

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Renata de Jesus Coelho Castro

**“DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM
BRACHIARIA SPP. POR ELETROFORESE CAPILAR”**

Juiz de Fora
2011

Renata de Jesus Coelho Castro

**“DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM
BRACHIARIA SPP. POR ELETROFORESE CAPILAR”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Co-orientador: Dr. Fausto de Souza Sobrinho

Juiz de Fora
2011

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por todas as bênçãos e oportunidades.

À minha família, tão amada, tão importante: meus queridos pais Carlinhos e Lurdinha, que tanto sonharam junto comigo com mais esta conquista, meus irmãos Adelaide e Amarildo que acreditaram em mim desde do começo, sei que todos vocês torcem por mim e saibam que eu não seria nada sem vocês.

Ao meu grande amor, Paulo Sérgio, por todo amor concebido durante esse trabalho, com certeza você foi o ponto chave para que essa conquista se torna-se realidade.

Ao meu orientador Marcone, pela orientação, por toda atenção, compreensão, disponibilidade, e por compartilhar seu enorme conhecimento e bom-humor.

Ao meu co-orientador Fausto, pela confiança, e pelas contribuições e sugestões gentilmente cedidas no decorrer deste trabalho.

À Cris, pela enorme ajuda no período deste trabalho, pela amizade e pelo otimismo.

A todos os amigos da Embrapa Gado de Leite, pelo apoio, em especial ao Marco Antônio e Fernando César.

A todos os amigos do GQAQ que de uma forma ou de outra auxiliaram no meu trabalho e dividiram momentos agradáveis de convivência, em especial a Paty, pela amizade incondicional, carinho e dedicação em todo processo desse trabalho.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFJF pelo apoio financeiro.

Dedico esta dissertação ao meu marido Paulo Sérgio por todo o companheirismo ao longo de toda minha jornada, te amo simplesmente por tudo meu grande amor.

RESUMO

As forrageiras são os principais componentes da dieta de ruminantes, sendo fonte de energia e nutrientes para produção de leite e carne. Dentre os ácidos graxos encontrados nas forrageiras, dois (ácido linoleico - C18:2 n6 e ácido α -linolênico - C18:3 n3) têm recebido atenção especial por serem precursores para a síntese do ácido linoléico conjugado (do inglês, CLA - *Conjugated Linoleic Acid*), uma classe composta que reforçam a saúde encontrados predominantemente em produtos lácteos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método alternativo para quantificação de C18:2 e C18:3 em forrageiras por meio da técnica de eletroforese capilar (EC), utilizando a espécie *Braquiária ruziziensis* como referência. Foi utilizado EC de zona com detecção indireta no UV em 224 nm, capilar com revestimento externo de teflon, e tempo de análise em torno de 10 minutos. Realizou-se um planejamento composto central rotacional (DCCR) com triplicata no ponto central para a otimização da composição do eletrólito de corrida, visando à separação do par crítico C16:0/C18:2. O eletrólito constituído de 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH \approx 6,8); 8,0 de mmol L⁻¹ Brij 35, 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 2,0% v/v de n-octanol e 43,5% v/v de acetonitrila foi otimizado. Além disso, três métodos de extração de lipídios foram testados: 1- Hara e Radin; 2- Micro Folch e 3- Bligh e Dyer, os melhores resultados foram obtidos usando o método de Hara e Radin. Após a otimização do sistema de eletrólito e escolhendo o método de extração de lipídios, duas curvas de calibração foram construídas em diferentes níveis de concentração para os ácidos graxos de interesse, utilizando C13:0 como padrão interno. Após a verificação de que não houve ocorrência de falta de ajuste nos modelos, o fator de resposta (R_f) foi calculado e aplicado para quantificação dos ácidos graxos de interesse na amostra de *braquiária ruziziensis*. O método otimizado por CZE foi então comparado com a cromatografia gasosa (o método AOCS oficial para análise de ácidos graxos) através do teste t pareado. Não houve diferença entre os métodos dentro de um intervalo de confiança de 95% (p = 0,12). Os resultados indicam que o método otimizado por eletroforese capilar pode ser usado para determinação dos ácidos graxos mais abundantes em amostras de forragem. Este método alternativo tem vantagens sobre o método GC tradicional: menor tempo de análise, ausência de passos de derivatização no preparo da amostra, uso de colunas não-específicas e um custo analítico mais baixo.

Palavras-chave: Eletroforese capilar, forrageiras, precursores do CLA.

ABSTRACT

Forages are the major components of ruminant diets, being a source of energy and nutrients for milk and meat production. Among the fatty acids found in forages, two (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) have received particular attention due to their roles as precursors for the synthesis of conjugated linoleic acid (CLA), a class of health enhancing compounds predominantly found in dairy products. The objective of this study was to develop an alternative method for quantification of C18:2 and C18:3 in forages through the capillary electrophoresis (CE) technique, using *Brachiaria ruziziensis* as the reference forage. The analytical procedure involved CE with indirect detection zone in the UV at 224 nm, capillary external coating of Teflon and analysis time around 10 minutes. A rotational central composite design (star design) with triplicate at the central point was used to optimize the composition of the electrolyte system in order to separate the C16:0/C18:2 pair. The following electrolyte composition was obtained: 15.0 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ buffer (pH~6,8), 8.0 mmol L⁻¹ Brij 35, 4.0 mmol L⁻¹ SDBS, 1.5% v/v n-octanol and 43,5% v/v ACN. Additionally, three methods of lipid extraction were tested: 1. Hara & Radin, 2. Micro Folch and 3. Bligh & Dyer; the best results were achieved by using the method of Hara and Radin. After optimizing the electrolyte system and choosing the lipid extraction method, two calibration curves were made using different concentrations of selected fatty acids and C13:0 as the internal standard. After checking for no occurrence of lack of fit of the models, a response factor (R_F) was calculated and applied in the quantification of selected fatty acids in the forage sample. The optimized CZE method was then compared to gas chromatography (the AOCS official method for fatty acid analysis) through the paired t-test. There was no difference between methods within a 95% confidence interval (p= 0,12). Our results indicate that the optimized CE method proposed herein can be used to quantify the most abundant fatty acids in forage samples. This alternative method has some advantages over the traditional GC method: less time-consuming, no derivatization step or specific separation columns required, and lower analytical cost.

Keywords: Capillary Electrophoresis, forages, precursors of conjugated linoleic acid (CLA).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura dos isômeros do CLA trans-10, cis-12; cis-9 trans-11; e Ácido linoléico (cis-9, cis-12).....	19
FIGURA 2: Via metabólica proposta para biossíntese do C18:2 cis-9 trans-11	21
FIGURA 3: Representação de um equipamento de eletroforese capilar.....	23
FIGURA 4: Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do anodo para o catodo (fluxo normal).....	25
FIGURA 5: Perfil de velocidade radial para um fluxo induzido por um campo elétrico (eletrosmótico) e um fluxo induzido por pressão (laminar), e correspondente efeito na variância da distribuição.....	27
FIGURA 6: Diagrama esquemático de um cromatográfico a gás	29
FIGURA 7: Reação de hidrólise básica dos glicerídeos.....	35
FIGURA 8: Esquema representativo do processo de saponificação das amostras	36
FIGURA 9: Esquema representativo do processo de metilação da fração lipídica após a etapa de extração	37
FIGURA 10: Figura esquemática representando o mecanismo de separação de AG de cadeia longa por eletroforese capilar de zona em modo contra-eletrosmótico.....	40
FIGURA 11: Eletroferogramas de padrões a uma concentração de 0,5 mmol L ⁻¹ cada: 1-C18:0, 2-C18:1c, 3-C16:0, 4-C18:2, 5-C18:3, 6-C14:0, 7-C13:0 e 8-C12:0. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo	43
FIGURA 12: Eletroferogramas de padrões a uma concentração de 0,5 mmol L ⁻¹ cada: 1-C18:0, 2-C18:1c, 3-C16:0, 4-C18:2, 5-C18:3, 6-C14:0, 7-C13:0 e 8-C12:0. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em	

224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento44

FIGURA 13: Eletroferogramas do eletrólito (experimento 13) escolhido como melhor com os padrões a uma concentração de 0,5 mmol L⁻¹, onde temos: 1-C18:0, 2-C18:1c, 3-C16:0, 4-C18:2, 5-C18:3, 6-C14:0, 7-C13:0 e 8-C12:0. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento46

FIGURA 14: 1-C18:0; 2-C18:1c; 3-C16:0; 4-C18:2; 5-C18:3. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento47

FIGURA 15: Eletroferogramas da extração Micro Folch com as variações da massa. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento 48

FIGURA 16: Eletroferogramas da extração Bligh e Dyer. Condições de análise: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19KV, temperatura no cartucho de 25°C e detecção indireta em 224nm. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento 50

FIGURA 17: Os picos 1, 2 e 3 correspondem respectivamente aos ácidos graxos C16:0, C18:2 e C18:3 em todos os eletroferogramas. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento52

FIGURA 18: Os picos 1, 2 e 3 correspondem respectivamente aos ácidos graxos C16:0, C18:2 e C18:3 em todos os eletroferogramas. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm,

dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento 53

FIGURA 19: O eletroferograma A corresponde a mistura de padrões onde os picos 1, 2, 3, 4 e 5 são respectivamente aos ácidos graxos C18:0, C18:1c, C16:0, C18:2 e C18:3, o eletroferograma B corresponde ao resultado da amostra de braquiária no equipamento da Agilent e o eletroferograma C corresponde ao resultado da amostra de braquiária no equipamento da Beckman. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.....60

FIGURA 20: Cromatograma dos ésteres metílicos de ácidos graxos de braquiárias em análise por GC/FID, o padrão interno utilizado foi o C13:0. Condições cromatográficas: temperatura da coluna mantida isotermicamente a 200°C, temperatura do injetor e detector mantida a 280°C; gás de arraste hidrogênio ultra puro a 2,4 mL/min a 40 graus, detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de cyanopropylpolysiloxano (60 m x 0,32 mm id, 0,25 µm) 61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Planejamento experimental para escolha do eletrólito	42
TABELA 2: Cálculo da resolução do par crítico (C16:0/C18:2)	45
TABELA 3: Matriz de planejamento para um Box-Behnken 3^3	51
TABELA 4: Valores usados para implementação do modelo de regressão para a 1ª curva Analítica	56
TABELA 5: Valores usados para implementação do modelo de regressão para 2ª curva Analítica	57
TABELA 6: Curva de calibração 1 – UFJF	58
TABELA 7: Curva de calibração 2- UFJF	58
TABELA 8: Curva de calibração 1- EMBRAPA	58
TABELA 9: Curva de calibração 2- EMBRAPA	58
TABELA 10: Resultados do equipamento de CE da Agilent e da Beckman comparado com os resultados de GC	62

