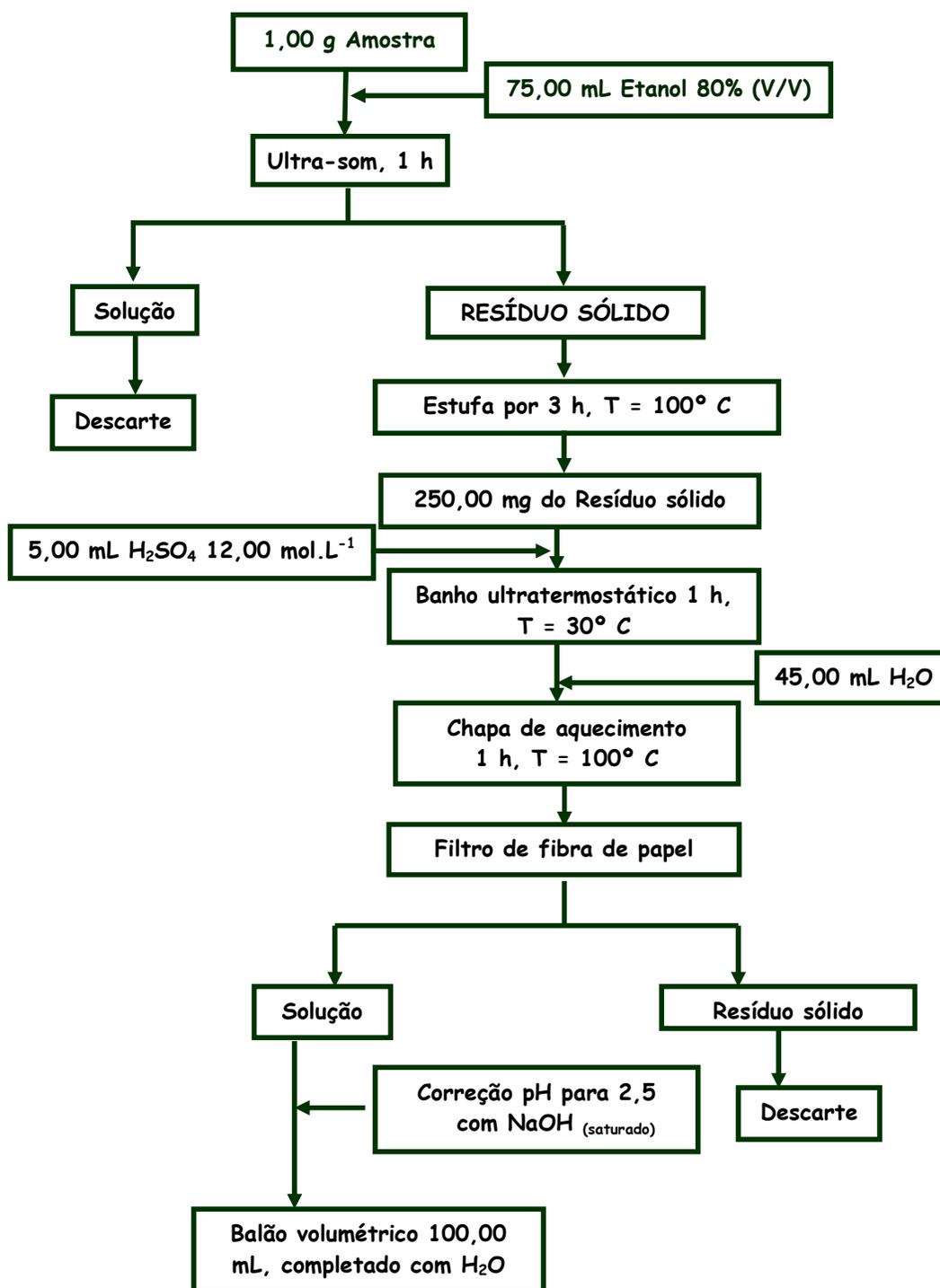
## 2.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DA AMOSTRA

### 2.3.1 Estudo da extração da amostra

Neste trabalho, propomos otimização da metodologia para extração dos carboidratos estruturais adaptada a partir dos trabalhos anteriormente citados.

O procedimento adaptado para a extração dos carboidratos estruturais em amostras de forrageiras tropicais, consiste inicialmente na extração de 1,00 g de amostra em 75 mL de etanol 80% (v/v) em banho ultrassônico, por um período de uma hora. A solução obtida, composta de carboidratos não estruturais, pigmentos e ácidos orgânicos foi removida. Posteriormente o resíduo sólido foi seco em estufa a 100° C, durante três horas. Uma massa de 250,00 mg da amostra seca foi pesada e adicionada 5,00 mL de ácido sulfúrico 12,00 mol.L<sup>-1</sup> e levada ao banho ultratermostático na temperatura de 30° C, durante uma hora. Após esse tempo, a solução foi diluída até obter a concentração de 1,20 mol.L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico, sendo em seguida colocada em chapa de aquecimento por uma hora, na temperatura de 100° C. Nesta etapa tem-se então a hidrólise dos polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, liberando os carboidratos estruturais. A solução final foi filtrada e o resíduo sólido foi descartado. O pH da solução foi ajustado para 2,5, para evitar danos a coluna cromatográfica. Finalmente, o volume da solução foi aferido para 100,00 mL em balão volumétrico.

O esquema de representação da extração das amostras proposto está representado na FIGURA 2.1.



**FIGURA 2.1:** Esquema de representação do procedimento de extração empregado para carboidratos estruturais em amostras de forrageiras.

### 2.3.1.1 Estudo comparativo entre extração com autoclave e chapa de aquecimento

Visando uma forma alternativa e de menor custo para a extração, foi realizado um estudo comparativo na etapa de extração dos carboidratos usando autoclave e chapa de aquecimento, a fim de observar se era possível a substituição da autoclave pela chapa de aquecimento, obtendo-se resultados semelhantes ou mais eficientes, além de serem reprodutíveis.

Para o estudo foi realizada a extração de duas réplicas autênticas de 250 mg da amostra *Cynodon dactylon*, utilizando a autoclave a 120° C por uma hora e também a extração de outras duas réplicas autênticas utilizando a chapa de aquecimento em uma temperatura de 100°C por uma hora, o procedimento de extração utilizado foi o mesmo descrito no item anterior. Os carboidratos presentes nas amostras foram derivatizados com PABA utilizando o procedimento descrito na literatura [42]. Desta maneira foram obtidas três réplicas autênticas das amostras para cada extração utilizando a chapa de aquecimento e autoclave. As amostras derivatizadas foram analisadas no HPLC e as concentrações obtidas pelos dois métodos de extração foram comparadas.

### 2.3.2 Estudo da derivatização dos carboidratos

A detecção dos compostos foi obtida através da derivatização pré-coluna com detecção na região do UV. A fim de se obter uma maior sensibilidade do método, foi realizado o estudo dos parâmetros do processo de derivatização pré-coluna dos carboidratos. Desta forma dois agentes derivatizantes foram avaliados: 2,4-DNPhi e PABA. As condições de reação para o processo de derivatização dos analitos utilizando cada um dos agentes derivatizantes foram então estudadas [42, 43].

### 2.3.2.1 Derivatização com 2,4-DNPhi

Os parâmetros utilizados foram adaptados de procedimentos descritos na literatura para derivatização de aldeídos [47]. Inicialmente foi utilizada uma solução de 2,4-DNPhi na concentração final de 2,00 mmol.L<sup>-1</sup> diluída em uma mistura de 20% (V/V) de ACN, 1% (V/V) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e 79% (V/V) de água deionizada. Após aferir o volume final da solução, a mistura foi levada por uma hora em ultra-som para promover a solubilização do reagente.

Os parâmetros avaliados no nosso estudo para a adaptação do processo de derivatização pré-coluna foram a porcentagem do solvente orgânico empregado no preparo da solução estoque de 2,4-DNPhi e a concentração da solução de 2,4-DNPhi. Para otimização destes parâmetros foi usado inicialmente solução padrão mistura dos três carboidratos com a concentração de 10,0 mmol.L<sup>-1</sup>, sendo todas as análises realizadas após a otimização das condições de separação no HPLC, para os carboidratos derivatizados com 2,4-DNPhi.

O processo de derivatização nas amostras foi realizado transferindo uma alíquota de 5,00 mL da solução da amostra, extraída como descrita no item 2.3.1, em um balão volumétrico de 10 mL e completando o volume com solução de 2,4-DNPhi. O balão volumétrico foi levado ao banho ultra-sônico durante 20 minutos e posteriormente a solução foi filtrada e analisada no HPLC. Para a derivatização da solução padrão mistura dos carboidratos, 500 µL da solução padrão foi transferido para um balão volumétrico de 5,00 mL e completado o volume com a solução de 2,4-DNPhi. O balão volumétrico também foi levado ao banho ultra-sônico durante 20 minutos e posteriormente a solução foi filtrada e analisada no HPLC.

a) Estudo da proporção de solvente orgânico na solução de 2,4-DNPhi

No preparo da solução observou-se uma baixa solubilidade de 2,4-DNPhi quando diluída em mistura de água:ACN (80:20 V/V). A baixa solubilidade de 2,4-DNPhi poderia causar problemas de entupimento na coluna cromatográfica devido a precipitação de material, após a injeção das amostras no HPLC, ocasionando aumento de pressão. Assim foram preparadas oito soluções de 2,4-DNPhi com concentração final de 2,00 mmol.L<sup>-1</sup> variando-se a proporção de ACN de 20% a 90% (V/V) no volume final da solução. O tempo de ultra-som para todas as soluções foi de uma hora.

b) Estudo da concentração da solução de 2,4-DNPhi

Para este estudo, foram preparadas seis soluções de 2,4-DNPhi com concentrações variando de 0,20 a 1,70 mmol.L<sup>-1</sup>, nas mesmas condições citadas no item 2.3.2.1. A composição de ACN empregada no preparo das soluções foi a que apresentou o melhor resultado no estudo anterior. O processo de derivatização para cada uma das soluções de 2,4-DNPhi com as diferentes concentrações foi realizado como descrito no item 2.3.2.1.

### 2.3.2.2 Derivatização com PABA

Os parâmetros para a derivatização com o PABA foram otimizados a partir de procedimentos previamente descritos na literatura [42]. Para tanto estudou-se a concentração do agente derivatizante (PABA), tempo de reação, temperatura de reação e período de estocagem da solução derivatizada. Todas as análises foram realizadas nas condições otimizadas para o HPLC.

a) Estudo concentração do PABA

No estudo da concentração do agente derivatizante (PABA), cada solução foi preparada diluindo o PABA em uma solução DMSO/ácido acético glacial na proporção 70:30 (V/V). Foram preparadas soluções variando a concentração em 0,02; 0,05; 0,07; 0,10; 0,20; 0,35 e 0,50 mol.L<sup>-1</sup>. A derivatização dos carboidratos com cada um dos sete níveis de concentração PABA, foi procedida durante 15 minutos em um banho ultratermostático na temperatura de 95°C. Para a realização da derivatização, transferiu-se uma alíquota 600,00 µL de cada solução estoque dos padrões dos carboidratos (10,00 mmol.L<sup>-1</sup>) para sete recipientes distintos. Em cada recipiente foi adicionado 1,50 mL de uma das soluções de PABA e 30 mg de cianoborohidreto de sódio, que é o catalisador desta reação. Posteriormente a solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL e o volume completado com solução aquosa de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,15, filtrada em filtro milipore 0,45 µm e armazenada sob refrigeração a 4°C. No total foram analisadas três réplicas autênticas para cada um dos sete níveis de concentração estudados.

b) Estudo do tempo de reação

No estudo do tempo de reação no processo de derivatização, foram preparadas nove soluções de PABA como descrito no item anterior. A concentração de PABA utilizada no preparo das soluções foi a otimizada no item 2.3.2.2 A. O processo de derivatização das soluções estoque dos carboidratos também foi o mesmo descrito no item 2.3.2.2 A. O tempo de derivatização no banho ultratermostático para cada uma das nove soluções preparadas foi diferente, variando de 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 minutos no banho. A temperatura do banho foi mantida em 95°C. Também foram analisadas três réplicas autênticas para cada um dos nove diferentes tempos de derivatização no banho.

c) Estudo da temperatura de reação

Para estudo da temperatura de reação no processo de derivatização, foram preparadas sete soluções de PABA como descrito no item A. A concentração das sete soluções, assim como o tempo de reação no banho ultratermostático, foram as otimizadas nos estudos anteriores. O processo de derivatização das soluções estoque dos carboidratos também foi o mesmo descrito no item anterior. A temperatura de derivatização no banho ultratermostático para cada uma das sete soluções preparadas foi diferente, variando de 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80° e 95° C. Foram analisadas três réplicas autênticas para cada um das sete diferentes temperaturas de derivatização no banho.

d) Estudo da estabilidade das amostras derivatizadas

A fim de verificar a estabilidade da amostra derivatizada armazenada por um longo período de tempo, realizou-se a extração de 250 mg da amostra *Cynodon dactylon*, cv *Coast-cross*, sendo que três réplicas distintas da amostra extraída foram derivatizadas com PABA com as melhores condições do processo de derivatização encontradas nos três estudos anteriores. Posteriormente as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4° C. As análises das amostras no HPLC foram realizadas em 2, 10, 15, 23, 58 dias após sua derivatização e através da comparação dos valores de concentração obtidos para os carboidratos nas injeções destas amostras, foi verificando a estabilidade das soluções ao longo do tempo.

## 2.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO

A avaliação do método otimizado foi feita através da análise de alguns parâmetros, dentre eles: seletividade; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; repetitividade, reprodutibilidade e exatidão do método. Os estudos foram todos realizados com análise em réplica. A quantificação das amostras foi realizada através do método da padronização externa.

### 2.4.1 Padronização externa

O método otimizado foi avaliado através da análise de alguns parâmetros, dentre eles: resposta linear, limite de detecção; limite de quantificação; repetitividade; seletividade e exatidão (recuperação) do método. Todos estes estudos foram realizados com três repetições e branco da análise.

#### 2.4.1.1 Estudo da resposta linear do método

Considera-se um método com resposta linear, que fornece dados diretamente proporcionais a concentração do analito estudado, dentro de uma faixa de concentração [55].

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado somente como uma evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão [55]. Desta forma, a linearidade do método foi verificada também através dos gráficos de análise de resíduos e do fator de resposta [48, 55]. Foram preparadas soluções padrões trabalho da mistura dos três carboidratos nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,30 mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose e 0,16; 0,32; 0,48; 0,64 e 0,80 mmol.L<sup>-1</sup> para glicose e xilose, diluídas em água deionizada, a partir da solução padrão intermediária 10 mmol.L<sup>-1</sup> de cada carboidrato que também foi preparada em água deionizada. O processo de derivatização dos carboidratos das soluções das curvas analíticas, como do branco da curva, foi o mesmo descrito no item 2.3.2.2 A da derivatização com PABA, nas melhores condições encontradas neste estudo. Porém

no branco da curva não houve a adição de solução padrão dos carboidratos, apenas os outros reagentes foram adicionados. Três réplicas autênticas para cada nível de concentração e para o branco foram analisadas.

#### 2.4.1.2 Curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas para cada analito. Para construção da curva analítica foram utilizados os níveis de concentração dentro da faixa de linearidade do método e da faixa estimada para os níveis de concentração das amostras 0,16; 0,32; 0,48; 0,64 e 0,80 mmol.L<sup>-1</sup> para glicose e xilose e 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,30 mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose além do branco, sendo também analisadas três réplicas autênticas para cada nível de concentração e branco da curva.

O processo de preparo das soluções padrões e derivatização, para cada nível de concentração das curvas analíticas, bem como para o branco, foi o mesmo descrito no item anterior.

#### 2.4.1.3 Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade

O limite de detecção do método (LD) representa a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser distinguida de zero confiavelmente. Alguns métodos descritos na literatura para estabelecer o LD e limite de quantificação (LQ) são baseados na análise de réplicas, com baixas concentrações, de solução padrão, amostra, amostra fortificada ou com base na regressão da curva analítica. Dentre os métodos citados o mais recomendado para a validação do método, indica que o LD seja calculado como 3 vezes o desvio padrão da análise de pelo menos seis amostras com baixa concentração dos analitos [56].

O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental [55]. O seu valor pode ser determinado como 10 vezes o desvio padrão da análise de pelo menos seis amostras com baixa concentração dos analitos.

Já a repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para as análises [55].

Para se determinar a repetitividade e os limites de detecção e quantificação do método, foi estimado o limite de detecção do cromatógrafo líquido analisando a relação sinal ruído de um cromatograma obtido para uma amostra, *Cynodon dactylon*, cv *Coast-cross* (folha e caule), extraída como descrito na FIGURA 2.1. Após esta estimativa, extraiu sete réplicas autênticas de uma amostra com uma massa menor de amostra (25,0 mg). A solução final obtida desta amostra continha uma concentração de glicose, arabinose e xilose correspondente a um sinal a aproximadamente 10 vezes o limite de detecção estimado com a relação sinal/ruído no HPLC. O processo de derivatização dos carboidratos nas amostras foi realizado como descrito no item 2.3.2.2 A da derivatização com PABA, nas melhores condições encontradas neste estudo.

#### 2.4.1.4 Seletividade do método

Para a análise da seletividade do método, foram extraídas três réplicas autênticas da amostra *Cynodon dactylon*, (250,0 mg) conforme o procedimento descrito no item 2.3.1. Os carboidratos estruturais foram derivatizados conforme o procedimento descrito no item 2.3.2.2 A do processo de derivatização com PABA, nas condições otimizadas.

No processo de extração dos carboidratos, na primeira etapa, onde se utiliza etanol 80% (V/V), retira-se os carboidratos não estruturais da forragem, garantindo-se que apenas os estruturais serão analisados [40]. A seletividade é a capacidade de um método de quantificar precisamente um analito na presença de interferentes [56]. Desta forma optou-se por quantificar glicose, arabinose e xilose nos comprimentos de onda de 285 e 325 nm e comparar os resultados com os obtidos no comprimento de onda de 305 nm, que foi o escolhido para a quantificação dos carboidratos nas amostras. Não havendo diferenças significativas entre as concentrações encontradas nos diferentes comprimentos de onda, podemos garantir que os picos obtidos são exclusivamente dos compostos de interesse.

#### 2.4.1.5 Estudo de recuperação das amostras fortificadas

A avaliação da exatidão do método foi realizada através da recuperação no processo de extração da amostra *Cynodon dactylon*, amostra *Cynodon dactylon* fortificada, branco e do branco fortificados com uma mistura padrão dos carboidratos.

Desta forma, foi realizada a extração da amostra conforme o procedimento descrito no item 2.3.1, posteriormente a mesma fortificada com os três carboidratos em três níveis de concentração: 0,32; 0,48; 0,64 mmol.L<sup>-1</sup> para glicose e xilose; 0,10; 0,15; 0,20 mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose. Os carboidratos estruturais foram derivatizados conforme o procedimento descrito no item A do processo de derivatização com PABA, nas condições ótimas. Cada nível de concentração foi analisado três réplicas autênticas.

Foi avaliada também a recuperação do branco da análise, onde o processo de extração descrito no item 2.3.1 foi executado sem a adição da amostra, apenas os outros substratos. Em sequência o branco foi fortificado com os três carboidratos na concentração de 0,48 mmol.L<sup>-1</sup> para glicose e xilose; 0,15 mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose, sendo realizado a derivatização conforme o procedimento descrito no item 2.3.2.2 A do processo de derivatização com PABA, nas condições ótimas em cinco réplicas autênticas.

## 2.5 AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS

As amostras de forrageiras foram semeadas no campo de experimental de Coronel Pacheco, da Embrapa gado de leite, distrito de Juiz de Fora – MG, no período de seca, compreendido nos meses de março e abril, dos anos de 2005, 2008 e 2009. As amostras foram colhidas manualmente a cada 25 dias, com o auxílio de cutelo. A partir da coleta as amostras foram secas em estufas de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas, moídas em moinho tipo faca de 1,0 mm e armazenadas em frascos de vidro para posterior análise. As espécies analisadas foram semeadas em três ou quatro repetições da mesma espécie. Cada repetição foi semeada em diferentes regiões do solo, porém as condições de plantio foi a

mesma para todas as repetições, como adubação e irrigação, podendo haver apenas a variação na composição do solo onde cada repetição foi cultivada.

### 2.5.1 Classificação das amostras

No total foram analisadas 34 amostras de forrageiras de três espécies: *Panicum maximum* cv. Tanzânia, *Panicum maximum* cv. Massai, *Pennisetum purpureum* cv. Pioneiro, *Pennisetum purpureum* cv. Anão, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*. As amostras foram classificadas e separadas em função do gênero, cultivar, fração (caule e folha), repetição (R1, R2, R3 e R4), (TABELA 2.1).

Para avaliação do método foi utilizada a amostra controle empregada no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Leite, *Cynodon dactylon*, cv *Coast-cross* (folha e caule), porque não é comercializado amostra de referência ou material de referência para a análise de carboidratos em forrageiras.

**TABELA 2.2:** Classificação das amostras de forrageira analisadas.

<b>Amostra</b>	<b>Fração</b>	<b>repetição</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	folha	R1	PFM R1
		R2	PFM R2
		R3	PFM R3
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	folha	R1	PF R1
		R2	PF R2
		R3	PF R3
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Pioneiro	folha	R1	CEPF R1
		R2	CEPF R2
		R3	CEPF R3
		R4	CEPF R4
	caule	R1	CEPC R1
		R2	CEPC R2
		R3	CEPC R3
		R4	CEPC R4
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Anão	folha	R1	CEAF R1
		R2	CEAF R2
		R3	CEAF R3
		R4	CEAF R4
	caule	R1	CEAC R1
		R2	CEAC R2
		R3	CEAC R3
		R4	CEAC R4
<i>Brachiaria brizantha</i>	folha	R1	BBF R1
		R2	BBF R2
		R3	BBF R3
	caule	R1	BBC R1
		R2	BBC R2
		R3	BBC R3
<i>Brachiaria Decumbens</i>	folha	R1	BDF R1
		R2	BDF R2
		R3	BDF R3
	caule	R1	BDC R1
		R2	BDC R2
		R3	BDC R3

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E PROPORÇÃO DOS SOLVENTES

Usando a melhor condição de separação de cada solvente observada no gradiente exploratório, foram realizadas eluições isocráticas, variando a proporção de cada solvente orgânico até conseguir uma melhor separação, com um menor tempo de análise, principalmente para os picos de arabinose e xilose. Por serem isômeros espaciais, a separação destes compostos foi mais difícil.

Na condição estudada, onde a fase móvel era composta de THF/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15, os picos de arabinose e xilose coeluíram em todas as proporções analisadas. Já na fase móvel com mistura Metanol/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 foi alcançada a separação dos três carboidratos na proporção (1:99), com um tempo de análise de 40 minutos.

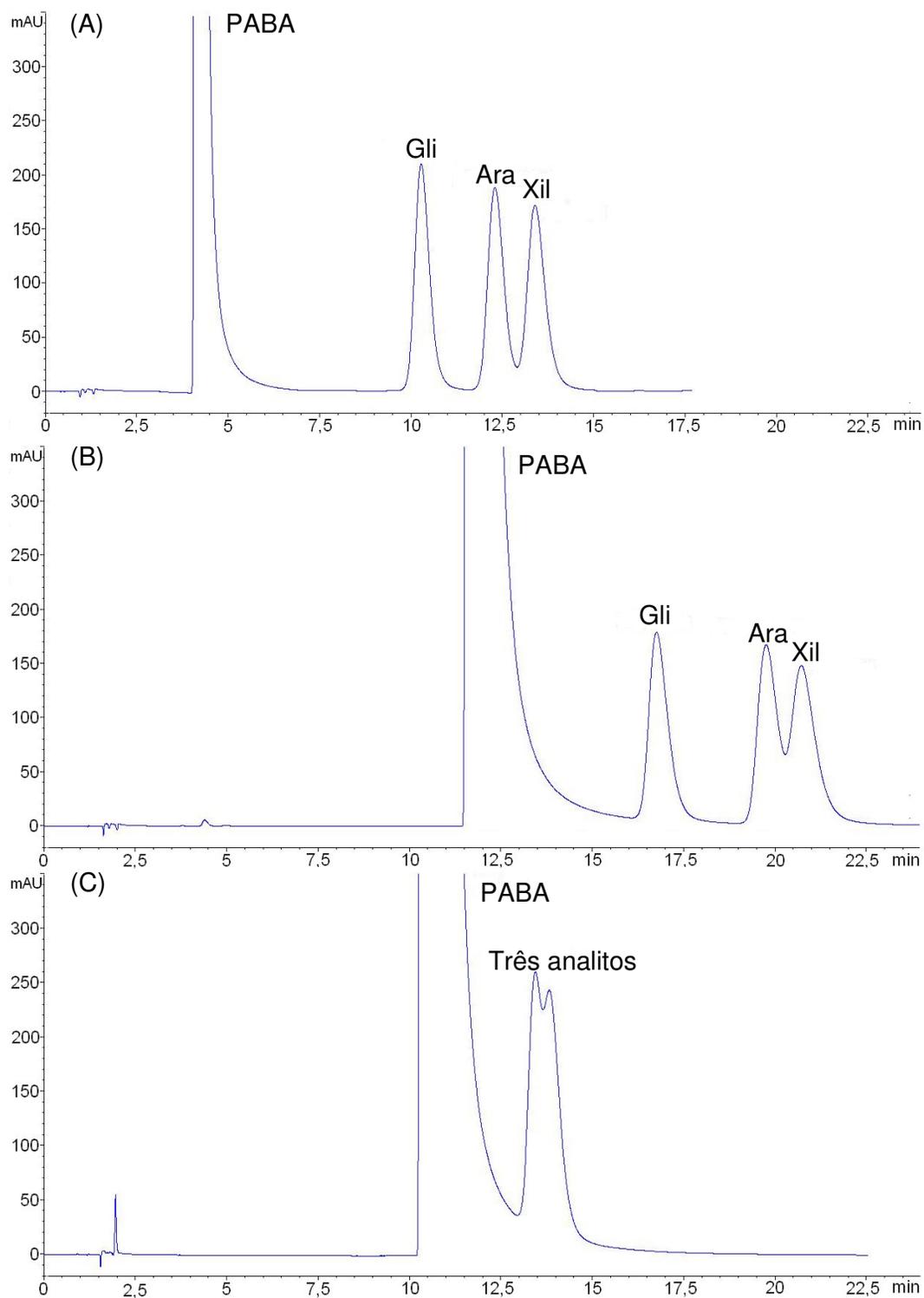
Posteriormente foi testada a FM com mistura ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15, na qual se conseguiu a melhor separação dos três carboidratos também com a proporção (1:99), com uma boa simetria (0,96 para Glicose; 0,91 para arabinose e 0,93 para xilose) e com uma resolução aceitável ( $R_s=1,52$ ) entre os picos de arabinose e xilose que são de difícil separação, sendo que nesta condição o tempo de análise foi de 15 minutos. O valor de  $R_s$  ideal e desejado em uma análise cromatográfica é acima de 2, devendo-se evitar valores abaixo de 1 para picos de difícil separação [48]. No entanto, valores de resolução superiores a 1,25 são suficientes para a quantificação [57].

A FM composta da mistura ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 na proporção (1:99 v/v) foi então escolhida para a análise dos carboidratos, porque apresentou bons parâmetros cromatográficos. Além de um menor tempo de análise (15 min), quando comparada com os resultados obtidos para a FM composta por Metanol/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (1:99 v/v) na qual obteve-se um tempo de análise de 40 minutos.

### 3.1.1 Estudo do pH da fase móvel

A fim de se definir qual o melhor pH para análise dos carboidratos, foi realizado o estudo do pH da fase móvel, utilizando soluções de ácido fosfórico, com pH: 2,15; 3,10 e 4,15; verificando em qual condição de pH seria obtida a melhor separação para os picos de arabinose e xilose em um menor tempo de análise.

Conforme pode ser observado na FIGURA 3.1, na solução de  $H_3PO_4$  no pH 4,15 (FIGURA 3.1 - C), os picos dos três carboidratos apresentaram uma grande sobreposição em torno de 14 min. No pH 3,10 (FIGURA 3.1 - B) houve uma separação para a glicose, porém os picos referentes a arabinose e xilose ainda apresentaram uma baixa resolução, além do tempo de análise de 25 minutos. Já no pH 2,15 (FIGURA 3.1 - A) da solução de  $H_3PO_4$  conseguiu-se a separação dos três compostos com um tempo total de análise de 15 minutos, sendo então esta condição escolhida para análise. Como os resultados de separação foram satisfatórios com a solução de  $H_3PO_4$  não foi necessário realizar os testes com a solução tampão fosfato.

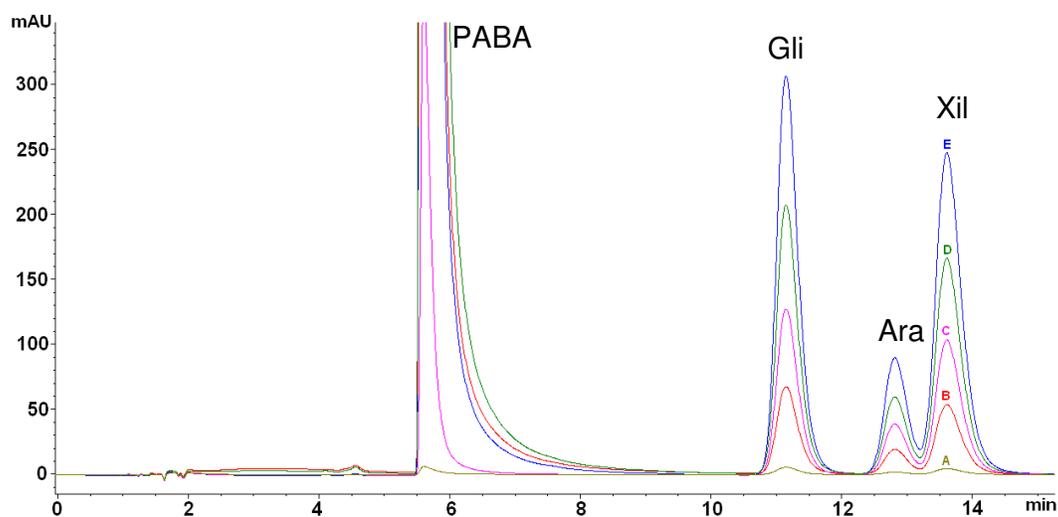


**FIGURA 3.1:** Cromatogramas obtidos para uma mistura de soluções padrão de Gli, Xil e Ara ( $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) por eluição isocrática com ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH = 2,15 (A), pH = 3,10 (B) e pH = 4,15 (C); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção: 300 nm.

### 3.1.2 Estudo do comprimento de onda

No estudo do comprimento de onda, a faixa de comprimento estudada variou de 265 a 345 nm.

A FIGURA 3.2 apresenta os cromatogramas de alguns comprimentos de onda estudados, no qual pode-se observar um ganho na sensibilidade do método para a análise de glicose, arabinose e xilose no comprimento de onda de 305 nm, neste valor todos os analitos apresentaram um maior sinal. Em todos os comprimentos de ondas analisados, também foi observada a ausência de picos estranhos, ou seja, picos além dos analitos, mostrando assim uma seletividade nos processos de extração e derivatização pré-coluna com PABA.



**FIGURA 3.2:** Cromatogramas da mistura padrão dos três carboidratos, na concentração de  $0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$  para glicose e xilose e  $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$  para arabinose. FM: ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (1:99); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção : (A) 345, (B) 265, (C) 325, (D) 285 e (E) 305 nm.