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ζ – Potencial zeta

ACN – acetonitrila

AG – Ácidos graxos

AOCS – Sociedade Americana da química do óleo (*American Oil Chemists' Society*)

BRIJ 35 – Éter laurílico de polioxietileno 23

CCE – comprimento de cadeia equivalente

CE – Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

CLA – Ácido Linoléico Conjugado (*Conjugated linoleic acids*)

CZE – Eletroforese Capilar de Zona (*Capillary Zone Electrophoresis*)

DAD – Detector Arranjo de diodos (*diode array detection*)

FID – Detector de ionização de chama (*Flame ionization detection*)

EF – Mobilidade eletroforética (*electrophoretic mobility*)

EOF – Fluxo eletrosmótico (*electrosmotic flow*)

μ_{ap} – Mobilidade aparente

μ_{EF} – Mobilidade eletroforética

μ_{EOF} – Mobilidade do fluxo eletrosmótico

FAME – Metil éster de ácido graxo (*fatty acid methyl ester*)

GC – Cromatografia à gás (*Gas Chromatography*)

MS – Massa seca

pK_a – Antilogaritmo da constante de dissociação de um ácido

Rf – Fator de Resposta (*Response Factor*)

SDBS - Dodecilbenzenosulfonato de sódio (*Sodium Dodecylbenzenesulfonate*)

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 BRAQUIÁRIAS	15
1.2 ÁCIDOS GRAXOS	17
1.2.1 Definição	17
1.2.2 Classificação	18
1.3 CLA (<i>ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO</i>)	18
1.3.1. Conceito	18
1.3.2 Precursores do CLA	19
1.3.3 Produção de CLA no rúmen	20
1.3.4 Efeitos Biológicos	22
1.4 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO	22
1.4.1 Eletroforese capilar(CE)	22
1.4.1.1 Instrumentação	23
1.4.1.2 Modos de introdução da Amostra	24
1.4.1.3 Fundamentos Teóricos	25
1.4.1.3.1 Fluxo eletrosmótico(EOF)	25
1.4.1.3.2 Mobilidade eletroforética	26
1.4.1.3.3 Eficiência da Separação	27
1.4.1.4 Modos de Separação	27
1.4.1.4.1 Eletroforese Capilar de Zona	28
1.4.2 CROMATOGRAFIA À GÁS (<i>GC do inglês Gás Chromatography</i>)	28
2. OBJETIVO	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES PARA CE	31
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES PARA GC	31
3.3 INSTRUMENTAÇÃO	32
3.3.1 Eletroforese Capilar	32
3.3.3 Cromatografia a Gás (GC)	32
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	33
3.4.1 Etapa de liofilização	33
3.4.2. Métodos de Extração	33
3.4.4 Preparo das amostras para análise por GC	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LONGA POR ELETROFORESE CAPILAR	39

4.2 PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (PLANEJAMENTO ESTRELA) PARA OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO	40
4.3. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	46
4.3.1 Extração Hara & Radin (Adaptado)	47
4.3.2 Extração Micro-Folch.....	48
4.3.3. Extração de Bligh e Dyer (Adaptado)	49
4.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS NA AMOSTRA DE BRAQUIÁRIA	54
4.4.1. Cálculos do Fator de resposta e verificação da Falta de Ajuste do Modelo.....	54
4.4.2. Quantificação da amostra de braquiária	59
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE A METODOLOGIA OTIMIZADA POR CE E O MÉTODO OFICIAL PARA ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	61
5. CONCLUSÃO.....	64
6.REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Braquiárias

O gênero *Brachiaria* é muito amplo, com cerca de 80 espécies, na grande maioria de origem africana. Segundo Valle (1991), a primeira introdução oficial no Brasil foi da *Brachiaria decumbens* e ocorreu em 1952. Porém, foi a partir de 1965, após importações de grande quantidade de sementes de *Brachiaria decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. brizantha*, que o gênero *Brachiaria* conseguiu seu reconhecimento.

As braquiárias (*Brachiaria spp.*) são muito usadas na dieta de ruminantes no Brasil, sendo que as espécies mais cultivadas são: *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Embora não seja a espécie com maior área cultivada, a demanda por sementes de *B. ruziziensis* vêm aumentando com o incremento da integração entre agricultura e pecuária. Dentre as espécies cultivadas no Brasil, a *B. ruziziensis* é a única sexual e diplóide, possibilitando a realização de cruzamentos e geração de variabilidade para seleção de materiais superiores. Essa espécie possui melhor relação folha:colmo e maior valor nutritivo da forragem, tendo uma melhor aceitação pelos bovinos. Porém, é menos produtiva na época de seca e/ou de temperaturas baixa (Botrel, 1999), mais sensível às cigarrinhas-das-pastagens e mais exigente quanto à fertilidade do solo (Souza Sobrinho, 2005).

A *Brachiaria ruziziensis* tem origem africana ocorrendo em condições úmidas e não inundáveis. Trata-se de uma espécie perene, subereta, variando de 100 a 150 centímetros de altura, possui rizomas fortes em forma de tubérculos arredondados, sendo conhecida dentro de seu gênero como a de melhor qualidade de forragem. Suas folhas são lineares e lanceoladas variando entre 100 e 200 mm de comprimento e 15 mm de largura. Possui intensa produção de sementes podendo expandir-se para outras áreas com facilidade. A inflorescência é racemosa e o florescimento é abundante sendo a única espécie forrageira sexual diplóide cultivada no Brasil, o que permite a geração de variabilidade genética. Sua utilização vem aumentando nos últimos anos principalmente em áreas de integração lavoura-pecuária (SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2006), e o sucesso de um programa de melhoramento genético envolvendo esta espécie pode proporcionar resultados altamente favoráveis para a pecuária do Brasil, um país, no qual a maioria do rebanho é criada a pasto. Por essas vantagens, frente a outras espécies de braquiárias, a braquiária *ruziziensis* será utilizada no nosso experimento, uma vez que um dos

focos de interesse é encontrar em qual momento de crescimento desta espécie ocorre a maior concentração de lipídios.

Os lipídeos definem um conjunto de substâncias químicas, que constituem uma classe heterogênea de moléculas que tem em comum baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos, podendo ser subdivididos em 2 subgrupos: lipídeos simples os quais incluem ácidos graxos, esteróides e triglicérides; e lipídeos complexos, constituídos por glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos.

Nos vegetais, os lipídeos são agrupados em duas categorias: estruturais e de reserva. A primeira categoria compõe as membranas biológicas e a superfície de proteção (ceras). Os lipídeos de membrana encontrados, principalmente na mitocôndria, retículo endoplasmático e membranas plasmáticas, são compostos principalmente por glicolipídeos (40 a 50%) e fosfolipídios. Já os lipídeos de reserva, encontrados nos frutos e sementes, encontram-se, predominantemente na forma de óleos (McDonald *et al.*, 1991). Assim, o tipo de lipídeo, em vegetais, varia de acordo com sua localização na planta. Nas sementes, encontram-se principalmente os triacilgliceróis, associados às reservas energéticas. Estes são os mais encontrados nos alimentos concentrados que constituem parte da dieta de ruminantes, já que esses, em geral, são subprodutos de sementes. Nas folhas, os lipídeos mais comuns são os galactolipídeos, constituídos por glicerol, galactose e ácidos graxos insaturados, e os fosfolipídios, associados às membranas biológicas, em especial os cloroplastos. Os ácidos graxos poliinsaturados, como o linolênico (C18:3) e linoléico (C18:2), compõem a maioria dos ácidos graxos presentes nas forrageiras (HARWOOD, 1980; Byers e Shelling, 1993; Van Soest, 1994; Bauman *et al.*, 1999), os quais são característicos de folhas metabolicamente ativas. Assim, à medida que o estágio vegetativo avança, o número de folhas diminui alterando-se a relação folha/caule. Com isso, o número de cloroplastos também diminui. Dessa forma, o teor de lipídeos decresce, determinando queda no teor de ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados. A distribuição, o conteúdo e a proporção dos ácidos graxos nos tecidos das plantas variam com o seu estágio vegetativo (McDonald *et al.*, 1991; Guil-Guerreiro, *et al.*, 2001; Elgersma *et al.*, 2003). Observa-se assim, que a formação do aparato fotossintético provoca mudanças na composição lipídica dos vegetais.

Outro fator que provoca alteração na fração lipídica de vegetais é a forma de conservação (ensilagem fenação). Estas práticas produzem diminuição na concentração dos ácidos graxos, provavelmente, resultante das oxidações e formação de polímeros, assim como,

da atividade dos microorganismos presentes e das enzimas vegetais ativas durante o processo (Van Soest, 1994; French *et al.*, 2000; Elgersma *et al.*, 2003).

Dentre as substâncias presentes nas braquiária, os lipídeos representam 8% da matéria seca das folhas, e estão localizados com frequência nos cloroplastos da folha, o qual contém 22 a 25% de lipídeos sobre a base da matéria seca. Por outro lado, os complexos lipídicos constituem a maior parte dos tecidos das folhas, principalmente os glicolípidios e os fosfolípidios. Os lipídeos esterificados nas forrageiras representam 2/3 do total de lipídeos, que por sua vez, representam 5% de matéria seca.

As braquiárias fornecem lipídeos essenciais e ácidos graxos na dieta dos ruminantes. Dentre os ácidos graxos, o ácido linolênico (C18:3) é o de maior concentração representando de 50 a 75% do total de ácidos graxos, enquanto os ácidos linoléico (C18:2) e palmítico (C16:0) são os mais abundantes no segundo momento. Dentre os ácidos graxos presentes nas braquiárias o C18:3 e o C18:2 são os de maiores interesse do ponto de vista quantitativo, uma vez que são os precursores do CLA (*Ácido Linoleico Conjugado*) (Boufaied.H, 2003).

1.2 Ácidos graxos

1.2.1 Definição

Os ácidos graxos (AG) são definidos como ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, alifáticos, não ramificados, saturados ou insaturados, apresentando na maioria das vezes, cadeia hidrocarbonada longa com número par de átomos de carbono que podem ser representados pela forma **RCOOH**. Na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia hidrocarbonada longa, não ramificada, com número par de átomos de carbonos, podendo ser saturada ou monoinsaturada (no caso de conter uma insaturação) ou poliinsaturada (no caso de conter mais de uma insaturação). O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia **R**, a região apolar da molécula (CURI *et al.*, 2002).

1.2.2 Classificação

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes na molécula, sendo denominados ácidos graxos de cadeia curta aqueles cuja cadeia carboxílica possua de 2 a 4 átomos de carbono, de cadeia média aqueles com 6 a 10 átomos de carbono e de cadeia longa aqueles com mais de 12 átomos de carbono. Os ácidos graxos também podem ser classificados de acordo com a presença ou não de insaturações, sendo denominados ácidos graxos saturados aqueles que não possuem dupla ligação entre os átomos de carbono da cadeia, monoinsaturados aqueles que possuem uma única insaturação entre os carbonos e poliinsaturados aqueles que possuem duas ou mais insaturações ao longo da cadeia carboxílica. Os ácidos graxos comumente encontrados nas braquiárias são: ácido láurico (C12:0), ácido míristico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoléico (C18:2), ácido α -linolenico (C18:3), sendo que os dois últimos e o palmítico se encontram em maiores concentrações, (Fernandes, 2007).

1.3 CLA (*Ácido Linoleico Conjugado*)

1.3.1. Conceito

O CLA compreende um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico (18:2 cis-9 cis-12) os quais se caracterizam pela presença de duplas ligações conjugadas, isto é, separadas por apenas uma ligação simples entre átomos de carbono. Trata-se de um composto natural, existente em diferentes formas, de acordo com o arranjo de suas moléculas. É um termo usado para a mistura dos isômeros geométricos do ácido linoléico (C18:2) que contém duas duplas ligações e que está presente em diversos alimentos de origem animal.

O CLA é um ácido graxo encontrado apenas em produtos de origem animal (carne e laticínios) e não pode ser produzido pelo organismo humano.

O isômero principal na gordura do leite é o cis-9, trans-11 C18:2, o qual é responsável por mais de 80% dos isômeros de CLA na gordura do leite e o CLA trans-10 cis-12 cerca de 1% do CLA total.

Posteriormente, o uso da cromatografia a gás e de outras técnicas analíticas permitem a identificação de cerca de 20 isômeros de CLA na gordura do leite e de carne de ruminantes, diferindo tanto na posição da dupla ligação quanto na sua configuração geométrica, que pode ser do tipo cis ou trans. Dois deles (cis-9 trans-11 e trans-10 cis-12) tem despertado grande interesse em função dos efeitos biológicos.

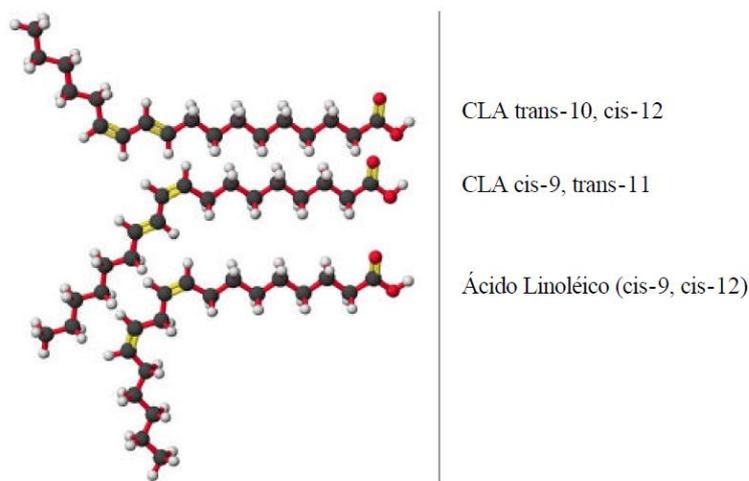


Figura1: Estrutura dos isômeros do CLA trans-10, cis-12; cis-9, trans-11; e Ácido linoléico (cis-9, cis-12). Adaptado de Pariza *et al.*.(2001).

1.3.2 Precursores do CLA

Para obtenção de leite com elevada concentração de CLA cis-9 trans-11, deve-se prover o rúmen de substratos, como ácidos graxos poliinsaturados (exemplo: ácidos linoléico e α -linolenico), objetivando maximizar a síntese ruminal de CLA cis-9 trans-11 e/ou de seus precursores, como o ácido trans-vacênico (C18:1 trans-11), mediante incompleta biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na dieta (Griinari, 1997). Diversos estudos têm demonstrado que quando os ruminantes se alimentam diretamente no pasto ocorrem aumentado teor de CLA no leite. Portanto, tem sido demonstrado que quando as vacas em lactação mudam de uma dieta completa à base de forragens conservadas e grãos para dietas à base de pasto, ou quando a proporção de pasto na dieta aumenta, a concentração de CLA no leite também aumenta (Dhiman *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1998; Bargo *et al.*, 2006; khalal *et al.*, 2007).

Artigo recente de revisão mostrou que o teor total de ácidos graxos totais (g/kg de MS)

e o teor de ácido α -linolênico são reduzidos com o avanço do estágio de maturação da forragem e com o processo de murchamento (Dewhurst *et al.*, 2006). Além disso, estudo recente (Khan *et al.*, 2009) demonstrou que a exposição da silagem ao ar durante o seu fornecimento reduz o teor de ácidos graxos poliinsaturados. Portanto, não é surpresa que ruminantes alimentados com dietas à base de forragens conservadas, ou pastando forragens em estágio avançado de maturação, apresentem menor teor de CLA no leite quando comparados a animais recebendo forragens frescas. Cabe ainda ressaltar que o perfil de ácidos graxos pode variar entre as espécies de forrageiras (Fernandes *et al.*, 2007), mas há pouca informação disponível na literatura sobre o perfil de ácidos graxos de forrageiras tropicais. Portanto, a realização de estudos com o intuito de identificar as espécies e cultivares com maior potencial para aumento do teor de CLA no leite de ruminantes criados em condições tropicais é relevante.

1.3.3 Produção de CLA no rúmen

Embora o CLA seja encontrado naturalmente em muitos alimentos, sua principal fonte dietética são os produtos lácteos e outros alimentos derivados de ruminantes (Lawson *et al.*, 2001). Os ácidos graxos presentes nas forragens, cereais e sementes oleaginosas são, em sua maioria, ácidos graxos poliinsaturados de 18 carbonos (ex.: ácidos linoléico e α -linolênico), com algumas fontes (ex.: óleos de amendoim e oliva) contendo elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico (C18:1 *cis*-9). Óleos de peixe, em contrapartida, são ricos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série ômega três (ω -3), especialmente o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e docosaexaenóico (DHA, 22:6n-3). Estes ácidos graxos são extensivamente metalizados e biohidrogenados no rúmen, resultando não somente na produção de C18:0, mas também em um série de intermediários de biohidrogenação, como isômeros de C18:1 *trans*-11 e de CLA, conforme ilustrada na figura 2.

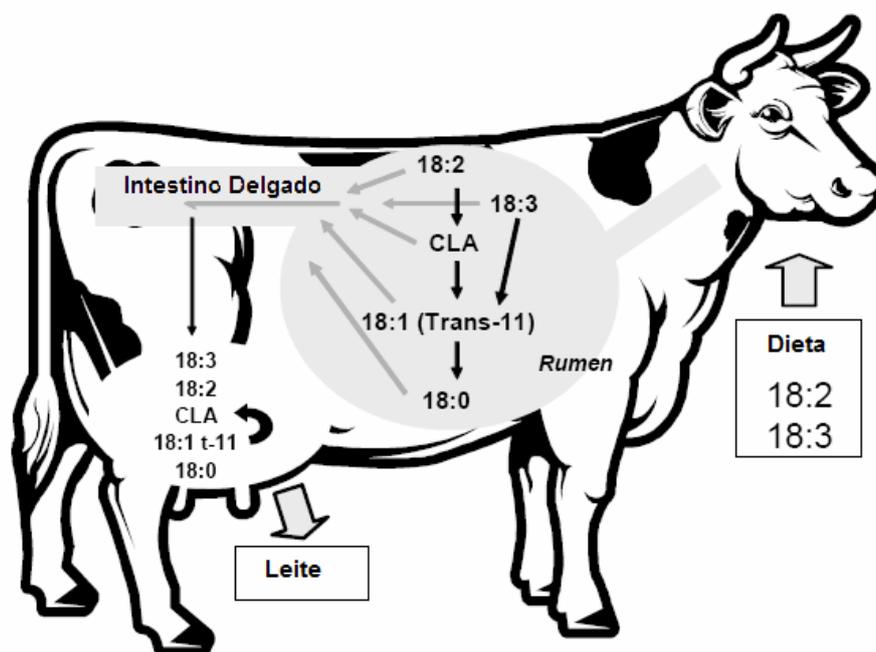


Figura2: Via metabólica proposta para biossíntese do C18:2 cis-9 trans-11. Adaptado de Kennelly; Bell (2007).

O tipo de isômero formado varia amplamente em função da dieta fornecida, como demonstrada em diversos estudos (Roy *et al.*, 2006; Bell *et al.*, 2006; Jurjanz *et al.*, 2004; Loor *et al.*, 2005). Além de serem absorvidos no intestino e diretamente secretados no leite, alguns intermediários da biohidrogenação ruminal são reduzidos nos tecidos, especialmente na glândula mamária, por ação da enzima Δ -9 dessaturase. Nos ruminantes o CLA é produzido normalmente por bactérias ruminais, como um intermediário do processo de biohidrogenação do ácido linoléico, sendo a *Butyrivibrio fibrisolvens* a mais conhecida (Kepler *et al.*, 1966). A cis-12, trans-11 linoleato isomerase, enzima que catalisa a transformação de ácido linoléico em ácido vacênico, precisa de radicais carboxila (COOH) livres para completar a reação (Kepler *et al.*, 1966). Isto implica necessariamente em uma lipólise anterior a isomerização dos galactilípidios, fosfolípidios e triglicerídeos da dieta.

Várias espécies de bactérias possuem um complexo de lípases capazes de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos (Bauman & Griinari, 2001). A isomerização inicial é seguida pela saturação da dupla cis-9 através da ação de uma enzima redutase, resultando no ácido vacênico (C18:1 trans-11). Este é o isômero trans encontrado em maior quantidade na gordura do leite de ruminantes (Martin & Jenkins 2002). A próxima etapa envolve uma redução subsequente até a formação do ácido esteárico (C18:0). Esta via metabólica é a mais conhecida e a mais expressiva (Harfoot & Hazlewood, 1988). Normalmente, a

biohidrogenação acontece de forma completa, porém alguns produtos intermediários podem atravessar o rúmen e serem utilizados na síntese de lipídios no tecido mamário e adiposo.