### 3.1.3 Condição otimizada para análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência

A condição final otimizada para a análise simultânea por HPLC de glicose, xilose e arabinose com derivatização pré-coluna com PABA para detecção no UV está descrita na TABELA 3.1:

**TABELA 3.1:** Condição otimizada para análise de carboidratos estruturais por HPLC.

Condição estabelecida	
<b>Coluna</b>	Fase reversa, C18 ZORBAX ODS (150,0 x 4,6 mm, 5 µm)
<b>Coluna de guarda</b>	ZORBAX ODS (12,5 x 4,6 mm, 5 µm)
<b>Fase móvel</b>	ACN/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,15 (1:99)
<b>Fluxo da fase móvel</b>	1,5 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Tempo total da análise</b>	15 minutos
<b>Deteção</b>	Comprimento de onda de 305 nm

Os parâmetros cromatográficos obtidos nas condições otimizadas e a respectiva ordem de eluição obtida para análise em HPLC com detecção no UV dos três analitos, após derivatização pré-coluna com PABA, estão dispostos na TABELA 3.2.

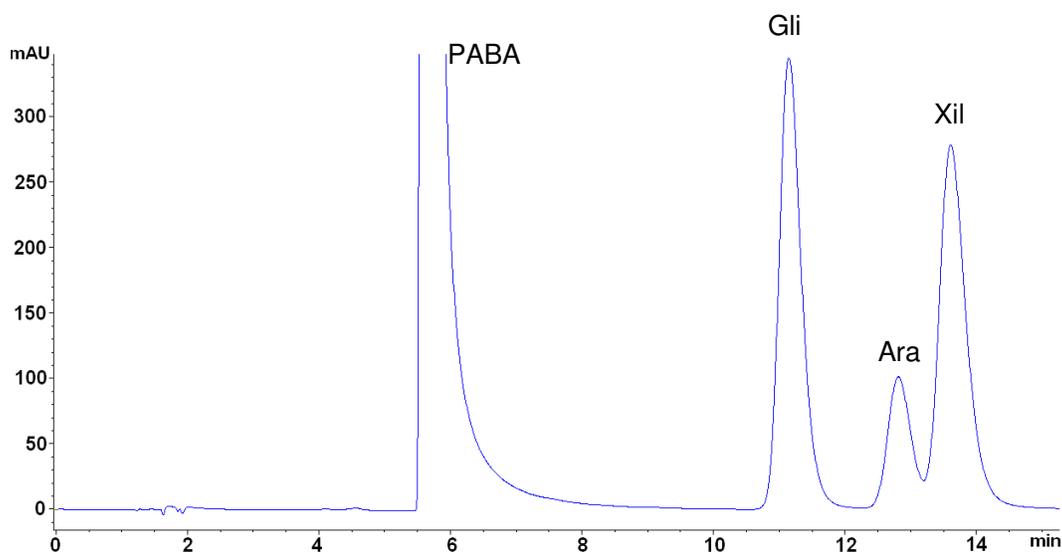
**TABELA 3.2:** Parâmetros de separação obtidos para análise da mistura padrão de glicose e xilose 0,32 mmol.L<sup>-1</sup> e arabinose 0,10 mmol.L<sup>-1</sup> por HPLC com detecção no UV com derivatização pré-coluna com PABA, eluição isocrática, condição otimizada.

ANALITO	Tempo de retenção (min)	Resolução	Simetria	tr <sub>r</sub>
PABA	5,46	-	-	-
Glicose	11,32	12,68	0,96	2,07
Arabinose	12,99	2,61	0,91	2,37
Xilose	13,83	1,52	0,93	2,53

Tempo de retenção relativo (tr<sub>r</sub>) = tr<sub>analito</sub> / tr<sub>PABA</sub>

A condição otimizada de separação utilizando detecção na região do UV, apresentou resultados satisfatórios dos parâmetros cromatográficos (TABELA 3.2), com um tempo de análise de 15 minutos. Este tempo de análise foi menor do que a metodologia padrão recomendada pelo departamento de energia dos Estados Unidos da América [44], para análise de carboidratos estruturais em plantas que é de 35 minutos com detecção por índice de refração. Brito e colaboradores [40] utilizou esta metodologia em seu trabalho para analisar os três carboidratos em amostras forragens na fração total dos carboidratos estruturais presentes na planta (celulose, hemicelulose e pectina).

A FIGURA 3.3 mostra um cromatograma de uma mistura dos padrões de carboidratos na concentração de  $0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$  para glicose e xilose e  $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$  para arabinose nas condições otimizadas de separação.



**FIGURA 3.3:** Cromatograma das condições otimizadas para separação da mistura padrão dos três carboidratos após derivatização pré-coluna com PABA na concentração de  $0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$  para glicose e xilose e  $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$  para arabinose. FM: ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (1:99); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção: 305 nm.

A vantagem deste método sobre os demais trabalhos citados no item 1.5, é que foi possível otimizar a separação dos compostos estudados utilizando um eluição isocrática com detecção UV, em menor tempo de análise. Isso porque os demais autores trabalharam com eluição isocrática com detecção por índice de refração, com um tempo de análise de 35 minutos [40, 43, 44], ou eluição por gradiente com detecção por fluorescência e tempo de análise de 30 minutos [45].

## 3.2 EXTRAÇÃO DA AMOSTRA

### 3.2.1 Estudo comparativo da extração usando autoclave e chapa de aquecimento

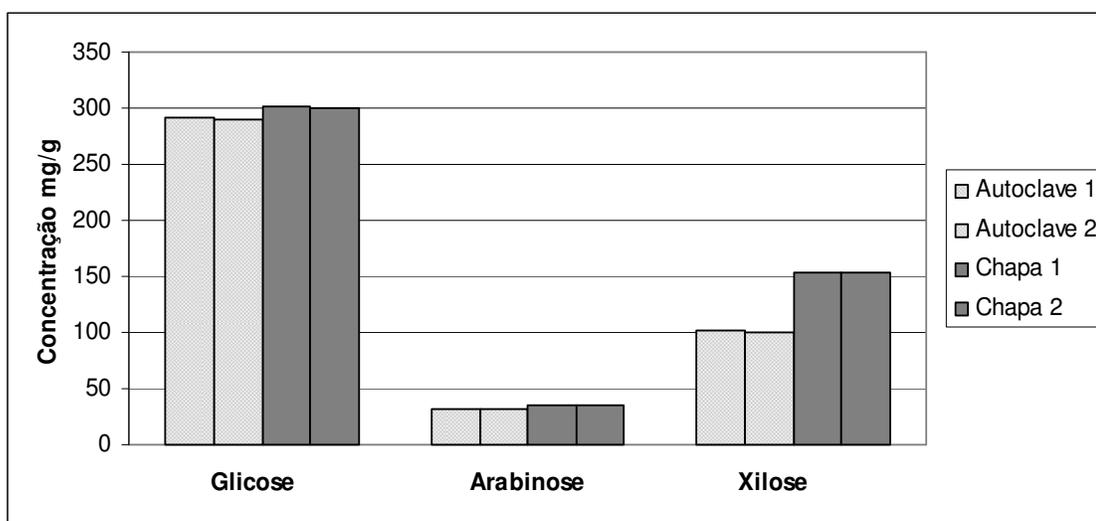
Os resultados obtidos nos estudo comparativo da extração usando autoclave que é o método padrão, com a extração utilizando chapa de aquecimento que foi o método proposto no presente trabalho, estão descritos na TABELA 3.3.

Como podemos observar na TABELA 3.3 e FIGURA 3.4, a extração por chapa de aquecimento foi mais eficiente para todos os carboidratos, sendo que para xilose a extração por chapa de aquecimento foi significativamente melhor do que por autoclave. Além do desvio padrão relativo para extração por chapa que variou de 0,3 a 2,1% ser menor do que para autoclave que variou de 0,7 a 4,9 %. Assim podemos concluir que a extração por chapa de aquecimento pode substituir satisfatoriamente a extração por autoclave, sendo de uma forma geral, mais reprodutível para todos os analitos e ainda mais eficiente para xilose. Outro fato importante é que a chapa de aquecimento oferece menor custo e menor tempo de análise, pois a utilização da autoclave requer um tempo pré-utilização e pós-utilização muito grande.

**TABELA 3.3:** Concentrações médias (desvio padrão relativo percentual) de Glicose, Arabinose e Xilose na amostra *Cynodon dactylon*, em  $\text{mg.g}^{-1}$  matéria seca de planta tratada por autoclave e chapa de aquecimento.

Analito	Concentração em $\text{mg.g}^{-1}$ matéria seca			
	Autoclave 120° C		Chapa de aquecimento 100° C	
	Extração 1	Extração 2	Extração 1	Extração 2
Glicose	291,32 (1,4%)	290,22 (1,6%)	301,16 (0,4%)	300,29 (1,3%)
Arabinose	31,67 (0,7%)	31,41 (2,3%)	35,24 (2,1%)	35,20 (0,8%)
Xilose	102,16 (1,0%)	99,22 (4,9%)	153,21 (0,3%)	153,09 (0,9%)

Desvio padrão relativo (DPR) =  $(\text{desvio padrão} / \text{concentração}_{\text{média}}) \times 100$



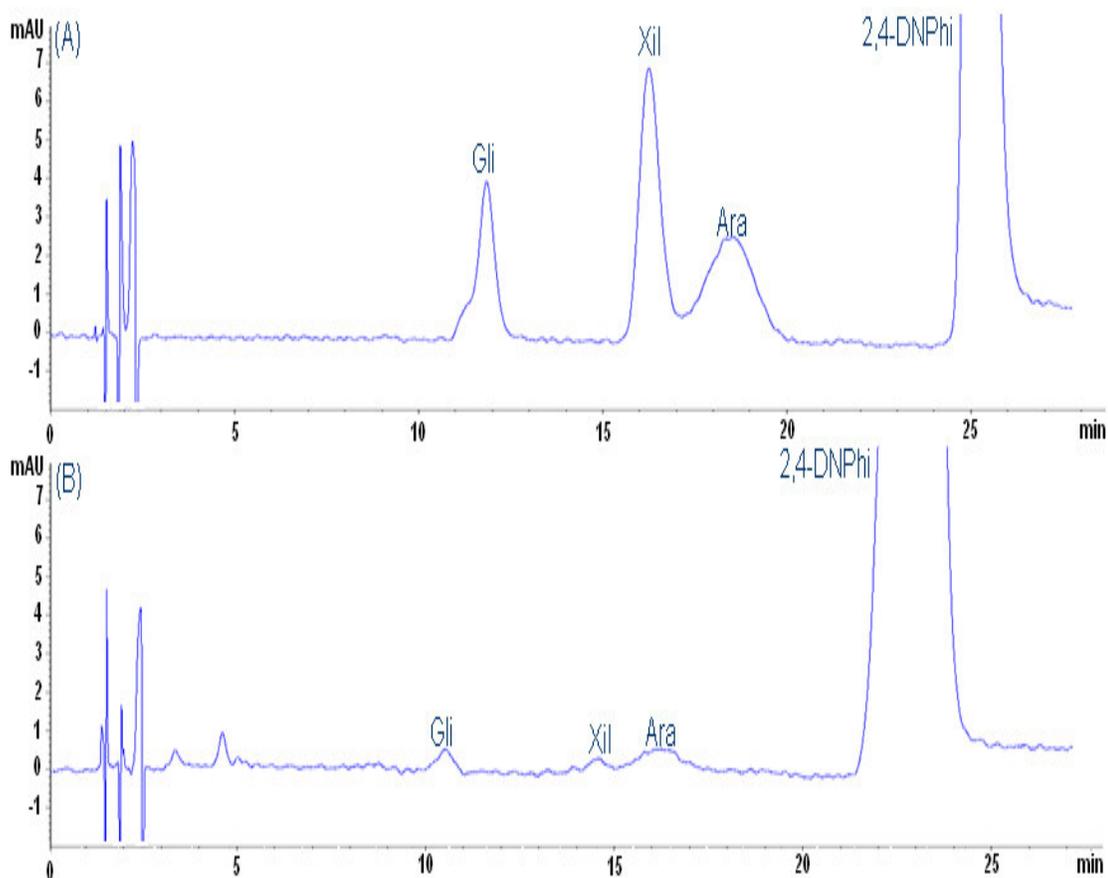
**FIGURA 3.4:** Gráfico das médias das concentrações de glicose, arabinose e xilose obtidas para amostra *Cynodon dactylon*, em  $\text{mg.g}^{-1}$  matéria seca de planta tratadas com autoclave e chapa de aquecimento.

### 3.2.2 Estudo da derivatização dos carboidratos

#### 3.2.2.1 Derivatização dos carboidratos com 2,4-DNPhi

Inicialmente verificou-se era possível a derivatização dos carboidratos com a 2,4-DNPhi, adaptando o procedimento descrito na literatura como descrito no item 2.3.2.1 [47]. Foram realizadas derivatizações, nas condições adaptadas, das soluções padrões mistura e individuais dos três carboidratos na concentração de 10,00 mmol.L<sup>-1</sup> e da amostra *Cynodon dactylon*.

A FIGURA 3.5 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise da mistura padrão dos três analitos e amostra *Cynodon dactylon*, previamente derivatizados com 2,4-DNPhi.



**FIGURA 3.5:** Cromatogramas: (A) mistura padrão dos três carboidratos derivatizados com 2,4-DNPhi, na concentração de  $10,00 \text{ mmol.L}^{-1}$  (B) Amostra *Cynodon dactylon*, derivatizada com 2,4-DNPhi. FM: ACN/THF/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (7,5:10:82,5); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção: 335 nm.

A concentração dos carboidratos de  $10,00 \text{ mmol.L}^{-1}$  analisada na mistura padrão, em relação a uma amostra de forrageira, é um valor superestimado, ou seja, representa uma concentração bem acima dos valores reportados na literatura e que supostamente seriam encontrados para as amostras de forrageiras, analisadas sob estas condições. Como pode ser observado no cromatograma (A) da FIGURA 3.5, a derivatização com 2,4-DNPhi não foi eficiente para a solução dos padrões, pois o sinal encontrado foi muito baixo para os analitos (sinal  $< 10 \text{ mAU}$ ).

O cromatograma (B) da FIGURA 3.5, apresenta a derivatização feita na amostra *Cynodon dactylon*, com 2,4-DNPhi, mostrando que o sinal dos carboidratos na amostra também foi muito baixo (sinal  $< 1 \text{ mAU}$ ).

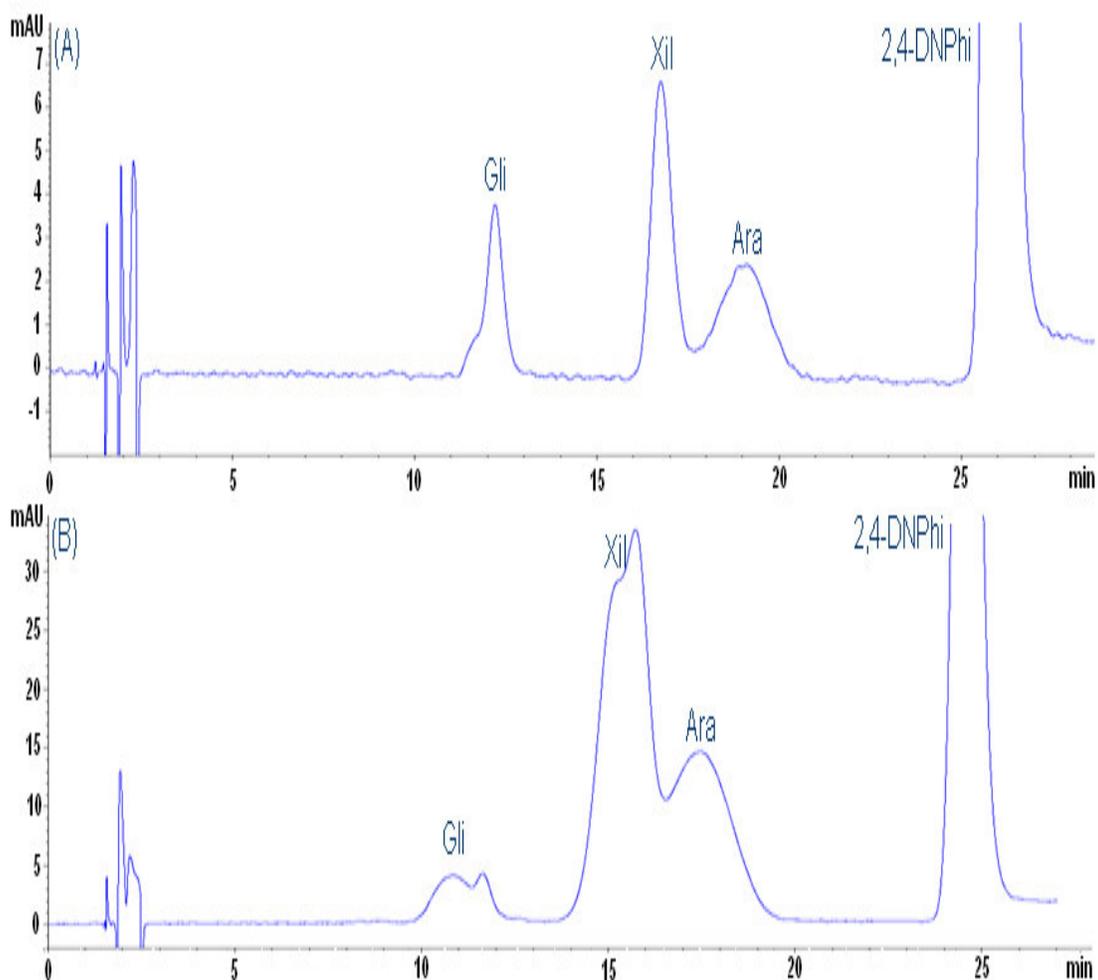
Foi observada a formação de um precipitado na solução 2,4-DNPhi depois dela ser filtrada, e também após o processo de derivatização dos carboidratos. Então foi necessário a realização de um estudo para definir composição do solvente utilizado no preparo da solução de 2,4-DNPhi e o estudo da concentração da solução de 2,4-DNPhi. Buscou-se a melhor condição necessária para promover a solubilização completa do reagente e a derivatização, evitando, no entanto, a formação de precipitados, principalmente dentro do sistema cromatográfico.