1.3.4 Efeitos Biológicos

Nos últimos anos o interesse por CLA vem aumentando devido aos efeitos biológicos apresentados por ele. Tais efeitos incluem ação antiadipogênica, anti-carcinogênica, anti-aterogênica, anti-diabetogênica e modulação da resposta inflamatória (Pariza et al., 2001; Belury, 2002; Bhattacharya et al., 2006).

A atividade anti-carcinogênica do CLA, em sua forma cis-9, trans-11, foi a primeira propriedade a despertar interesse. Talvez este seja o mais potente anti-carcinogênico de origem animal conhecido pelo homem, o CLA cis-9, trans-11 não só previne, mas atacam as células tumorais já presentes no organismo, reduzindo tumores previamente formados.

O CLA trans-10, 12, apresenta a capacidade de inibir a síntese de gorduras no organismo.

1.4 Técnicas de Separação

1.4.1 Eletroforese capilar(CE)

A eletroforese capilar é definida como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos, neutros, iônicos ou ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico da ordem de kVolts/m tangenciando uma coluna capilar (sílica fundida, teflon ou pirex), a qual contém em seu interior uma solução de eletrólito conveniente, normalmente tamponada, atuando como canal de migração (BAKER, 1995, TAVARES, 1996).

Por ser ecologicamente mais correta e de menor custo operacional, a CE tem sido a técnica de separação de mais rápida expansão em análises farmacêuticas, e tem gradualmente se estabelecido como uma técnica alternativa e de suporte para HPLC (ALTRIA, 1999; VEUTHEY, 2005; WATSON, 1999) e para cromatografia a gás (CASTRO 2005).

1.4.1.1 Instrumentação

A eletroforese capilar tem como um dos aspectos mais importantes sua simplicidade na instrumentação. O sistema de CE consiste na aplicação de uma alta voltagem (positiva ou negativo), tipicamente da ordem de 5 a 30 KV e corrente de 0 a 200 μ A, capilares de sílica fundida (revestido externamente com poliimida ou teflon), um par de eletrodos (geralmente de platina, material inerte), termostato, reservatórios para soluções e um detector apropriado. A fonte de alta tensão é conectada, através dos eletrodos de platina, a dois reservatórios de eletrólito para completar o circuito elétrico. O sistema é termostaticado por circulação de ar forçado ou de um líquido refrigerante (“coolant”) através do cartucho contendo o capilar para minimizar efeitos térmicos, pois a temperatura no interior do cartucho tem que ser mantida constante (Tavares, 1996). A Figura 3 mostra um esquema geral de um aparelho de CE.

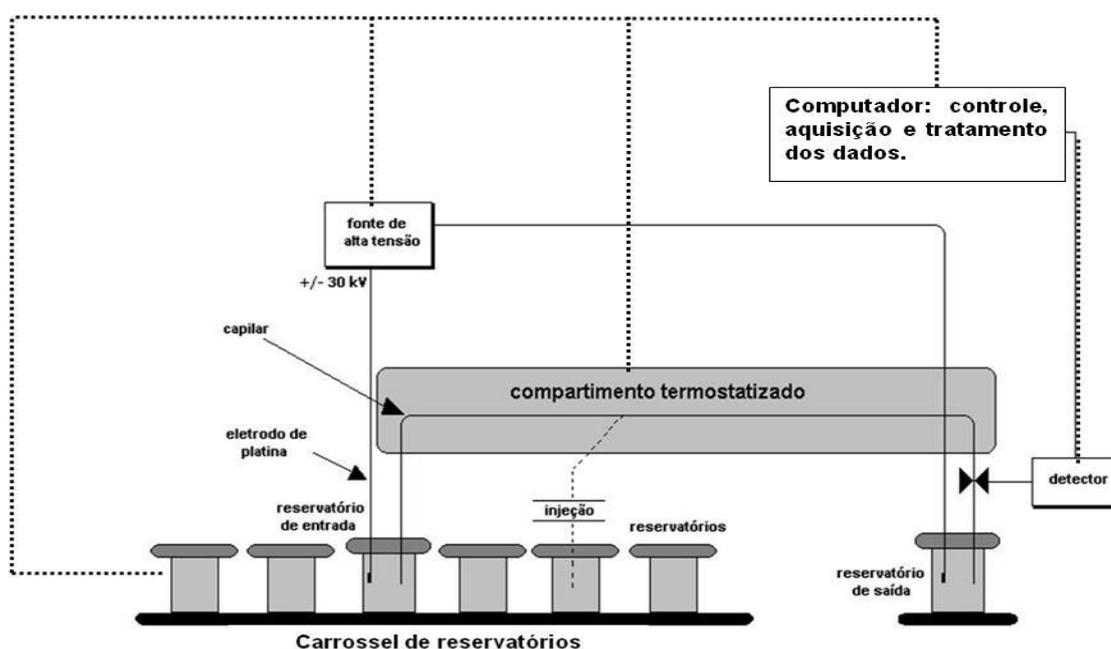


Figura 3: Representação de um equipamento de eletroforese capilar.
Fonte: OLIVEIRA, 2003.

Na eletroforese capilar a separação é conduzida em tubos com dimensões que podem variar de 15 a 100 μ m de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento, preenchido com uma solução de eletrólito, e submetido à ação de um campo elétrico. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros modos convencionais de eletroforese como placas de gel e

papel. Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), o capilar possibilita a dissipação do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule).

1.4.1.2 Modos de introdução da Amostra

A introdução da amostra em CE utiliza volumes reduzidos, na ordem de 1 a 10 nL. A maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta na análise quantitativa. As amostras podem ser introduzidas mediante gradiente de pressão (pressurização ou vácuo em um dos reservatórios), chamado de injeção hidrodinâmica ou mediante aplicação de determinado valor de potencial ao longo do capilar por um determinado período de tempo chamado de injeção eletrocinética.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da amostra, por um gradiente de pressão. Esse gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonagem. O volume de amostra (nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença da pressão estabelecida.

A injeção eletrocinética introduz a amostra no capilar por combinação entre as velocidades eletroforética e eletrosmótica. Logo, a quantidade de amostra injetada é uma função da mobilidade eletroforética de soluto, das condutividades da amostra e meio condutor, assim como da magnitude do fluxo eletrosmótico.

A injeção hidrodinâmica é mais representativa por ser baseada estritamente na transferência de volume. (TAVARES, 1996).

1.4.1.3 Fundamentos Teóricos

1.4.1.3.1 Fluxo eletrosmótico(EOF)

Quando a alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida ou teflon contendo uma solução tampão, a solução tampão se move através do capilar sob a influência de um campo elétrico; este fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico. Sob a aplicação de voltagem positiva na injeção, utilizando capilar de sílica fundida, o EOF ocorre em direção ao cátodo, o que significa que a solução tampão flui do reservatório de entrada através do capilar e é descartada no reservatório de saída.

Em contato com uma solução tampão a superfície interna do capilar adquire carga devido a dois fenômenos: ionização ou adsorção.

Em capilares de teflon, o EOF ocorre em função da absorção dos íons eletricamente carregados do tampão na parede interna do capilar.

Em capilares de sílica fundida os grupos silanóis (Si-OH) de caráter ácido (pK_a 5,9) quando em contato com o meio aquoso são ionizados e a superfície interna do capilar torna-se negativamente carregada. Cátions hidratados na solução eletrolítica são atraídos pelos grupos silanóis negativos e começam a se organizar em duas camadas, sendo uma camada compacta (ligada por forças eletrostáticas) e a outra “mais frouxa” ou difusa. A camada compacta é formada na região imediatamente adjacente à superfície devido à adsorção específica, por forças eletrostáticas e/ou de coesão, de moléculas de água e alguns íons, provavelmente desidratados, e através da adsorção não-específica de íons hidratados que se ligam fracamente a superfície. A camada difusa é a região na qual a concentração de íons de carga oposta à superfície do capilar diminui aproximando-se da concentração dos íons em solução. Quando um campo elétrico é aplicado, a camada difusa move-se em direção ao cátodo, arrastando com ela um volume de solução do eletrólito, que é chamado fluxo eletrosmótico. A figura 4 ilustra esse processo.

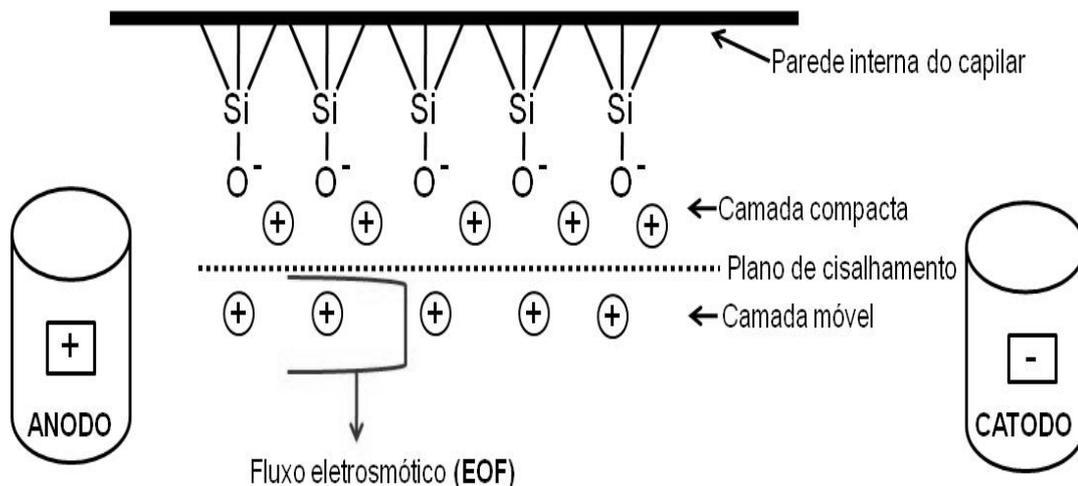


Figura4: Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico deslocando do anodo para o catodo (fluxo normal).

Fonte: BAKER, 1995.

O controle adequado do EOF é de grande importância para a eficiência da separação, por isso a algumas propriedades físico-químicas da solução devem ser controladas. Entre estas propriedades destacam-se: pH, concentração (força iônica) da solução tampão, tipo e concentração de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, viscosidade, constante dielétrica e temperatura.

1.4.1.3.2 Mobilidade eletroforética

A mobilidade eletroforética (μ_{ep}), é o fenômeno exclusivo de um soluto, correspondente a sua velocidade (V_{ep}) em um campo elétrico unitário, ou seja, tal mobilidade é intrínseca de cada espécie analisada. A mobilidade é diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional ao coeficiente de atrito. A separação das espécies é possível graças à diferença nas mobilidades iônicas dos analitos, que estão relacionadas com suas densidades de carga, isto é, com a razão carga/raio. Logo, formam-se zonas de amostras distintas de acordo com a mobilidade. A equação (1) mostra que a velocidade eletroforética de uma espécie é o produto entre a mobilidade eletroforética e o campo elétrico, ou seja, a mobilidade eletroforética não depende somente da densidade da carga do soluto, mas também do tamanho da molécula do soluto e da viscosidade do eletrólito, como pode ser observado pela equação

(2). Logo, espécies pequenas e altamente carregadas possuem alta mobilidade eletroforética. O tempo necessário para um composto percorrer o capilar até o ponto de detecção é chamado de tempo de migração (SILVA *et al.*, 2007).

$$v_{ef} = \mu_{ef} E \quad (1)$$

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

1.4.1.3 Eficiência da Separação

Como o EOF afeta o período de tempo em que um soluto permaneceno interior do capilar, tanto a eficiência e a resolução são relacionadas à direção e o fluxo do EOF. O perfil do EOF é planar ou radial (figura 5), diferente do fluxo laminar característico dos fluídos sob pressão, e tem mínima resistência à transferência de massa (TAVARES, 1995).

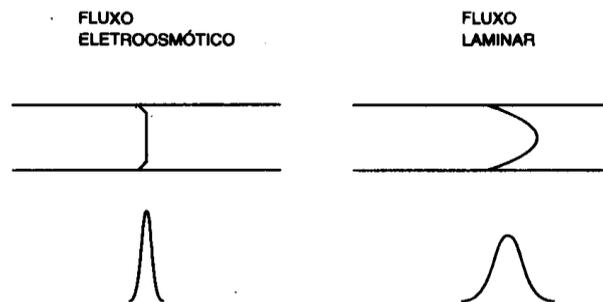


Figura 5: Perfil de velocidade radial para um fluxo induzido por um campo elétrico (eletroosmótico) e um fluxo induzido por pressão (laminar), e correspondente efeito na variância da distribuição.

1.4.1.4 Modos de Separação

Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica são possíveis em eletroforese capilar: fronteira móvel, zona, isotacoforese, focallização isoeletrica e em gel (BAKER, 1995; Skoog, 2002; TAVARES, 1996). No entanto, na presente dissertação, será discutida apenas a eletroforese capilar de zona, pois esse foi o modo de eletroforese utilizado.

1.4.1.4.1 Eletroforese Capilar de Zona

A eletroforese capilar de Zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*) é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados devido à simplicidade do equipamento e maior facilidade da otimização das condições experimentais (TAVARES, 1996). Na CZE, a migração das espécies ocorre pela combinação dos efeitos do fluxo eletroosmótico e eletroforético, que são gerados quando o campo elétrico é aplicado. Com isso, os diferentes compostos iônicos da mistura migram de acordo com a sua própria mobilidade e separam em zonas.

1.4.2 Cromatografia à Gás (*GC do inglês Gás Chromatography*)

A cromatografia à gás é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido gasoso inerte (fase móvel) e um absorvente (fase estacionária), portanto os compostos a serem analisados têm que ser suficientemente voláteis para que possam ser transportados através do sistema contendo a coluna. A volatilidade do analito é um dos fatores limitantes para a aplicação da técnica. (FOWLIS, 1999). Algumas amostras precisam passar por uma etapa de derivatização antes de serem analisados por GC, como é o caso dos ácidos graxos de cadeia longa, que são convertidos em ésteres metílicos. O objetivo da derivatização é aumentar a volatilidade desses analitos.

Na cromatografia à gás, a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel ou gás de arraste. Esse fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. Esta separação depende da interação de cada analito com a fase estacionária (quanto maior a interação do analito, mais lentamente ele caminha pela coluna) e pela volatilidade (mais volátil será a substância quanto maior for a pressão de vapor), maior sua tendência de permanecer vaporizada e mais rapidamente caminha pelo sistema.

As substâncias separadas saem da coluna arrastadas pelo gás de arraste e passam por um detector (dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído). O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a

análise qualitativa e quantitativa. A figura 6 mostra um diagrama esquemático da instrumentação para GC.

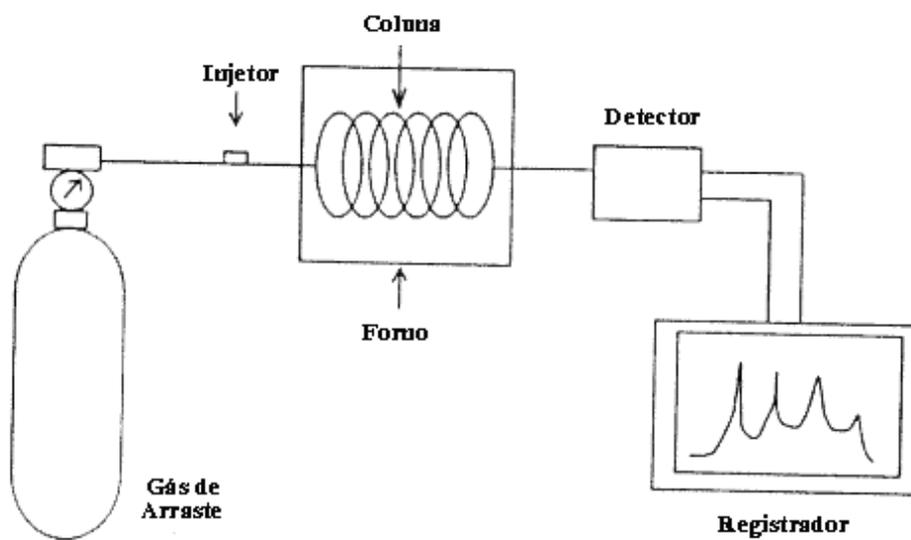


Figura 6: Diagrama esquemático de um cromatográfico a gás.

2. OBJETIVO

O objetivo geral dessa dissertação foi a otimização de uma metodologia alternativa para análises de ácidos graxos em braquiárias ruziziensis. Tendo como objetivo específico avaliar a técnica de eletroforese capilar como método alternativo à cromatografia a gás para análise do perfil de ácidos graxos de gramíneas, devido à facilidade de instrumentação, rapidez no preparo da amostra (já que não é necessária a etapa de metilação), menor consumo de reagentes e redução no tempo de análise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções para CE

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, MA, USA). Solventes como metanol e ACN foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), 1-octanol da Fluka (Germany). Os reagentes Brij 35 e SDBS foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os padrões de ácido tridecanóico (C13:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1 cis-9), e ácido linoléico (C18:2 cis-9 cis-12) e o ácido α -linolênico (C18:3 cis-9 cis-12 cis-15) foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Soluções estoques dos componentes do eletrólito foram preparadas com concentração de 100,0 mmol L⁻¹, exceto o Brij 35, que a solução estoque foi preparada com concentração de 50,0 mmol L⁻¹. Tanto as soluções dos tampões fosfato quanto a solução de Brij 35 foram mantidas sob refrigeração (5°C) para evitar a formação de mofo.

Soluções estoques individuais dos ácidos graxos foram preparadas em metanol na concentração de 30,0 mmol L⁻¹ e estocadas em freezer até o momento das análises. Mistura de padrões na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ foi preparada no dia da injeção a partir da diluição adequada dos estoques em metanol.

3.2 Reagentes e soluções para GC

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, MA, USA). Reagentes com grau analítico: cloreto de amônia, metanol, ácido sulfúrico e éter de petróleo.

Utilizou-se gás de arraste hidrogênio ultra puro (99,999%) para coluna capilar e gases auxiliares para o FID: nitrogênio, hidrogênio (pureza 99,999 %) e ar super seco (livre de hidrocarbonetos).

Padrões de referência: mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos ou padrões individuais com os seguintes ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) 13:0, FAME 16:0, FAME 18:0, FAME 18:1 cis-9, FAME 18:2 cis-9, cis-12, FAME 18:3 cis-9, cis-12, cis-15 foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.3 Instrumentação

3.3.1 Eletroforese Capilar

Os experimentos foram realizados nos equipamentos de eletroforese capilar da (Beckman Coulter, modelo MDQ fabricado na Bélgica) disponível na Embrapa Gado de Leite localizada na cidade de Juiz de Fora, equipado com DAD (diode array detection), comprimento de onda em 224nm, temperatura controlada por líquido refrigerante, (capillary cartridge coolant), no interior do cartucho em 25°C e aquisição dos dados em um software (32Karat 8.0) e em um outro equipamento de eletroforese capilar da (Agilent Technologies, modelo HP3D CE; Palo Alto, CA, USA) disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com DAD (diode array detection), comprimento de onda em 224nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C por ar forçado e aquisição e tratamento dos dados em software (ChemStation Version A.06.01). Capilar de sílica fundida revestido externamente com teflon (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), com comprimento total de 50,0 cm e comprimento efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento da Beckman e com comprimento total de 48,5 cm e comprimento efetivo de 40,0cm no equipamento da Agilent. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a uma pressão de 0,2 psi o que é equivalente a 12,5 mbar por 4 segundos, conversão necessária devida a diferença de unidade usada nos aparelhos, pois no equipamento da Beckman a pressão é registrada em psi e no da Agilent em mbar. O sistema eletroforético foi operado em polaridade normal e voltagem constante de +19 kV.

3.3.3 Cromatografia a Gás (GC)

O equipamento utilizado para análise das amostras de braquiárias foi um cromatográfico à gás Shimadzu (modelo GC 17A), com detector de ionização de chama (FID - Flame Ionization Detector) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária composta por cyanopropylpolysiloxano (CP-7420™, 60 m x 0,32 mm id, 0.25 µm espessura do filme – Varian, USA), disponível na unidade da Embrapa Agroindústria de Alimentos em Guaratiba, Rio de Janeiro. As condições de análise foram: temperatura da coluna mantida isotermicamente a 200 °C, temperatura do injetor e detector mantida a 280°C;

gás de arraste hidrogênio ultra puro a 2,4 mL/min a 40 °C e pressão de 170kPa exercida na coluna (AOCS Ce1h-05, 2005).