A baixa sensibilidade do processo de derivatização foi então atribuída, em parte, a esta baixa solubilidade da 2,4-DNPhi. Desta maneira foram realizados alguns estudos dos parâmetros de derivatização pré-coluna para verificar a possibilidade de aumentar a solubilidade da 2,4-DNPhi e assim aumentar o rendimento da derivatização e conseqüentemente aumentar a sensibilidade para quantificar glicose, arabinose e xilose nas amostras de forrageira através deste processo. O tempo total para eluição dos analitos derivatizados com 2,4-DNPhi foi de aproximadamente 25 minutos no HPLC.

a) Estudo da proporção de solvente orgânico na solução de 2,4-DNPhi

Nesta etapa foram analisados duas réplicas autênticas da solução de 2,4-DNPhi na concentração de  $2,00 \text{ mmol.L}^{-1}$  em diferentes proporções de ACN (20 a 90%). As soluções que apresentaram a solubilização completa, sem a precipitação de material após a filtração, foram as soluções com 80 e 90 % (V/V) de ACN. Assim optou-se pela utilização da mistura água/ACN de (20:80 V/V) para o preparo das soluções de 2,4-DNPhi, pois os resultados obtidos para as soluções preparadas com a proporção de ACN acima deste valor foram similares.

A FIGURA 3.6 apresenta os cromatogramas das soluções padrões dos carboidratos derivatizados com 2,4-DNPhi, com ACN nas proporções de 20% e 80% em água.

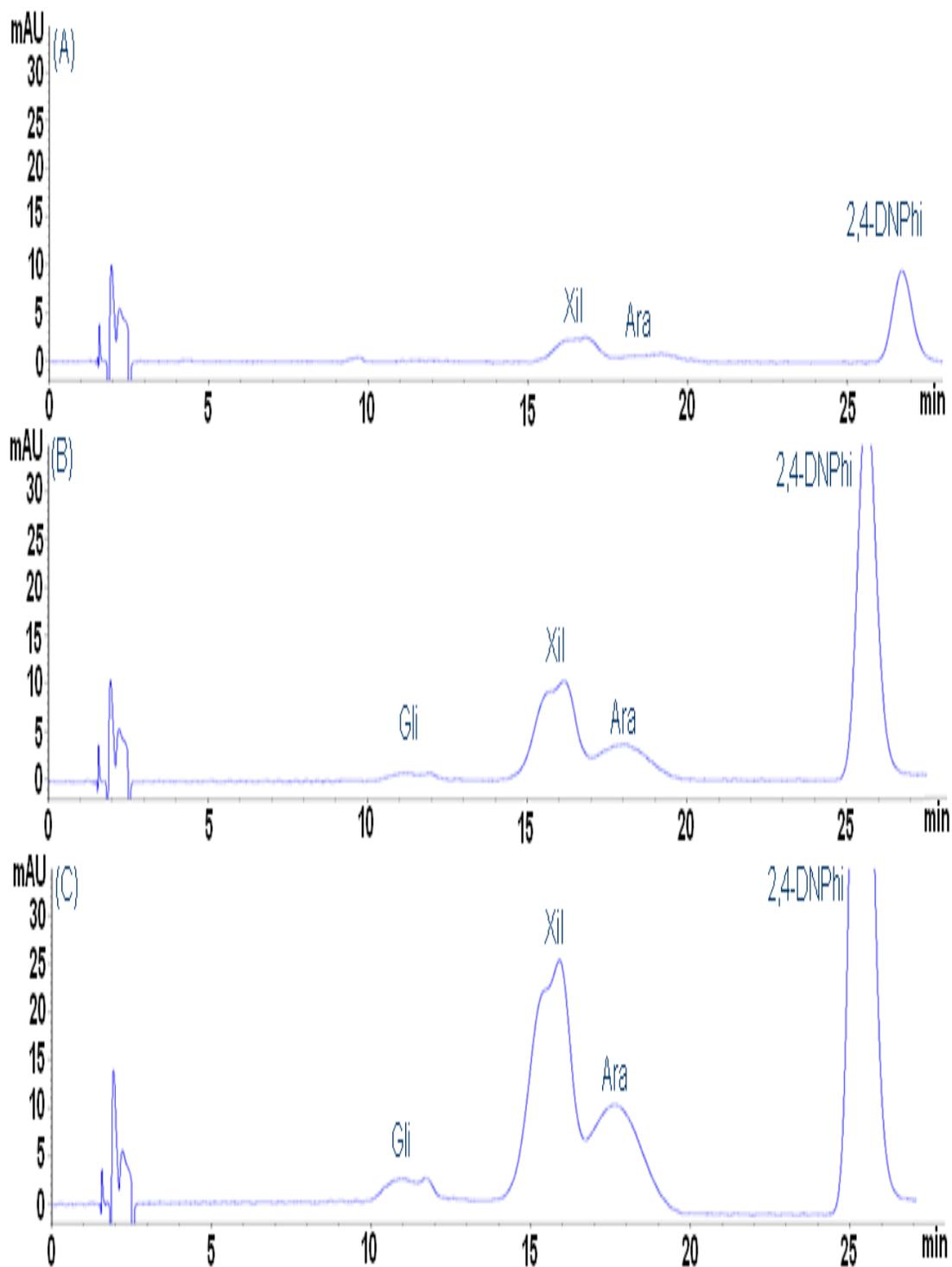


**FIGURA 3.6:** Cromatogramas da mistura padrão dos três carboidratos na concentração  $10,00 \text{ mmol.L}^{-1}$  derivatizados com solução 2,4-DNPhi, na concentração de  $2,00 \text{ mmol.L}^{-1}$  em água/ACN nas proporções (A) (80:20 V/V), (B) (20:80 V/V). FM: ACN/THF/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (7,5:10:82,5); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção: 335 nm.

Como pode ser observado na FIGURA 3.6, ocorreu um aumento na sensibilidade tanto para glicose, como para xilose, mas ocorreu a formação de duas espécies para glicose e xilose. Este fato pode ser atribuído ao aumento da proporção de solvente orgânico (ACN) na solução de 2,4-DNPhi, modificando assim o pH da solução e deslocando o equilíbrio de formação da espécie derivatizada, formando dois derivados para cada analito [9].

b) Estudo da concentração da solução de 2,4-DNPhi

Foram preparadas soluções de 2,4-DNPhi em concentrações que variaram de 0,20 a 1,70 mmol.L<sup>-1</sup>, diluídas em ACN a 80% (V/V) em água. A duplicidade dos picos de glicose e xilose persistiu em todos os níveis de concentrações de 2,4-DNPhi testados. Este comportamento foi observado tanto na solução padrão mistura, quanto nos padrões individuais, como pode-ser observado na FIGURA 3.7.



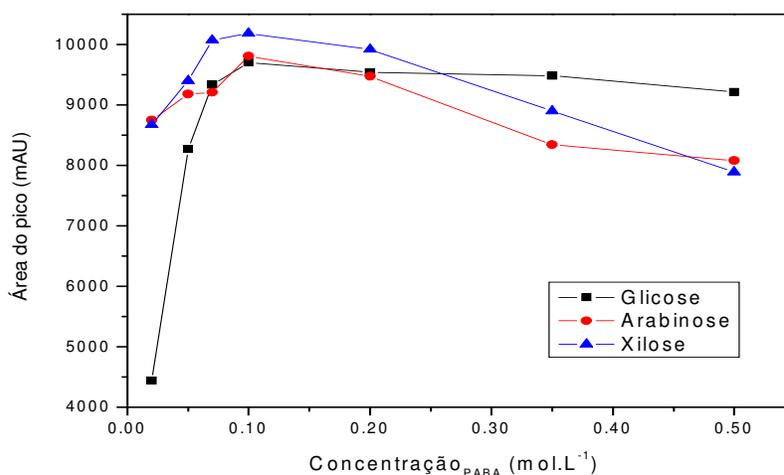
**FIGURA 3.7:** Cromatogramas da mistura padrão de glicose, arabinose e xilose na concentração 10,00 mmol.L<sup>-1</sup> derivatizados com solução 2,4-DNPhi, na concentração de (A) 0,20 mmol.L<sup>-1</sup>, (B) 0,70 mmol.L<sup>-1</sup> e (C) 1,70 mmol.L<sup>-1</sup>. FM: ACN/THF/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH=2,15 (7,5:10:82,5); fluxo: 1,5mL.min<sup>-1</sup>, detecção: 335 nm.

Até então os resultados obtidos com 2,4-DNPhi não foram satisfatórios. A sensibilidade obtida com este reagente não foi suficiente para detecção e quantificação dos carboidratos em amostras de forrageiras. Além disso, a formação de precipitados nas soluções derivatizadas poderia causar algum tipo de dano ao sistema cromatográfico, como por exemplo, cristalização e entupimentos na coluna cromatográfica, detector e demais compartimentos do HPLC.

### 3.2.2.2 Derivatização dos carboidratos com PABA

#### a) Estudo da concentração do agente derivatizante

Foram preparadas soluções de PABA variando a concentração entre 0,02 a 0,50 mol.L<sup>-1</sup>. A temperatura do banho ultratermostático foi de 95° e o tempo de reação para derivatização foi de 15 minutos. Os resultados obtidos são demonstrados na FIGURA 3.8, através do gráfico das médias das áreas obtidas para os picos dos analitos em função da concentração do PABA.

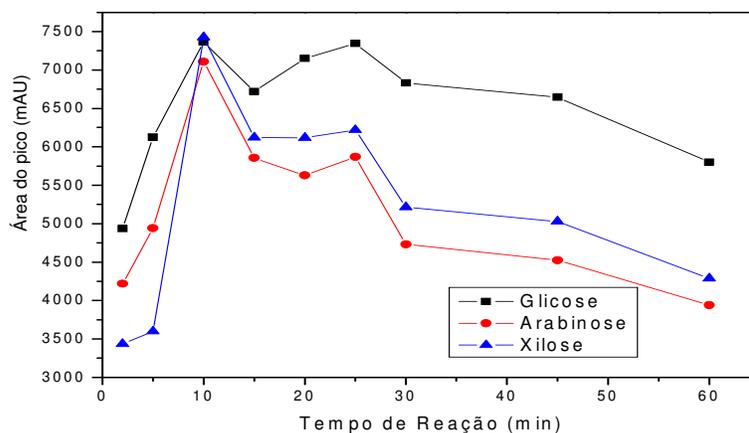


**FIGURA 3.8:** Estudo da concentração de PABA - Média dos sinais obtidos para análise das soluções padrão mistura de glicose, xilose e arabinose (0,60 mmol.L<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações de PABA, 15 min tempo de reação em banho ultratermostático a 95°C. Condições do HPLC: FM: ACN/sol. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH=2,15 (1:99); fluxo: 1,5mL.min<sup>-1</sup>; detecção: 305 nm.

É possível verificar na FIGURA 3.8 que a concentração de PABA com o maior ganho de sinal para todos os compostos estudados foi  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ . A região entre  $0,10$  e  $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$  apresentou um leve declínio no sinal obtido, tornando-se mais acentuado em valores acima de  $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$ , principalmente para xilose e arabinose. Valores de concentração abaixo de  $0,10$  também apresentaram um declínio na concentração, porém observa-se que pequenos incrementos da concentração do PABA resultaram em uma brusca variação do sinal obtido. Desta forma para garantir uma maior eficiência do processo de derivatização, adotou-se  $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$  como concentração de trabalho.

#### b) Estudo do tempo de reação

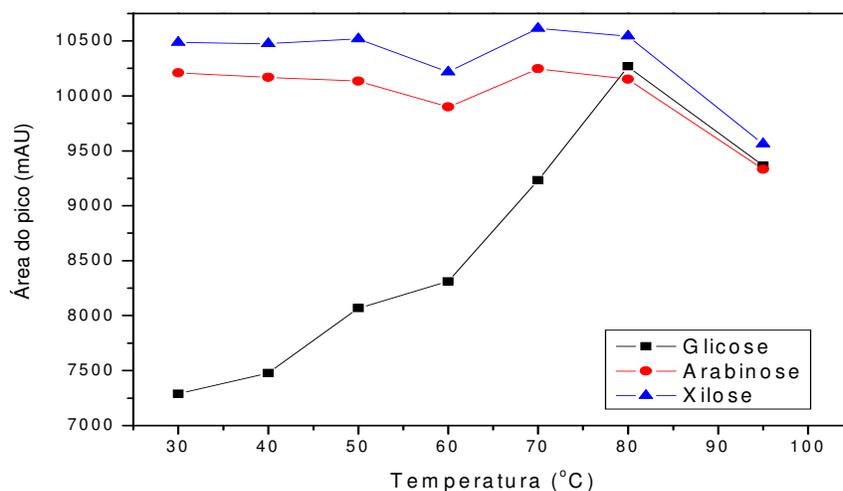
O tempo de reação no banho ultratermostático foi estudado variando de 2 a 60 minutos, a concentração de PABA ( $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi o valor obtido no estudo anterior e a temperatura de reação do banho foi  $95^\circ \text{C}$ . Os resultados obtidos neste estudo estão representados na FIGURA 3.9. Observou-se que a temperatura onde se obteve o maior sinal foi de 10 minutos, sendo esta adotada para o processo de derivatização.



**FIGURA 3.9:** Estudo do tempo de reação com PABA – Média dos sinais obtidos para análise das soluções padrão mistura de glicose, xilose e arabinose ( $0,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em diferentes tempo de reação em banho ultratermostático a  $95^\circ \text{C}$  e solução  $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$  de PABA. Condições do HPLC: FM: ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (1:99); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção: 305 nm.

## c) Estudo da temperatura de reação

A temperatura do banho ultratermostático, no processo de derivatização variou 30 a 95°C neste estudo. A concentração de PABA ( $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e tempo de reação (10 min) foram os valores obtidos nos estudos citados anteriormente. Os resultados obtidos neste estudo estão representados na FIGURA 3.10.



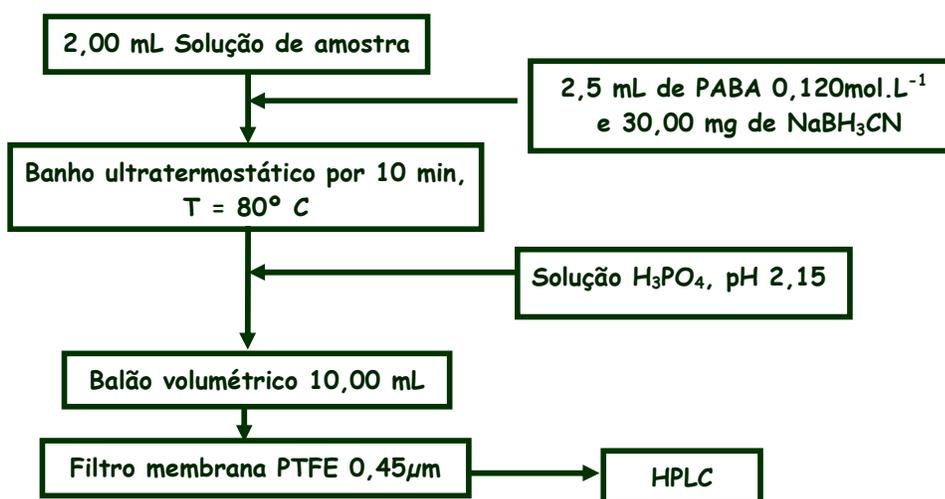
**FIGURA 3.10:** Estudo da temperatura de reação - Média dos sinais obtidos para análise das soluções padrão mistura de glicose, xilose e arabinose ( $0,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em diferentes valores de temperatura em banho ultratermostático, solução  $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$  de PABA e tempo de reação de 10 min. Condições do HPLC: FM: ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,15 (1:99); fluxo:  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; detecção: 305 nm.

Na FIGURA 3.10 pode-se observar que a glicose foi a espécie mais sensível a variação da temperatura e o maior sinal para os três carboidratos foi obtido na temperatura de 80°C, sendo este valor adotado no processo de derivatização.

Após estes estudos, os parâmetros finais otimizados para o processo de derivatização dos carboidratos estruturais estão descritos na TABELA 3.4 e a condição de derivatização pré-coluna otimizada para amostra está descrita na FIGURA 3.11.

**TABELA 3.4:** Parâmetros otimizados no estudo da derivatização das amostras de forrageira com PABA.

	Concentração PABA	Tempo de Reação	Temperatura de Reação
Parâmetros otimizados	0,12 mol.L <sup>-1</sup>	10 min	80°C



**FIGURA 3.11:** Representação do esquema otimizado para o processo de derivatização pré-coluna dos carboidratos estruturais, com PABA, extraídos das amostras de forrageiras.

d) Estudo da estabilidade das amostras derivatizadas

O valores médios de concentrações dos analitos obtidos para as análises das amostras de *Cynodon dactylon*, após o armazenamento sob refrigeração de 4°C, no período entre 2 e 58 dias estão descritos na TABELA 3.5.

**TABELA 3.5:** Médias das concentrações ( $\text{mg.g}^{-1}$  matéria seca) de glicose, xilose e arabinose obtidas para a amostra *Cynodon dactylon*, analisadas 2 a 58 dias após sua derivatização pré-coluna com PABA.

Analito	Concentração em $\text{mg.g}^{-1}$ matéria seca					Média	DPR
	2 dias	10 dias	15 dias	23 dias	58 dias		
<b>Glicose</b>	239,87	241,99	244,59	240,26	242,42	241,83	0,8%
<b>Arabinose</b>	36,11	35,24	34,13	35,06	35,93	35,30	2,2%
<b>Xilose</b>	197,74	188,16	186,18	188,81	196,37	191,45	2,7%

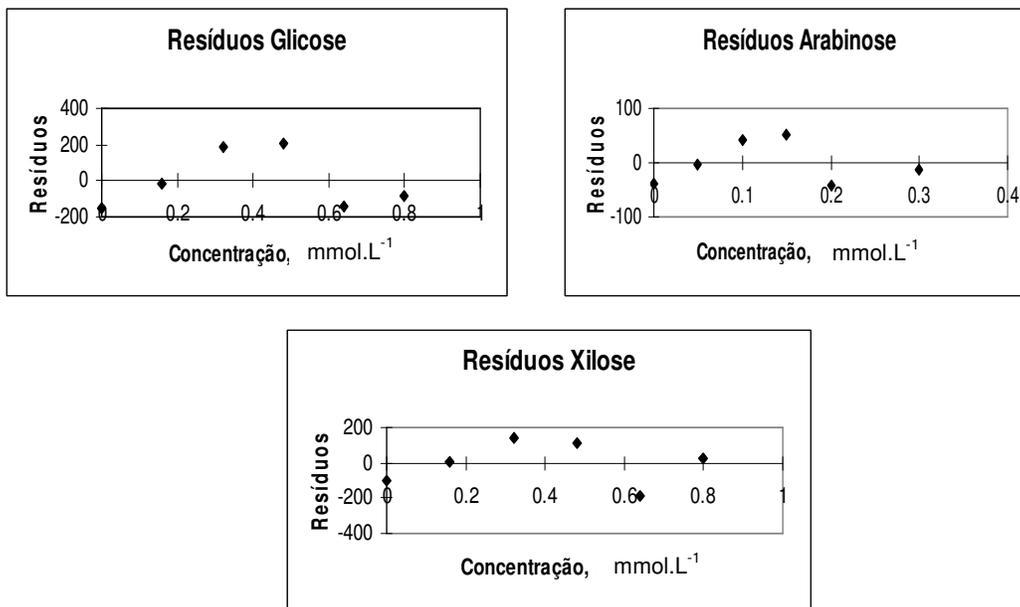
Desvio padrão relativo percentual (DPR) =  $(\text{Sd}/\text{Conc.}_{\text{média}}) \times 100$

Pode-se verificar que na faixa de tempo estudada a variação da concentração da amostra foi muito pequena. O desvio padrão relativo percentual obtido para os cinco dias de análise variou de 0,8 a 2,7%, mantendo-se em uma faixa aceitável. A solução da amostra mostrou-se então estável durante o período estudado, podendo a amostra derivatizada ser armazenada sob refrigeração por pelo menos 58 dias após sua derivatização pré-coluna com PABA, sem alteração significativa do sinal dos três carboidratos estruturais.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO EXTERNA

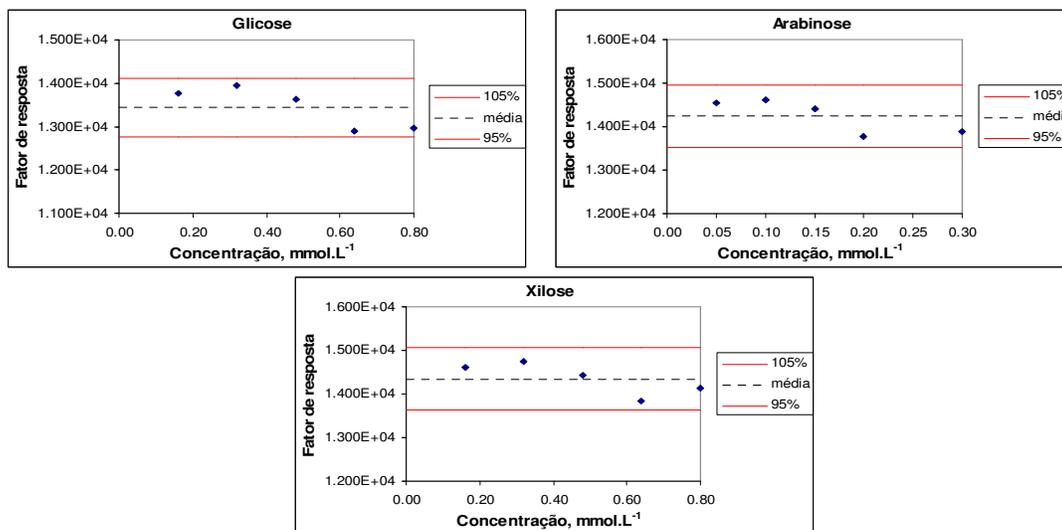
#### 3.3.1 Resposta linear do método

Uma das formas de se avaliar a linearidade do método é através da análise de resíduos, para tanto, foi obtida uma curva analítica para cada um dos três carboidratos em cinco níveis de concentração, incluindo o branco, nos seguintes intervalos: 0,05 a 0,30  $\text{mmol.L}^{-1}$  para arabinose e 0,16 a 0,80  $\text{mmol.L}^{-1}$  para glicose e xilose. O resíduo para cada ponto da curva foi então determinado fazendo a diferença entre o sinal medido e o sinal calculado através da curva analítica, e então, plotou-se os gráficos dos resíduos em função da concentração dos analitos (FIGURA 3.12). Observou-se que para todos os analitos, os pontos apresentaram uma distribuição randômica, o que indica que as curvas de calibração são lineares na faixa estudada [48].



**FIGURA 3.12:** Gráficos dos resíduos das curvas analíticas para glicose, arabinose e xilose.

Além da análise dos resíduos, a linearidade do método também foi avaliada através dos gráficos dos fatores de resposta em função da concentração. O fator de resposta foi calculado através da razão entre o sinal obtido e a concentração calculada para cada nível de concentração da curva analítica. A média dos fatores de resposta e os limites 95% e 105% de média foram calculados e representados nos gráficos. Assim a linearidade foi avaliada através dos fatores de resposta da curva que devem estar compreendidos entre 95 % e 105% [48, 55]. Como é possível observar na FIGURA 3.13, a curva analítica é considerada linear para os três carboidratos na faixa de concentração estudada, pois todos os valores de fator de resposta estão na faixa entre 95 e 105%.

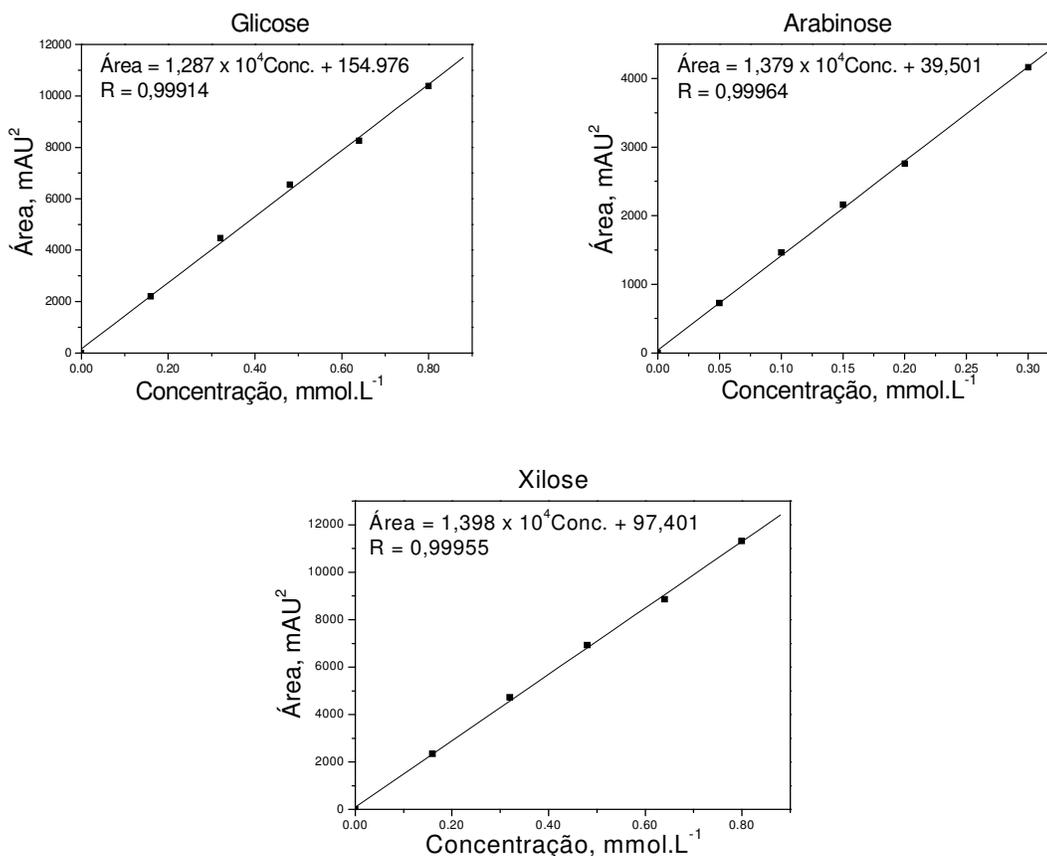


**FIGURA 3.13:** Gráficos do fator de resposta das curvas analíticas para glicose, arabinose e xilose.

### 3.3.2 Curvas analíticas

As curvas analíticas foram preparadas em três réplicas autênticas para cada um dos cinco níveis de concentração dos padrões dos carboidratos, incluindo o branco, nos seguintes intervalos de concentração: 0,05 a 0,30 mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose e 0,16 a 0,80 mmol.L<sup>-1</sup> para glicose e xilose.

Como critério de avaliação, as curvas analíticas devem apresentar coeficientes de correlação ( $r^2$ )  $\geq 0,999$ . Os coeficientes de correlação para os três analitos variaram de 0,99916 (Glicose) a 0,99964 (Arabinose). A FIGURA 3.14 mostra as curvas analíticas obtidas para glicose, xilose e arabinose conforme sua ordem de eluição no HPLC.



**FIGURA 3.14:** Curvas analíticas obtidas (n=3) para glicose, xilose e arabinose por eluição isocrática em coluna C-18, com ACN/sol. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH=2.15 (1:99), fluxo 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, detecção 305 nm.

### 3.3.3 Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade

Foi estimado o limite de detecção do cromatógrafo líquido analisando a relação sinal ruído de um cromatograma de uma amostra, encontrando os seguintes valores:  $3,05 \times 10^{-4}$  mmol.L<sup>-1</sup> para glicose,  $3,07 \times 10^{-4}$  mmol.L<sup>-1</sup> para arabinose e  $2,97 \times 10^{-4}$  mmol.L<sup>-1</sup> para xilose. Assim foram preparadas sete réplicas autênticas da amostra *Cynodon dactylon*, (25,0 mg) contendo uma concentração final de aproximadamente dez vezes maior que o limite de detecção estimado para o equipamento.

Os valores de LD e LQ do método proposto foram calculados a partir do desvio padrão obtido para a análise das sete réplicas da amostra (Equação 01 e 02), considerando um intervalo de confiança de 99%. Os valores encontrados estão

dispostos na TABELA 3.6. A FIGURA 3.15 apresenta um cromatograma da análise de uma destas amostras.

$$LD = t_{99\%} \times Sd \quad \text{Equação 01}$$

$$LQ = 10 \times Sd \quad \text{Equação 02}$$

Sendo: Sd = desvio padrão

$$t_{99\%} = 3,707 \text{ (99\% de confiabilidade e n-1 grau de liberdade)}$$

**TABELA 3.6:** Limites de detecção e quantificação do método estabelecidos através da análise (n = 7) de 25,0 mg da amostra *Cynodon dactylon*.

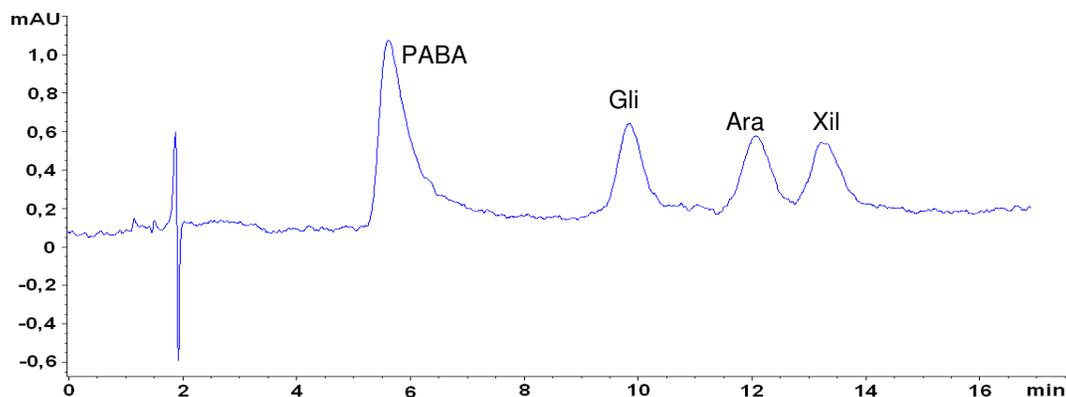
Concentração (mmol.L <sup>-1</sup> )			
Analito	LD	LQ	DPR (%)
Glicose	$3,7 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-4}$	3
Arabinose	$1,1 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$	5
Xilose	$3,2 \times 10^{-4}$	$8,6 \times 10^{-4}$	3

LD = limite de detecção do método

LQ = limite de quantificação do método

DPR = desvio padrão relativo percentual

Os resultados referentes à repetitividade foram satisfatórios considerando-se as etapas de tratamento da amostra, bem como suas características tais como o tamanho da partícula [44]. Os valores de desvio padrão relativo (n=7) encontrados para as repetições das análises da amostra de *C. dactylon* foram menores que 5%. Os valores encontrados estão em conformidade com os valores reportados na literatura que considera aceitável uma variação de até 10% para este tipo de matriz [58].