3.4 Preparo das amostras

3.4.1 Etapa de liofilização

As amostras de braquiárias foram coletadas no campo experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco (MG). Para que essas amostras fossem armazenadas para análise foi necessário a liofilização, que consiste na remoção do vapor de água diretamente das amostras congeladas por 24 horas a uma temperatura de – 80°C e em seguida colocadas no liofilizador, pois dentro deste as amostras ficam submetidas a vácuo. Este processo de desidratação apresenta algumas vantagens sobre os demais métodos, pois ele permite que a amostra permaneça com suas propriedades inalteradas. A liofilização permite que as amostras posteriormente sejam moídas (moinho de facas dotadas de peneiras com perfurações de 1 mm) e armazenadas por um período de tempo mais longo sem que ocorra perda em suas propriedades químicas.

3.4.2. Métodos de Extração

A extração da fração lipídica é uma etapa importante em estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais dos mais diversos tipos de alimentos (leite, manteiga, requeijão, ovo, carne entre outros).

Com base na literatura, sabemos que, as braquiárias contêm de 2 a 3% de lipídeos totais e desses 40 a 50% são formados por ácidos graxos. Logo teremos de 1 a 1,5% de ácido graxo sobre a massa seca total, ou seja, uma concentração muito pequena de lipídeos sobre a amostra já liofilizada. Por isso, foi necessário a otimização do método para extração da fração lipídica da braquiária para que os ácidos graxos pudessem ser analisados.

Existem diversos procedimentos para extração de lipídeos, porém todos têm em comum a utilização de solventes orgânicos. Os procedimentos mais utilizados incluem as metodologias de extração em que se empregam misturas de solventes orgânicos apolares e polares. Isto se deve ao fato dos lipídeos terem uma grande faixa de relativa hidrofobicidade o que torna inviável a utilização de um único solvente para a extração dos lipídeos. Lipídeos

neutros como os triacilgliceróis estão ligados através de interação fracas (força de van der Waals) e são facilmente extraídos com solventes apolares, enquanto que os lipídeos polares como os fosfolípidios estão ligados por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Logo, para uma extração eficiente desses lipídeos temos que utilizar solventes polares capazes de romper essas interações.

Um estudo crítico foi realizado utilizando três métodos de extração com o objetivo de se obter o melhor método de extração da parte lipídica, sendo eles: Método de Hara e Radin com adaptação; Micro Folch e Bligh e Dyer com adaptação.

Os métodos de Hara e Radin (1978), Bligh e Dyer (1959) e Folch (1957) são conhecidos como métodos de extração a frio (temperatura ambiente), quando comparado com o método de Soxhlet (1879), onde é empregado calor no processo o que pode levar as oxidações dos ácidos graxos poliinsaturados. Outra preocupação quanto ao processo de extração é a toxicidade dos solventes; os métodos de Folch (1957) e Bligh e Dyer (1959) são eficazes na extração de lipídios totais, principalmente os polares, mas apresentam uma alta toxicidade nos solventes envolvidos no processo de extração. Sabe-se que a inalação do metanol é tóxica a concentrações elevadas (acima de 2.000 ppm), pois provoca irritação das membranas mucosas do trato respiratório e pode causar efeitos sistêmicos. O clorofórmio também é tóxico; sua inalação causa irritação na pele, olhos e trato respiratório, pode afetar o sistema nervoso central, rins, fígado e o sistema cardiovascular. Dependendo do nível de concentração e duração a exposição pode causar câncer. A mistura de hexano e isopropanol tem se mostrado adequada na substituição de clorofórmio e metanol, pois apresentam uma toxicidade bem menor (Radín, 1981) e durante a separação das fases, a fase orgânica contendo os lipídios fica na parte superior, ao contrário da mistura clorofórmio e metanol, onde a fase orgânica fica na parte inferior, o que torna a recuperação da fase orgânica propensa a contaminações provenientes da fase aquosa.

As proporções dos reagentes referentes a cada metodologia foram: Folch (1957) utiliza uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção 2:1 (v/v); Bligh e Dyer (1959) é uma versão simplificada do procedimento clássico proposto por Folch utilizando a água também como solvente, em uma proporção 1:2:0,8 (v/v) respectivamente de clorofórmio, metanol e água; e Hara e Radin utiliza o hexano e o isopropanol em uma proporção 3:2 (v/v).

3.4.3 Preparo das amostras para análise em CE

Tendo em mãos a fração lipídica extraída das braquiária, a próxima etapa para análise em CE é a etapa de saponificação, uma vez que a fração lipídica que contém os ácidos graxos em sua composição é saponificável (glicerídeos, ceras, fosfolipídeos, esfingolipídeos, glicolipídeos, etc). Nessa etapa é adicionado 2,0 mL de solução de NaOH/MeOH (0,5 mol L⁻¹), pois ácidos graxos encontrados em óleo e gorduras estão, predominantemente, na forma de triacilglicerídeos. No entanto, os ácidos graxos são analisados por CE na sua forma livre, ou seja, sem estarem ligados ao glicerol, e carregados negativamente. Para que isso ocorra é necessário promover a hidrólise dos glicerídeos para a formação de sais de ácidos graxos. Tal reação, como exemplifica o esquema da Figura 7, consiste em uma hidrólise alcalina (saponificação), onde há adição aos glicerídeos de uma base (normalmente solução de NaOH preparada em MeOH), em um banho térmico com temperatura controlada de 75-80°C sob refluxo contínuo em haste de vidro, resultando na formação de glicerol e sais de ácidos graxos (MORRISON & BOYD, 1981). O esquema pode ser visto na figura 8.

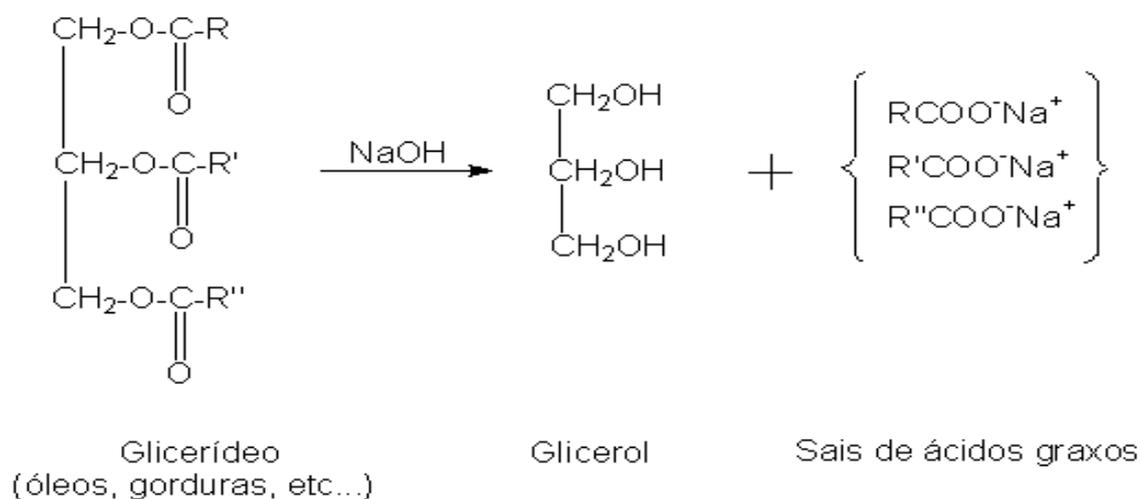


Figura 7: Figura para reação de hidrólise básica dos glicerídeos.
Fonte: MORRISON & BOYD, 1981.

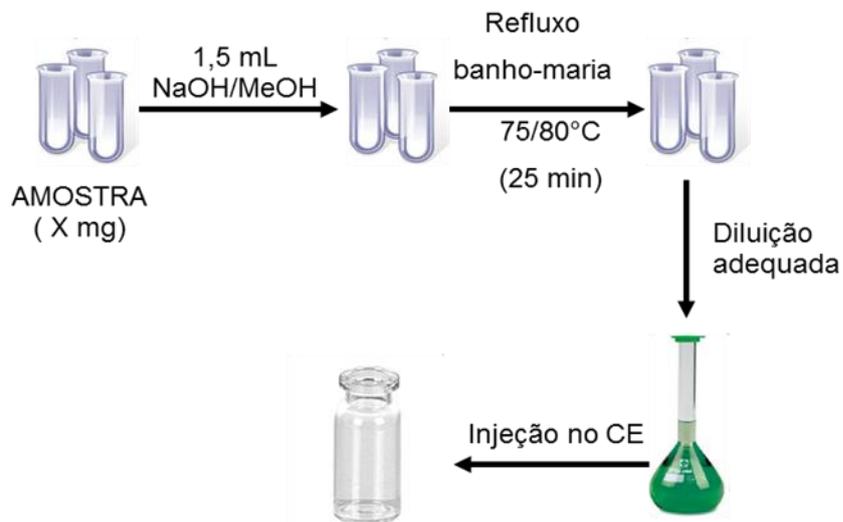


Figura 8: Esquema representativo do processo de saponificação das amostras.

3.4.4 Preparo das amostras para análise por GC

O preparo da amostra e análise cromatográfica foi realizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos em Guaratiba, Rio de Janeiro. O procedimento do preparo da extração da amostra foi o mesmo realizado para a eletroforese Capilar.

Após o processo de extração, a fração lipídica fica retida no balão de fundo chato. Nesse próprio balão foi realizado o processo de metilação. Essa etapa consiste na adição de 2,5ml de potássia alcoólica. Em seguida, o balão posicionado em uma manta de aquecimento é conectado a um condensador. Durante o processo, quando se observa que a água começa a refluxar, é necessário a permanência por um período de 4 minutos. Após 4,0 minutos, o sistema é deixado em esfriando em presença do condensador (aproximadamente 3 minutos). Em seguida, adiciona-se 7,5 mL da solução de esterificação e deixa em refluxo por 3 minutos após a visualização do condensamento do solvente. Desligar a manta e deixar esfriar na presença do condensador. Transferir o conteúdo do balão para um funil de separação de 250 mL. Lavar o balão com 15mL de éter etílico PA e transferir para o funil; lavar o balão com 25 mL de água destilada e transferir para o funil. Agitar a solução no funil de separação, para que ocorra o contato entre as fases. Esperar até que as duas camadas dos líquidos se separem e fiquem límpidas. Descartar a fase aquosa, sempre deixando 1cm abaixo da interface para evitar perda de fase etérea. Lavar o extrato etéreo com 10mL de água por três vezes. Descartar o máximo possível de fase aquosa. Filtrar a fase etérea, através de sulfato de sódio (ou

magnésio) anidro PA, para um balão de fundo redondo de 50mL previamente tarado. Lavar o funil de separação e o papel de filtro com éter etílico, para recuperação total dos ésteres metílicos. Evaporar o solvente em um rota evaporador. Adicionar 0,5 a 1mL de acetona e passar sob corrente de nitrogênio, mantendo o balão em contato com água morna. Pesar o FAME e diluir com diclorometano PA. Transferir o conteúdo do balão para um vial para ser injetado no cromatográfico. A figura 9 mostra o esquema do processo de metilação descrito.