**FIGURA 3.15:** Cromatograma obtido para análise da amostra *Cynodon dactylon* (25,0 mg) para determinação do LD e LQ e avaliação da repetitividade do método. Eluição isocrática em coluna C-18, com ACN/sol. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH=2.15 (1:99), fluxo 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, detecção 305 nm.

### 3.3.4 Seletividade

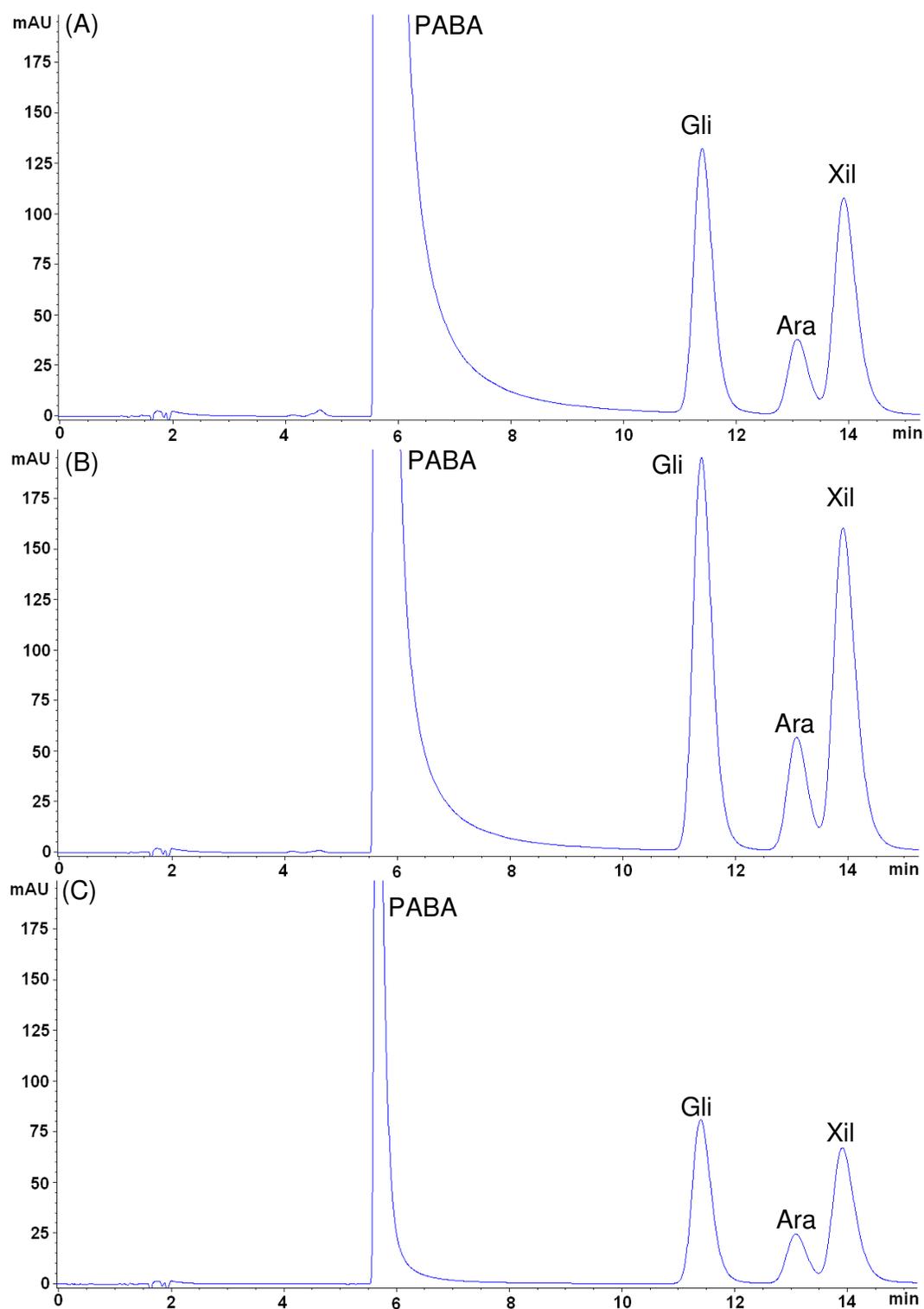
Três réplicas autênticas da amostra *Cynodon dactylon*, (250,0 mg) foram extraídas e os carboidratos, glicose, arabinose e xilose foram quantificados simultaneamente em três comprimentos de onda diferentes (285, 305 e 325 nm). Calculou-se a média das concentrações para cada comprimento de onda e para comparação dos valores de concentrações calculados nos três comprimentos de onda, aplicou-se o teste t entre as concentrações encontradas em 285 nm e 305 nm e entre 325 nm e 305 nm (TABELA 3.7).

**TABELA 3.7:** Concentrações de glicose, arabinose e xilose na amostra *Cynodon dactylon*, (250,0 mg) em diferentes comprimentos de onda.

Analito	Concentração em mg.g <sup>-1</sup> matéria seca								
	Glicose			Arabinose			Xilose		
	285nm	305nm	325nm	285nm	305nm	325nm	285nm	305nm	325nm
Comprimento de onda	285nm	305nm	325nm	285nm	305nm	325nm	285nm	305nm	325nm
Réplica 1	218,58	218,18	219,73	33,66	33,92	35,31	158,84	154,74	159,01
Réplica 2	217,51	217,87	219,72	33,54	34,09	35,44	154,97	154,13	159,18
Réplica 3	218,97	219,93	222,62	34,65	35,51	36,45	158,58	160,25	161,49
Média	218,35	218,66	220,69	33,95	34,51	35,74	157,46	156,37	159,89
DPR	0,3	0,5	0,7	1,8	2,5	1,7	1,4	2,1	0,9
t <sub>285/305</sub>	0,664	-	-	1,564	-	-	0,729	-	-
t <sub>325/305</sub>	-	-	2,818	-	-	3,490	-	-	1,983

$$\text{DPR} = (\text{Sd}/\text{Conc. média}) \times 100$$

Verificou-se que para todos os casos a 95% de confiança, o  $t_{\text{calculado}}$  foi menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  (4,303), concluindo que não há diferenças significativas entre os valores encontrados, o que mostra que os carboidratos podem ser quantificados sem interferência de outros compostos. A FIGURA 3.16 apresenta os cromatogramas da amostra nos três comprimentos de onda, onde é possível observar que não há sinal de outros compostos que possam ter sido co-extraídos ou derivatizados, mostrando interferência mínima na quantificação da glicose, arabinose e xilose nos comprimentos de onda analisados.



**FIGURA 3.16:** Cromatogramas da amostra *Cynodon dactylon*, cv *Coast-cross* nos comprimentos de onda: a) 285nm, b) 305nm, c) 325nm. FM: ACN/sol.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH=2,05 (1:99), fluxo:1,5 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.3.5 Estudo de recuperação das amostras fortificadas

As TABELAS 3.8 e 3.9 mostram os resultados obtidos no estudo da recuperação (n= 3) da amostra *Cynodon dactylon*, cv *Coast-cross* (250 mg) fortificadas em três níveis de concentração com três réplicas autênticas para cada nível e o branco fortificado com um nível de concentração sendo analisadas cinco réplicas autênticas (n=5) respectivamente.

**TABELA 3.8:** Percentual de recuperação (DPR) ao fortificar 250,0 mg da amostra *Cynodon dactylon*, com mistura padrão dos carboidratos em três níveis de concentração (glicose e xilose: 0,32; 0,48; 0,64 mmol.L<sup>-1</sup> e arabinose 0,10; 0,15; 0,20 mmol.L<sup>-1</sup>).

Analito	Níveis de	Percentual médio de recuperação, % (DPR, %)
	Fortificação, mmol.L <sup>-1</sup> (n=3)	
Gli	0,32	93 (0,7)
	0,48	94 (1)
	0,64	92 (3)
Ara	0,10	84 (1)
	0,15	83 (3)
	0,20	82 (4)
Xil	0,32	72 (0,9)
	0,48	72 (0,7)
	0,64	74 (4)

$$\text{DPR} = (\text{Sd}/\text{Conc.}_{\text{média}}) \times 100$$

**TABELA 3.9:** Percentual de recuperação (DPR) do branco fortificado com mistura padrão de glicose, xilose e arabinose em um nível de concentração.

Analito	Níveis de	Percentual médio de recuperação (%)
	Fortificação, mmol.L <sup>-1</sup>	
Gli	0,48	102 (0,9)
Ara	0,15	104 (1)
Xil	0,48	102(2)

$$\text{DPR} = (\text{Sd}/\text{Conc.}_{\text{média}}) \times 100$$

O percentual de recuperação das amostras fortificadas variou de: 92 a 94% para glicose, 82 a 84% para arabinose e 72 a 74% para xilose, com desvio padrão relativo na faixa de 0,4 a 4% para todos os compostos. A faixa de recuperação do branco fortificado foi de 102 a 104 %, sendo os valores de desvio padrão menores ou iguais a 2 %. Os resultados obtidos estão dentro da faixa aceitável que é de 70 a 120% para recuperação e um DPR de até 20%, devido à grande manipulação e o número de etapas que envolvem a extração das amostras.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, ARABINOSE E XILOSE NAS AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS

Os resultados dos estudos aplicando padronização externa foram satisfatórios, assim, utilizou-se esta técnica para a quantificação dos carboidratos nas amostras de forrageiras.

As TABELAS 3.10 (repetições R1), 3.11 (repetições R2), 3.12 (repetições R3) e 3.13 (repetições R4), apresentam as médias das concentrações nas frações de caule e folha, dos carboidratos estruturais glicose, arabinose e xilose, e seus respectivos desvios padrões relativos, obtidas por análise em duplicata das amostras de três espécies de forrageiras.

A concentração expressa em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca foi calculada em função da massa pesada das amostras para extração que foi de 250 mg. As concentrações dos carboidratos nas amostras de forrageiras analisadas apresentaram resultados acima do limite de quantificação do método e dentro da faixa linear estudada.

As repetições, R1, R2, R3, e R4, são de uma mesma amostra de forrageira, plantadas com as mesmas condições de adubação e irrigação, além de serem colhidas com a mesma idade de corte, diferenciando apenas a região do solo plantada. Cada uma das repetições foi plantada em blocos de solo diferentes, podendo haver variação na composição do solo onde cada repetição foi cultivada. Esta diferença pode influenciar as concentrações dos carboidratos presentes na mesma espécie de forragem. Este experimento tem como finalidade reproduzir as condições de produção de forrageiras em pastos.

Foram construídos gráficos com as concentrações médias (n=2) de glicose, arabinose e xilose nas quatro repetições, para as frações caule e folha, do *Pennisetum purpureum* cv. anão e pioneiro, e nas três repetições, para a fração folha, do *Panicum maximum* cv. tanzânia e massai (FIGURA 3.17) e nas três repetições, para as frações caule e folha, de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens* (FIGURA 3.18).

**TABELA 3.10:** Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g<sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R1 das amostras *Panicum maximum* cv. tanzânia, *Panicum maximum* cv. massai, *Pennisetum purpureum* cv. anão, *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*.

Amostra	Fração	Concentração (mg.g <sup>-1</sup> matéria seca)					
		Glicose	DPR	Arabinose	DPR	Xilose	DPR
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	Folha	94,64	2,1	14,77	2,7	71,78	2,4
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	Folha	84,10	0,1	20,53	0,5	120,47	0,9
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Anão	Folha	31,98	4,6	15,22	2,5	61,98	2,1
	Caule	165,66	1,0	22,45	4,7	96,67	4,8
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Pioneiro	Folha	153,97	1,0	26,23	1,2	116,05	0,6
	Caule	147,02	0,4	18,71	2,1	95,51	1,1
<i>Brachiaria brizantha</i>	Folha	101,78	4,7	14,26	4,3	64,70	4,6
	Caule	118,88	3,1	13,21	2,2	75,69	4,6
<i>Brachiaria decumbens</i>	Folha	67,25	1,9	12,28	2,9	48,13	4,0
	Caule	84,72	0,8	6,28	2,6	42,66	1,6

DPR = desvio padrão relativo percentual

**TABELA 3.11:** Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g<sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R2 das amostras *Panicum maximum* cv. tanzânia, *Panicum maximum* cv. massai, *Pennisetum purpureum* cv. anão, *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*.

Amostra	Fração	Concentração (mg.g <sup>-1</sup> matéria seca)					
		Glicose	DPR	Arabinose	DPR	Xilose	DPR
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	Folha	168,06	1,6	22,28	1,8	100,38	4,1
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	Folha	177,39	0,2	30,95	0,3	176,04	1,2
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Anão	Folha	68,46	1,7	15,78	1,3	61,86	3,6
	Caule	116,43	3,9	24,12	5,0	86,41	4,9
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Pioneiro	Folha	114,25	2,9	22,33	3,3	97,94	2,3
	Caule	138,10	2,9	16,29	3,4	88,60	1,2
<i>Brachiaria brizantha</i>	Folha	141,60	0,9	18,87	4,8	94,30	2,3
	Caule	159,46	2,1	15,34	4,0	107,20	2,7
<i>Brachiaria decumbens</i>	Folha	55,17	5,1	11,68	4,2	44,26	2,9
	Caule	79,32	3,3	8,29	4,1	45,90	3,6

DPR = desvio padrão relativo percentual

**TABELA 3.12:** Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g<sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição 3 (R3) das amostras *Panicum maximum* cv. tanzânia, *Panicum maximum* cv. massai, *Pennisetum purpureum* cv. anão, *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*.

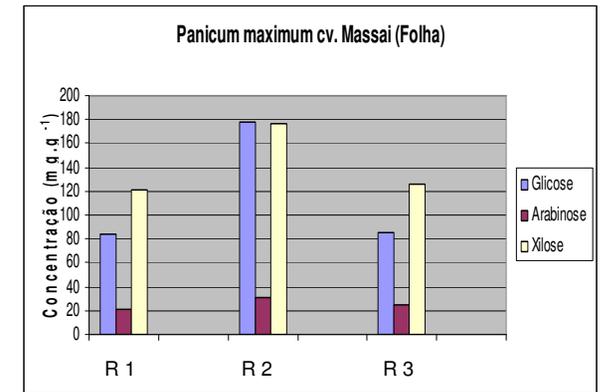
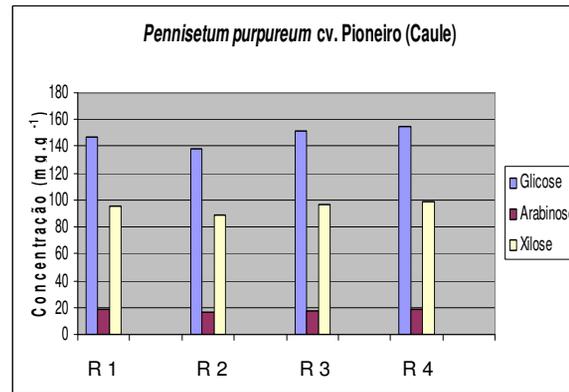
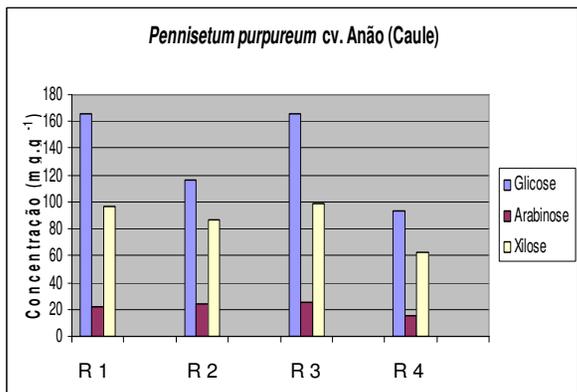
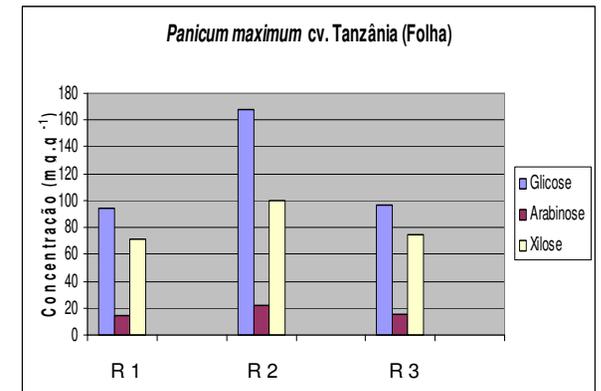
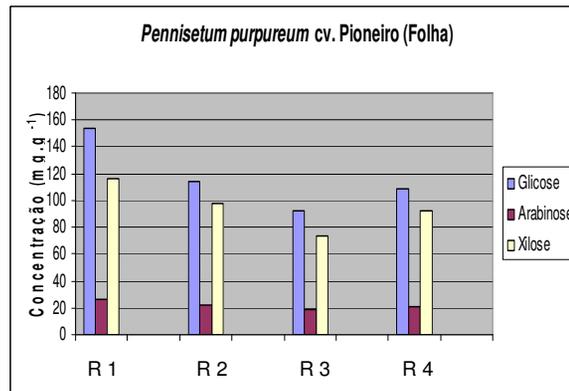
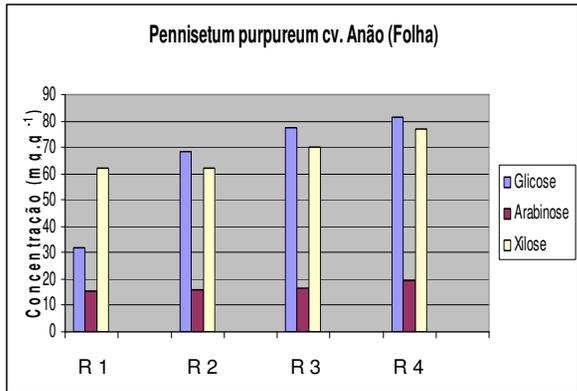
Amostra	Fração	Concentração (mg.g <sup>-1</sup> matéria seca)					
		Glicose	DPR	Arabinose	DPR	Xilose	DPR
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	Folha	96,43	4,0	15,28	0,9	74,44	1,4
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	Folha	85,73	5,2	24,35	3,2	126,48	3,6
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Anão	Folha	77,51	1,2	16,72	4,8	70,29	0,2
	Caule	166,01	4,0	25,03	0,3	98,26	4,5
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Pioneiro	Folha	92,57	4,2	18,41	4,2	73,29	0,8
	Caule	151,77	2,8	17,94	1,1	97,12	1,1
<i>Brachiaria brizantha</i>	Folha	102,37	4,9	16,87	5,1	80,78	3,8
	Caule	188,38	3,2	17,84	0,5	119,63	3,0
<i>Brachiaria decumbens</i>	Folha	78,71	5,0	15,36	0,8	64,90	2,6
	Caule	95,03	3,9	7,29	5,0	53,51	2,8

DPR = desvio padrão relativo percentual

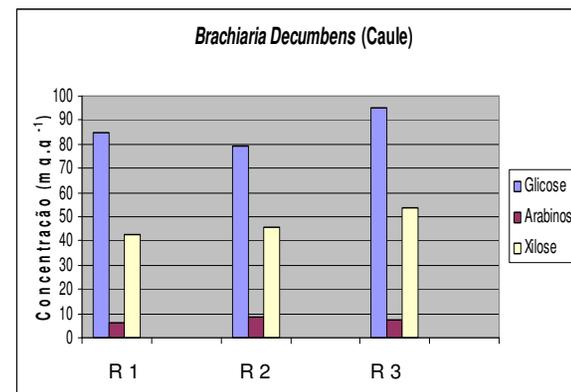
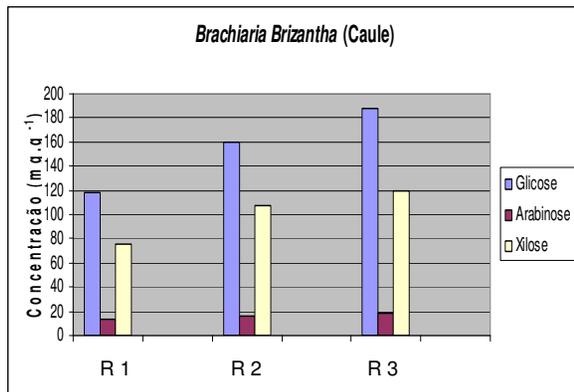
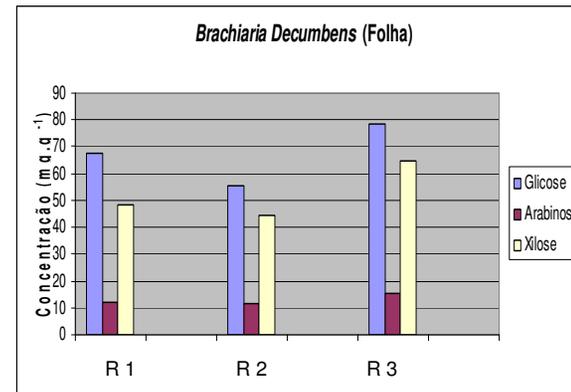
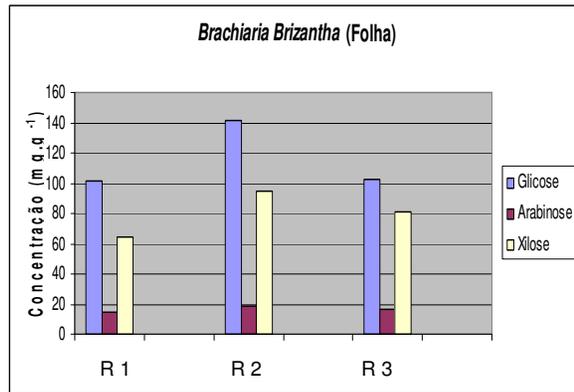
**TABELA 3.13:** Concentrações médias (n=2) e intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), expressos em mg.g<sup>-1</sup> matéria seca, de glicose, arabinose e xilose encontrados na repetição R4 das amostras *Pennisetum purpureum* cv. anão, *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro.

Amostra	Fração	Concentração (mg.g <sup>-1</sup> matéria seca)					
		Glicose	DPR	Arabinose	DPR	Xilose	DPR
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Anão	Folha	81,69	2,8	19,52	2,3	77,14	1,7
	Caule	93,14	4,2	15,16	4,1	62,90	2,4
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Pioneiro	Folha	108,55	0,1	21,40	2,7	92,63	1,1
	Caule	155,27	4,0	18,98	2,4	98,85	1,8

DPR = desvio padrão relativo percentual



**FIGURA 3.17:** Concentrações médias (n=2) de glicose, arabinose e xilose encontrados nas quatro repetições de caule e folha nas amostras de *Pennisetum purpureum* cv. anão, *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro, e nas três repetições de caule e folha nas amostras de *Panicum maximum* cv. tanzânia, *Panicum maximum* cv. massai.



**FIGURA 3.18:** Concentrações médias (n=2) de glicose, arabinose e xilose encontrados nas três repetições de caule e folha nas amostras de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*.

### 3.4.1 Análise das amostras

As amostras apresentaram concentrações expressas em  $\text{mg.g}^{-1}$  matéria seca variando de 31,98 a 188,38 para glicose; 6,28 a 30,95 para arabinose e 42,66 a 176,04 para a xilose e desvio padrão relativo variando de 0,1 a 5,2 % como pode-ser observado nas TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e 3.13. Esta variação do DPR é aceitável devido ao grande número de etapas de manipulação no tratamento das amostras e da variabilidade no tamanho de partícula.

#### 3.4.1.1 Pennisetum purpureum cv. Anão

Nas amostras de *Pennisetum purpureum* cv. anão ( $n=16$ ), comumente conhecido como capim elefante, as concentrações variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 31,98 a 81,69 para glicose, 15,22 a 19,52 para arabinose e 61,86 a 77,14 para xilose na fração folha. Na fração caule as concentrações variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 93,14 a 166,01 para glicose, 15,16 a 25,03 para arabinose e 62,90 a 98,26 para xilose (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12, 3.13 e FIGURA 3.17).

As concentrações obtidas para cada repetição foram comparadas através do teste t ( $\alpha = 0,05$ ) e verificou-se que a variação na concentração entre as repetições foi significativamente diferente, tanto para fração caule como para folha, apesar de não ter sido dado nenhum tratamento diferenciado para as repetições. Com os resultados obtidos, pode-se observar a possibilidade da sensibilidade nesta espécie de forrageira em relação a variação na composição do solo no qual cada repetição foi cultivada, variando as concentrações dos carboidratos estruturais presentes de forma significativa.

Foram realizadas as análises de correlação ( $\alpha= 0,05$ ), entre as concentrações de glicose, arabinose e xilose entre as frações caule e folha da planta, e não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os dados obtidos.

Não foi encontrada correlação significativa ( $\alpha= 0,05$ ) entre as concentrações de glicose e xilose na fração folha. Porém na fração caule foi obtida uma correlação positiva entre os dados. Esta correlação positiva corresponde uma relação diretamente proporcional dos dados.

Na análise da correlação entre as concentrações de xilose e arabinose ( $\alpha = 0,05$ ), foi encontrada uma correlação positiva dos dados nas duas frações analisadas, caule e folha.

Já na análise das correlações ( $\alpha = 0,05$ ) entre as concentrações de glicose e arabinose, nas frações caule e folha, não foram encontrados correlações dos resultados neste intervalo de confiabilidade analisado.

#### 3.4.1.2 Pennisetum purpureum cv. Pioneiro

As amostras de *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro ( $n=16$ ), apresentaram concentrações que variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 92,57 a 153,97 para glicose, 18,41 a 26,23 para arabinose e 73,29 a 116,05 para xilose na fração folha. Já na fração caule as concentrações variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 138,10 a 155,27 para glicose, 16,286 a 18,98 para arabinose e 88,60 a 98,85 para xilose (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12, 3.13 e FIGURA 3.17).

Também foi realizado o teste t ( $\alpha = 0,05$ ) entre as concentrações dos carboidratos encontradas em cada repetição, e verificou-se que a variação de concentração encontrada entre as repetições é significativamente diferente, tanto para fração caule como para folha. Assim como no cv. anão, o cv. pioneiro apresentou sensibilidade nas concentrações dos carboidratos a composição do solo onde cada repetição foi plantada.

Nos estudos de correlação realizados ( $\alpha = 0,05$ ), nas concentrações de glicose, arabinose e xilose das frações caule e folha da planta, não foi encontrado correlação significativa para o nível de confiabilidade avaliado.

A correlação ( $\alpha = 0,05$ ) entre as concentrações de glicose e xilose foi significativa e positiva para as duas frações, caule e folha, mostrando uma relação entre os dados no intervalo de confiabilidade analisado.

Na análise da correlação entre as concentrações de xilose e arabinose ( $\alpha = 0,05$ ), também foi encontrada uma correlação positiva dos dados nas duas frações analisadas, caule e folha.

Entre as concentrações de glicose e arabinose foi encontrada uma correlação positiva e significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre os valores obtidos para a fração folha.

Nenhuma correlação significativa foi encontrada para a fração caule entre as concentrações de glicose e arabinose neste nível de confiabilidade.

#### 3.4.1.3 *Brachiaria brizantha*

As amostras de *Brachiaria brizantha* (n=12), apresentaram concentrações que variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 101,78 a 141,60 para glicose, 14,26 a 18,87 para arabinose e 64,70 a 94,30 para xilose na fração folha. Já na fração caule as concentrações variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 118,88 a 188,38 para glicose, 13,20 a 17,84 para arabinose e 75,69 a 119,63 para xilose (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e FIGURA 3.18).

O teste t ( $\alpha = 0,05$ ) entre as concentrações dos carboidratos encontradas em cada repetição verificou-se que a variação de concentração encontrada entre as repetições é significativamente diferente, tanto para fração caule como para folha. Possivelmente esta espécie também apresenta sensibilidade nas concentrações dos carboidratos em função da composição do solo onde cada repetição foi plantada.

Os estudos de correlação realizados ( $\alpha = 0,05$ ), nas concentrações de glicose, arabinose e xilose entre as frações caule e folha da planta, não encontraram correlação dos dados no intervalo de confiabilidade analisado.

Foi encontrado uma correlação positiva ( $\alpha = 0,05$ ), das concentrações entre glicose e xilose na fração caule, mostrando uma relação entre os dados para o nível de confiabilidade analisado. Já para fração folha, não houve uma correlação dos dados analisados.

Na análise da correlação entre as concentrações de xilose e arabinose ( $\alpha = 0,05$ ), foi encontrada uma correlação positiva dos dados nas duas frações analisadas, caule e folha neste intervalo de confiabilidade.

Para a correlação ( $\alpha = 0,05$ ) entre as concentrações de glicose e arabinose apenas na fração caule foi observada significativa e positiva no nível de confiabilidade avaliado.

#### 3.4.1.4 *Brachiaria decumbens*

As amostras de *Brachiaria decumbens* (n=12), apresentaram concentrações que variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 55,17 a 78,70 para glicose, 11,67 a 15,36 para arabinose e 44,26 a 64,90 para xilose na fração folha. Já na fração caule as concentrações variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 79,32 a 95,03 para glicose, 6,28 a 15,16 para arabinose e 42,66 a 53,51 para xilose (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e FIGURA 3.18).

Através do teste T ( $\alpha = 0,05$ ), comparou-se as concentrações encontradas em cada repetição e verificou-se que a variação de concentração encontrada entre as repetições foi significativamente diferente, tanto para fração caule como para folha também para esta espécie de forrageira. Como na *Brachiaria brizantha*, possivelmente a *Brachiaria decumbens* as concentrações dos carboidratos são sensíveis a composição do solo onde cada repetição foi plantada.

Encontrou-se correlação significativa e positiva, com nível de confiabilidade  $\alpha = 0,05$ , nas concentrações de glicose entre as frações caule e folha da planta, para os demais carboidratos não foi verificado nenhuma correlação no nível de confiabilidade analisado.

Não foi encontrada correlação ( $\alpha = 0,05$ ) das concentrações entre glicose e xilose nas frações caule e folha, para esta espécie de forrageira.

Na análise da correlação entre as concentrações de xilose e arabinose ( $\alpha = 0,05$ ), foi encontrada uma correlação dos dados na fração folha, já para o caule não.

Não foi observado correlação ( $\alpha = 0,05$ ) significativa entre as concentrações de glicose e arabinose, nas frações caule e folha.

#### 3.4.1.5 *Panicum maximum* cv. Tanzânia

As amostras de *Panicum maximum* cv. tanzânia (n=6), apresentaram concentrações que variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 94,64 a 168,06 para glicose, 14,77 a 22,28 para arabinose e 71,78 a 100,38 para xilose para fração folha, que foi a única fração analisada para esta espécie (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e FIGURA 3.17).

O teste t ( $\alpha = 0,05$ ) entre as concentrações dos carboidratos encontradas em cada repetição verificou que a variação de concentração encontrada entre as repetições é significativamente diferente, para fração folha para esta espécie de forrageira. Verificando também nesta espécie, possivelmente, uma sensibilidade nas concentrações dos carboidratos em função da composição do solo onde cada repetição foi plantada.

Para esta espécie foi verificada uma correlação ( $\alpha = 0,05$ ) significativa e positiva entre todas as combinações de pares dos analitos: glicose e xilose, arabinose e xilose, glicose e arabinose.

#### 3.4.1.6 *Panicum maximum* cv. Massai

As amostras de *Panicum maximum* cv. massai ( $n=6$ ), apresentaram concentrações que variaram em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria seca de 84,10 a 177,40 para glicose, 20,53 a 30,95 para arabinose e 120,47 a 176,04 para xilose para fração folha, que foi a única fração analisada para esta espécie (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e FIGURA 3.17).