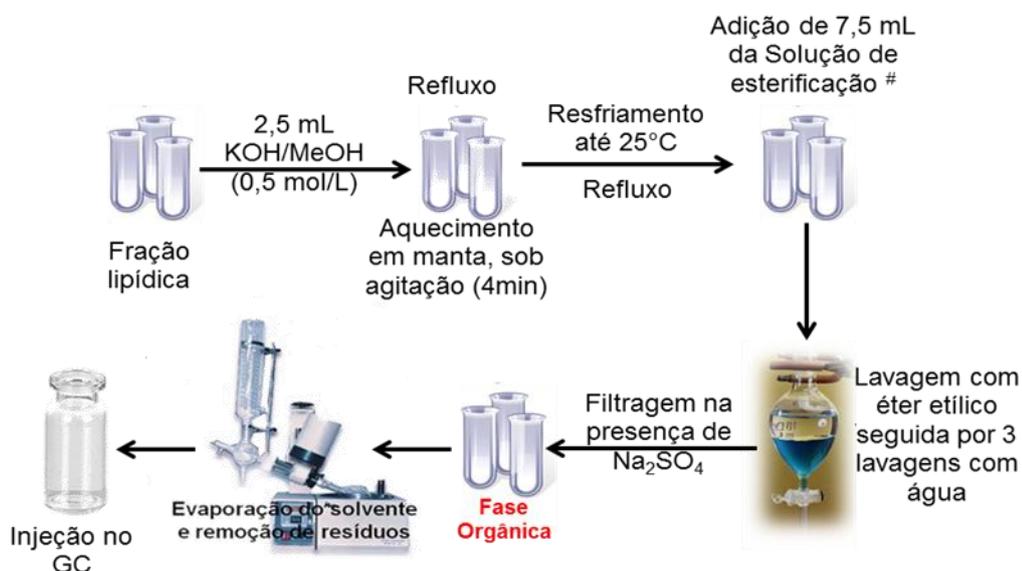


Figura 9:Esquema representativo do processo de metilação da fração lipídica após a etapa de extração.

As soluções de potássia alcoólica e do reagente de esterificação já estavam preparadas. Contudo, segue abaixo o procedimento (pop) para o preparo destas soluções.

#Preparo da solução de potássia alcoólica (0,5mols/L): Pesar em um béquer 14g de hidróxido de potássio em lentilhas, transferir para um almofariz de porcelana. Triturar rapidamente com vigor, utilizando bastão de porcelana, para obter um pó fino. Transferir o pó para um béquer de 1L. Adicionar uma proveta de 500 mL de metanol. Lavar o almofariz com a ajuda de um bastão, com porções de metanol e transferir para um béquer. Adicionar o restante do metanol ao béquer e mexer com bastão de vidro até dissolver o pó.

#Preparo do reagente de esterificação: Em um balão de fundo redondo de 250 – 500 mL, colocar 120 mL de metanol com uma proveta, utilizando funil para sólidos. Adicionar cuidadosamente 4 g de cloreto de amônio, utilizando outro funil e depois cuidadosamente,

adicionar 6 mL de ácido sulfúrico concentrado com pipeta. Colocar o balão em uma manta aquecedora, conectar com condensador e refluxar a mistura por 15 minutos, após a condensação de solvente. Misturar ocasionalmente, até que o pó seja solubilizado. Deixar esfriar no condensador, transferir o conteúdo para um frasco rotulado de plástico.

Os compostos foram identificados por meio de comparação dos valores do tempo de retenção dos analitos com os dos padrões levando em consideração o padrão interno FAME 13:0. O fator de resposta adequado foi obtido por meio da conversão da área de cada FAME em função do percentual massa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Considerações gerais para análise de ácidos graxos de cadeia longa por eletroforese capilar

Para otimizar a separação de ácidos graxos de cadeia longa por CE é necessário atentar para algumas características básicas destes analitos, tais como: baixa absorvância no ultravioleta (ácidos graxos saturados); $pK_a \approx 5$, semelhante ao de ácidos fracos; baixa solubilidade em água; além do fato de alguns ácidos graxos apresentarem mesmo comprimento de cadeia equivalente ($CCE = n^\circ \text{ átomos de carbono} - 2 \cdot n^\circ \text{ de duplas ligações}$). Logo, a análise para estes constituintes é realizada principalmente, sob fluxo normal (fluxo eletrosmótico na direção do anodo para catodo) em modo contra-eletrosmótico (mobilidades eletrosmótica e eletroforética na mesma direção, porém em sentidos contrários) mediante o uso de tampões alcalinos que mantenham o pH do eletrólito acima do pK_a das espécies para garantir que todas elas estarão na forma de ânions, onde os ácidos graxos com cadeias maiores eluem primeiro, sob detecção indireta por UV e com auxílio de aditivos ao eletrólito de corrida, como por exemplo dimetil e trimetil beta ciclodextrinas, as quais atuam como seletor de homólogos cis. A ordem de eluição dos ácidos graxos é de acordo com a relação carga da espécie/tamanho. Sabendo que todos os ácidos analisados neste trabalho são monocarboxílicos e, portanto apresentam apenas uma carga negativa oriunda do grupo $R-COO^-$, a mobilidade eletroforética será caracterizada apenas pelos diferentes tamanhos dos ácidos graxos, uma vez que a carga para todos eles será a mesma. A mobilidade resultante entre analito e fluxo eletrosmótico é chamada de mobilidade observada ou aparente (μ_{ap} ou μ_{obs}), obtida pela soma vetorial (equação 3) entre mobilidade eletroforética e mobilidade eletrosmótica. Logo, para análise de espécies negativamente carregadas que migram em contra fluxo, as μ_{ef} e μ_{EOF} estão em sentidos contrários e, portanto, o vetor resultante (μ_{ap}) é a diferença entre eles resultando na migração no mesmo sentido do vetor de maior valor (μ_{ef} ou μ_{EOF}).

$$\vec{\mu}_{ap} = \vec{\mu}_{ef} + \vec{\mu}_{eof} \quad (3)$$

Os ácidos graxos de cadeia mais longa resistem menos ao fluxo eletrosmótico que os ácidos de cadeia mais curta, logo, ácidos de cadeia hidrocarbonada maior são “arrastados” mais facilmente pelo fluxo eletrosmótico, passando pelo detector mais rapidamente, como é ilustrado pela Figura 10.

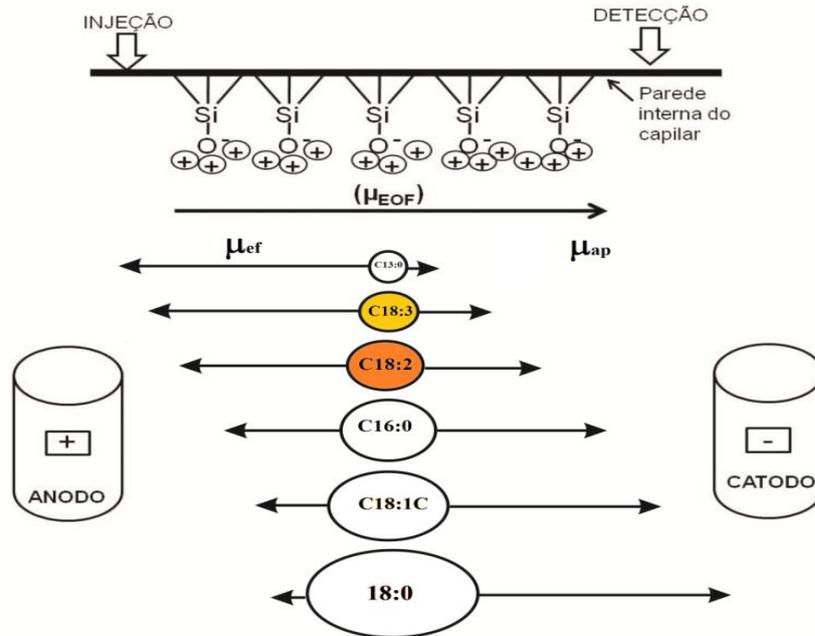


Figura 10: Figura esquemática representando o mecanismo de separação de AG de cadeia longa por eletroforese capilar de zona em modo contra-eletrosmótico.

4.2 Planejamento composto central rotacional (planejamento Estrela) para otimização do eletrólito

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo muito utilizada na otimização de sistemas contendo duas ou mais variáveis e que se deseja saber se ocorre interação entre essas variáveis. Os resultados obtidos por planejamentos fatoriais, muitas vezes, não seria possível de serem alcançados por métodos univariados ou, provavelmente, seria necessário um número maior de ensaios o que resultaria num tempo maior para a otimização do sistema. Além disso, o planejamento fatorial é um recurso elegante capaz de auxiliar no planejamento dos experimentos para a obtenção dos dados de forma organizada e sistemática. Entretanto, o sucesso de um planejamento fatorial dependerá do conhecimento

claro de seus objetivos e da maneira em que será estruturado e realizado. Logo, para executar um planejamento fatorial é necessário definir quais são os fatores relevantes para o sistema em questão e especificar os níveis em que cada fator será estudado. Dentro deste contexto, foi realizado um planejamento composto central rotacional com três fatores e triplicata no ponto central com o objetivo de selecionar o sistema de eletrólito capaz de promover a separação dos ácidos graxos de interesse. As variáveis selecionadas para o conjunto de experimento foram: Brij 35, n-octanol e acetonitrila, sendo que, o Brij 35 é um tenso ativo neutro que forma micelas com os ácidos graxos contribuindo com a separação entre homólogos cis-trans e saturados; o n-octanol atua como um co-surfactante auxiliando o brij 35 na atividade de separação; e a acetonitrila auxilia na solubilidade dos ácidos graxos no meio e impede que estes formem micelas entre si. Essas variáveis foram selecionadas com base no trabalho descrito por (De Castro *et al.*, 2010), onde as proporções utilizadas de Brij 35, n-octanol e acetonitrila foram, respectivamente, 8,0mmol L⁻¹, 1,5% v/v e 45% v/v. A tabela 1 mostra a matriz de contraste para o planejamento estrela com triplicata autêntica no ponto central, onde a codificação (-1) corresponde a valores do nível inferior, a (+1) aos valores do nível superior, o (0) aos valores do ponto central, (-1,618) ao valor do ponto axial inferior e (+1,6818) ao valor do ponto axial superior. Cabe ressaltar que os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Demais variáveis como: voltagem, dimensões do capilar, comprimento de onda, temperatura do cartucho, concentração do tampão e SDBS (cromóforo) foram mantidas constantes. Os experimentos realizados para a otimização do eletrólito foram realizados no equipamento de CE da Beckman.