Também para esta espécie de forrageira, através do teste T ( $\alpha = 0,05$ ) foi possível verificar que há diferença significativa entre as concentrações dos carboidratos obtidas para cada repetição. Aparentemente, esta espécie também apresentou sensibilidade nas concentrações dos carboidratos em relação a composição do solo onde cada repetição foi plantada.

Para esta espécie foi observada correlação ( $\alpha = 0,05$ ) significativa e positiva entre as concentrações de glicose e xilose e entre as concentrações de xilose e arabinose. Entre glicose e arabinose, não foi observada correlação significativa.

### 3.4.2 Considerações

De acordo com as TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e 3.13 e os gráficos da FIGURAS 3.17 e 3.18, pode-se observar que a variação na concentração do mesmo carboidrato entre as repetições da mesma espécie de forrageira, não apresentou nenhuma tendência, sendo que cada espécie reagiu de uma forma a região do solo plantada, não podendo assim criar um padrão para esta variação de concentração.

A espécie *Brachiaria brizantha* na fração caule apresentou os maiores valores de concentração para glicose, já para xilose e arabinose, os maiores valores de concentração foram encontrados na espécie *Panicum maximum* cv. massai, na fração folha (FIGURAS 3.17 e 3.18).

A espécie *Pennisetum purpureum* cv. pioneiro apresentou as concentrações de arabinose e xilose significativamente maiores ( $\alpha = 0,05$ ) na fração folha em comparação com a fração caule. A *Brachiaria decumbens* apresentou apenas a concentração de xilose significativamente maior ( $\alpha=0,05$ ), na fração folha em comparação com a fração caule (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12 e 3.13).

### 3.4.3 Comparação com outros estudos

Conforme citado no item 1.5, apenas um trabalho foi publicado na literatura, que possui quantificação de glicose, xilose e arabinose, presente nas três frações da parede celular (celulose, hemicelulose e pectina), em amostras de forrageiras tropicais que são cultivadas no Brasil [40]. Estes autores utilizam para quantificação dos carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração. Em relação a outros países, alguns autores aplicaram várias técnicas para a quantificação destes carboidratos em amostras de forrageiras de diferentes espécies e origens.

A TABELA 3.14 compara os resultados obtidos por outros autores na quantificação de glicose, arabinose e xilose presentes em amostras de forrageira, com os resultados obtidos neste trabalho. Vale ressaltar que os outros estudos apresentam diferenças nos métodos de extração e quantificação aplicados a amostra em relação ao trabalho aqui apresentado, além da diferença entre as frações da planta avaliadas.

**TABELA 3.14:** Comparação dos níveis de concentração de glicose, arabinose e xilose, obtidos em diferentes espécies de forrageiras.

País	Referência	Técnica / Detecção	Amostras estudadas	Faixa de concentração (mg.g <sup>-1</sup> de MS) nas frações caule e folha			
				Glicose	Arabinose	Xilose	
BRASIL	Presente trabalho 2009	HPLC / UV	<i>Pennisetum purpureum</i> cv. anão	31,98 a 166,01	15,16 a 25,03	61,86 a 98,26	
			<i>Pennisetum purpureum</i> cv. pioneiro	92,57 a 155,27	16,29 a 26,23	73,28 a 116,05	
			<b><i>Brachiaria brizantha</i></b>	<b>101,78 a 188,38</b>	<b>13,21 a 18,87</b>	<b>64,70 a 119,63</b>	
			<i>Brachiaria decumbens</i>	55,17 a 95,03	6,28 a 15,36	42,66 a 64,90	
			<i>Panicum maximum</i> cv. tânzania	94,64 a 168,06	14,77 a 22,28	71,78 a 100,38	
			<i>Panicum maximum</i> cv. massai	84,10 a 177,39	20,53 a 30,95	120,47 a 176,04	
	[40]	HPLC / Índice de refração	<b><i>Brachiaria brizantha</i></b>	<b>228,85 a 392,45</b>	<b>7,75 a 24,80</b>	<b>107,75 a 150,15</b>	
			<i>Brachiaria humidicola</i>	264,35 a 460,25	16,80 a 38,75	125,05 a 204,85	
	USA	[35]	CG / Massa	<i>Cynodon spp</i> cv. Tifton 85	443,70*	63,90*	287,90*
				<i>Cynodon spp</i> cv. Coastal	436,20*	59,40*	273,30*
[41]		HPLC / Índice de refração	<i>Bromus Inermis</i> cv. Less	342,30 a 387,80	25,80 a 54,30	189,60 a 213,00	
[34]		CG / Ionização de chama	<i>Medicago sativa</i> L. (Alfalfa)	275 a 306	20 a 21	85 a 99	
			<i>Phalaris arundinacea</i> L. (Reed canarygrass)	209 a 265	28 a 30	117 a 163	
			<i>Panicum virgatum</i> L. (Switchgrass)	273 a 322	27 a 31	179 a 223	

MS = matéria seca,

\* soma da concentração dos carboidratos na planta inteira (caule + folha).

O trabalho publicado por Brito e colaboradores [40] quantificou glicose, arabinose e xilose na amostra de *Brachiaria brizantha*, mesma espécie que quantificamos neste presente trabalho, podendo haver uma comparação entre os dois estudos.

Realizando a comparação dos resultados obtidos, podemos observar que as faixas de concentração (TABELAS 3.10, 3.11, 3.12) obtidas para arabinose (13,21 a 18,87 mg.g<sup>-1</sup> de matéria seca) e xilose (64,71 a 119,63 mg.g<sup>-1</sup> de matéria seca) no presente trabalho está em conformidade com a faixa de concentração encontrada no trabalho publicado por Brito e colaboradores [40] (TABELA 3.14).

As concentrações de glicose 101,71 a 188,38 mg.g<sup>-1</sup> de MS encontrada neste presente trabalho, foram inferiores aos valores reportados por Brito e colaboradores [40] (TABELA 3.14). A diferença entre os valores de concentração pode ser atribuída as diferenças de cultivares, idade de corte da amostras, além da composição do solo onde foi cultivado a amostra de forrageira em cada trabalho, que podem influenciar diretamente na concentração dos carboidratos presente na forrageira.

As faixas de concentrações obtidas em nosso estudo, também são comparáveis aos valores reportados referentes a outros países

## 4 CONCLUSÃO

Foi desenvolvida e aplicada no presente trabalho, uma metodologia de extração, derivatização pré-coluna, com o agente derivatizante PABA, separação e quantificação por HPLC com detecção na região do UV, de glicose, arabinose e xilose.

Na extração da amostra, foi proposto um novo método de extração utilizando chapa de aquecimento ao invés de autoclave, onde a amostra foi extraída a temperatura 100°C por 1 h. O método utilizando chapa de aquecimento mostrou-se mais rápido e reprodutível se comparado com a extração utilizando autoclave, que é o principal método reportado para extração dos carboidratos em amostras de forrageiras.

A condição de separação no cromatógrafo foi obtida com eluição isocrática usando como fase móvel acetonitrila / solução aquosa H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,15 (1:99), fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, tempo de corrida de 15 minutos e detecção com comprimento de onda de 305 nm.

Foram realizados testes para avaliação do método, aplicando padronização externa, dentre eles avaliação da resposta linear, limites de detecção e quantificação, repetitividade, seletividade e recuperação.

Foram analisadas 68 amostras de 3 espécies de forrageiras, folha e caule, sendo a concentração quantificada através de padronização externa, onde todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de glicose, arabinose e xilose acima do limite de quantificação estabelecido para o método.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que a metodologia analítica proposta e utilizada, mostrou-se eficiente e reprodutível para análise de glicose, arabinose e xilose estruturais em amostras de forrageiras.

Também observou-se uma grande variação na concentração dos carboidratos com relação à composição do solo onde as repetições da mesma espécie foram plantadas, mostrando assim que o valor nutricional das forragens da mesma espécie (concentração dos carboidratos) é possivelmente muito sensível a composição do solo que a mesma foi cultivada.

## **5 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS**

Correlacionar os resultados obtidos na análise dos carboidratos estruturais encontrado neste trabalho, com as concentrações de ácidos fenólicos e características químico-bromatológicas como digestibilidade e fibra de detergente neutro destas espécies de forrageiras analisadas.

Aplicar o método desenvolvido no presente trabalho para quantificar glicose, arabinose e xilose em outras espécies de forrageiras, como também em outros vegetais.

**REFERÊNCIAS**

1. Deschamps, F. C.; Ramos, L. P., L.; *R. Bras. Zootec*, **2002**, 31(4), 1634.
2. Church, D. C.; *A Reston Book*; **1988**, 269.
3. Jung, H.G., Deetz, D.A. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D.; *Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America*, **1993**, 315.
4. Fukushima; R. S.; Hatfield, R. D.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3713.
5. Norton, B. W.; *Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux*, **1982**, 89.
6. Ralph, J.; *International Conference With Dairy and Forage Industries, Us Dairy Research Center*, **1996**.
7. Soest, V. P. J.; *Nutritional ecology of the ruminant.*, Cornell University Press, Ithaca, **1994**, 476.
8. Hall, M. B.; *Simpósio Internacional Em Bovinos De Leite, Anais... Lavras:UFLA-FAEPE*, **2001**, 2, 139.
9. Collins, P. M.; Ferrier, R. J.; *Monosaccharides.*, John Wiley & Sons, Inc: New York, **1995**.
10. Budavari, S.; O'neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; *The Merck Index, 11<sup>a</sup> Edition*, Merck & CO, **1989**.
11. Ridha, A. M.; Al-Sadi, H. I.; *small ruminant research*, **1992**, 9, 79.
12. Arciszewski, M. B.; Barabasz, S.; Skobowiat, C.; Maksymowicz, W.; Majewski M.; *Anat. Histol. Embryol.*, **2009**, 38, 62.
13. Sniffen, C. J.; Fox, D. G.; O'Connor, J. D.; Russell, J. B.; Soest, V. P. J.; *J Anim Sci*, **1992.**, 70, 3578.
14. Reis, R. A.; Rodrigues, L. R. A.; *Valor nutritivo de plantas forrageiras, Jaboticabal*, **1993**, 26.
15. Deresz, F.; Mozzer O. L.; *Anais do Simpósio sobre capim-elefante, Juiz de Fora, Brasil*, **1990**.

16. Deresz, F.; Matos, L. L. de; *Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Fortaleza, Brasil, 1996.*
17. Vilela, D.; Alvim, M. J.; *Anais do Workshop sobre o potencial forrageiro do gênero Cynodon, Juiz de Fora, Brasil, 1996.*
18. Ghisi, O. M. A.; Paulino, V. T.; *Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, Brasil, 1997.*
19. Vilela, D.; Alvim, M. J.; Rezende, G. M.; *Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, Brasil, 1997.*
20. Alvim, M. J.; Vilela, D.; Lopes, R. S. ; *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia 1997, 26(5), 967.*
21. Carvalho, C. A. B.; Deresz, F.; Rossiello, R. O.; Paciullo, D. S. C.; *In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 2004, 41.*
22. Deresz, F.; *Revista Brasileira de Zootecnia, 2001, 30 (2), 461.*
23. Aroeira, L. J. M.; Lopes, F. C. F.; Deresz, F.; Verneque, R. S.; Dayrell, M. S.; Matos, L. L.; Vasquez, M. H.; Vittori, A.; *Animal Feed Science and Tecnology, 1999, 78, 313.*
24. Deresz, F.; *In: Simpósio Sobre Capim-Elefante, Juiz de Fora. Anais. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994, 116.*
25. Deresz, F.; Mozzer, O. L.; *In: Simpósio Sobre Capim-Elefante, Juiz de Fora. Anais. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1990, 155.*
26. Machado, O. A.; Cecato, U.; Mira, R. T.; Pereira, L. A. F.; Martins, E. N.; Damasceno, J. C., Santos, G. I.; *In: Reuniao Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, Brasília, 1997, 37, 219.*
27. Ghisi, O. M. A.; Paulino, V. T.; *In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, Brasília, 1996, 34, 7.*
28. Postiglioni, S. R.; Messias, D. C.; *In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, Botucatu, 1998, 35, 439.*
29. Botrel, M. A.; Alvim, M. J.; Xavier, D. F.; *In: Reuniao Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, Brasília, 1997, 34, 21.*

30. Maestre, E.; Katakis, I.; Narváez, A.; Domínguez, B.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 21, 774.
31. Matos, R. C.; Matos, M. A. C.; Oliveira, A. C. A.; Assis, V. C.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 535, 213.
32. Jager, A. V.; Tonin, F. G.; Tavares, M. F. M., *Journal of Separation Science*, **2007**, 30 (4), 586.
33. Gomez, B. J. A.; Garcia, V. R. J.; Elvira G. S.; González, P. A. M.; *Chromatographia*, **1999**, 50, 461.
34. Dien, B. S.; Jung, H. J. G.; Vogel, K. P.; Casler, M. D.; Lamb J. F. S.; Iten, L.; Mitchell, R. B.; Sarath, G.; *Biomass and Bioenergy*, **2006**, 30, 880.
35. Mandebvu, P.; West, J. W.; Hill, G. M.; Gates, R. N.; Hatfield, R. D.; Mullinix, B. G.; Parks, A. H.; Caudle A. B.; *Journal Animal Science*, **1999**, 77, 1572.
36. Chitindingu, K.; Ndhlala, A. R.; Chapano, C.; Benhura, M. A.; Muchuweti, M.; *Journal of Food Biochemistry*, **2006**, 31, 206.
37. Tuberoso, C. I. G.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E.; Cabras, P.; *Food Chemistry*, **2007**, 103, 1494.
38. Deba, F.; Xuan, T. D.; Yasuda, M.; Tawata, S.; *Weed Biology and Management*, **2007**, 7, 77.
39. Shewmaker, G. E.; Mayland, H. F.; Roberts, C. A.; Harrison, P. A.; Chatterton, N. J.; Sleper, D. A.; *Journal Compilatio - Blackwell Publishing Ltd. Grass and Forage Science.*, **2006**, 61, 413.
40. Brito, C. J. F. A.; Rodella, A. R.; Deschamps, F. C.; *R. Bras. Zootec.*, **2003**, 32 (6), 183534.
41. Casler, M. D.; Hatfield, R.D.; *Journal Agriculture Food Chemistry*, **2006**, 54 (21), 8206.
42. Meyer, A.; Raba, C.; Fischer, K.; *Anal. Chemistry*; **2001**, 73, 2377.
43. Honda, S.; *J. Chromatograph*, **1996**, 720, 183.
44. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D.; *Department of Energy – USA Laboratory Analytical Procedure*; **2006**; 3.

45. Theander, O.; Westerlund, E.; *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **1986**, 34, 330.
46. Hatfield, R. D.; Jung, H. J. G.; Ralph, J.; *Journal Science Food Agriculture*, **1994**, 65, 51.
47. Andrade, J. B.; Bravo, R. V. F.; *Revista Química Nova*, **1989**, 12, 196.
48. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *John Wiley & Sons, Inc., New York, NY*, **1997**.
49. Komprda, T.; FrantGek, J.; Stohandlová, M.; Foltýn J.; *Animal Feed Science Technology* **1997**, 67, 141.
50. Jung, H. G.; *Phytochemistry*, **2003**, 63, 543.
51. Casler, M. D.; Jung, H. G.; *Animal Feed Science and Technology*, **2006**, 125, 151.
52. Fischer, H.; Meyer, A.; Fischer, K.; Kuzyakov, Y.; *Soil Biology & Biochemistry*; **2007**, 39, 2926.
53. Gomis, D. B.; Tamayo, D. M.; Alonso, J. M.; *Analytica Chemical Acta*, **2001**, 436, 173.
54. Hall, M.B., Hoover, W.H.; Jennings, J.P., Miller, T.K.; Webster. *Journal Science Food Agriculture*, **1999**, 79, 2079.
55. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
56. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
57. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, 1<sup>a</sup> reimpressão, Editora UNICAMP: Campinas, **2006**.
58. Dey, G.; Chakraborty, M.; Mitra, A.; *Journal of Plant Physiology*, **2005**, 162 (4), 375.