Tabela 1:Matriz de contraste do planejamento composto central rotacional com três fatores e triplicata no ponto central.

Exp.	Brij 35 (mmol L⁻¹)	n-octanol (%v/v)	ACN (%)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,6818	0	0
10	1,6818	0	0
11	0	-1,6818	0
12	0	1,6818	0
13	0	0	-1,6818
14	0	0	1,6818
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Brij 35: (-1): 9,0 mmol L⁻¹, (0): 10,0 mmol L⁻¹, (1): 11,0 mmol L⁻¹, (- 1,6818): 8,3 mmol L⁻¹, (1,6818): 11,7 mmol L⁻¹
n-octanol: (-1): 1,8%, (0): 2,0%, (1): 2,2%, (- 1,6818): 1,7%, (1,6818): 2,3%
Acetonitrila: (-1): 44,0%, (0): 45,0%, (1): 46,0%, (- 1,6818): 43,3%, (1,6818): 46,7%

As figuras 11 e 12 mostramos eletroferogramas obtidos na execução do planejamento composto central rotacional com três fatores e triplicata no ponto central.

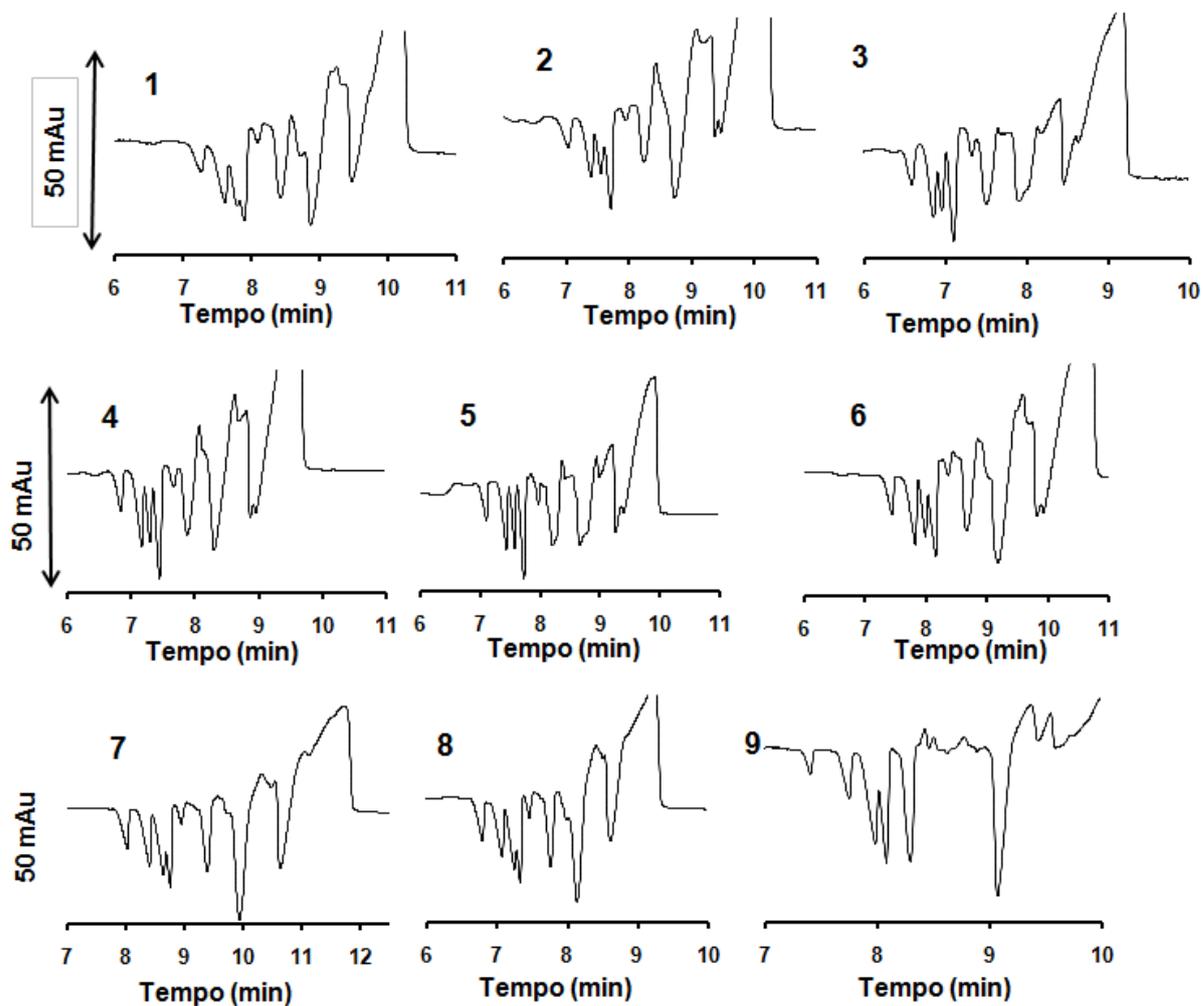


Figura 11: Eletroferogramas de padrões a uma concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada: 1-C18:0, 2-C18:1c, 3-C16:0, 4-C18:2, 5-C18:3, 6-C14:0, 7-C13:0 e 8-C12:0. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C , detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, $75\mu\text{m}$ de diâmetro interno e $375 \mu\text{m}$ de diâmetro externo.

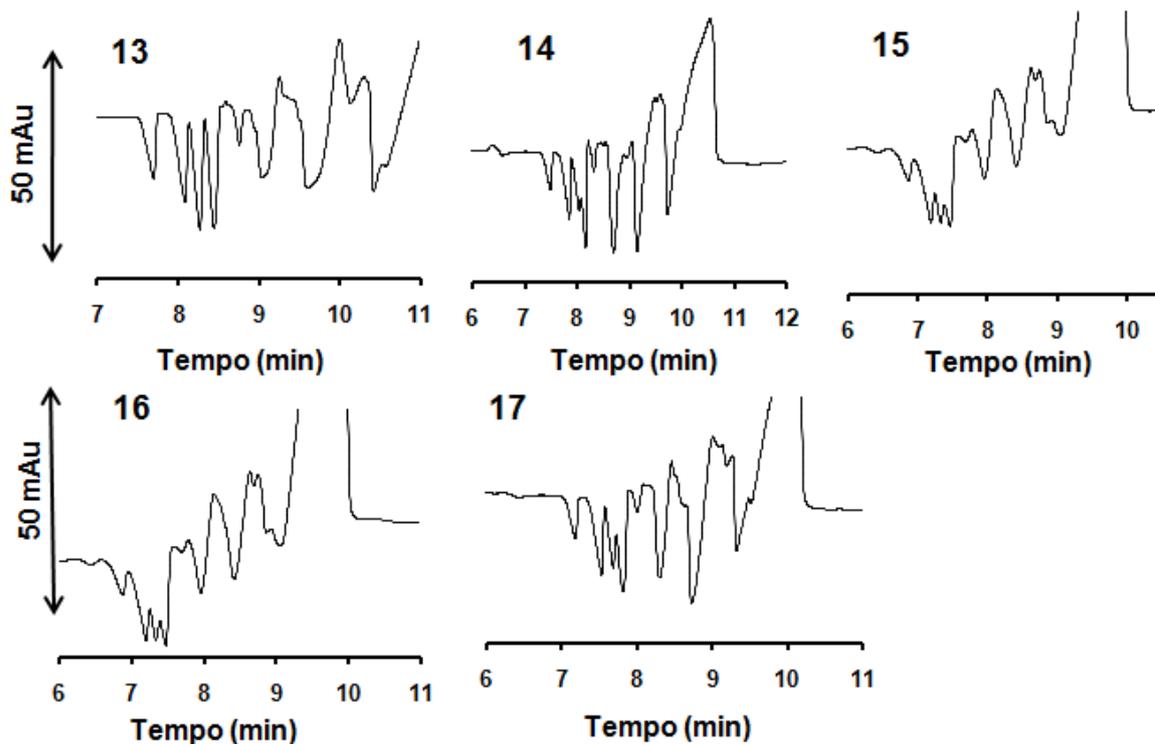


Figura 12: Eletroferogramas de padrões a uma concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada: 1-C18:0, 2-C18:1c, 3-C16:0, 4-C18:2, 5-C18:3, 6-C14:0, 7-C13:0 e 8-C12:0. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C , detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, $75\mu\text{m}$ de diâmetro interno e $375 \mu\text{m}$ de diâmetro externo no equipamento.

A análise dos eletroferogramas mostrados nas figuras 11 e 12 em conjunto com a tabela 1, pode-se notar que os eletroferogramas dos experimentos 5 e 13 apresentam uma melhor separação entre o par crítico (C16:0/C18:2, picos 3 e 4), o que no presente caso evidencia um possível efeito da acetonitrila frente a níveis constantes de brij 35 e n-octanol. No entanto, observa-se que no experimento 1 (-1,-1,-1), o qual também apresenta nível baixo de Brij 35 e de n-octanol como no experimento 5 (-1,-1,1), mas nível alto de ACN, o comportamento do eletroferograma é muito instável, evidenciando que a ACN afeta negativamente o perfil de separação quando fixada em nível alto. Contudo, quando os níveis de Brij 35 e o n-octanol foram fixados no ponto central e a acetonitrila no nível axial inferior (0,0,-1,6818), ou seja, o experimento 13, ocorreu à separação aceitável do par crítico. Foi calculada a resolução do par crítico em cada eletrolito de experimento, conforme a equação 4, os resultados estão mostrados na tabela 2. Para que a separação seja considerada completa e a

quantificação dos analitos não seja *sub* ou *superestimada*, a resolução entre os picos deve ser no mínimo 1,50. Logo, as condições do eletrólito do experimento 13 foram selecionadas como ótimo, pois foi o resultado mais próximo de 1,50.

$$R_{S_{A/B}} = \frac{2(tr_B - tr_A)}{(W_A + W_B)} \quad (12)$$

onde: t é o tempo de migração e W é a meia altura dos picos

Tabela 2: Cálculo da resolução do par crítico (C16:0/C18:2).

Eletrólito	tC16:0	wC16:0	tC18:2	wC18:2	RC16:0/C18:2
Eletrólito 01	7.63	0.1	7.73	0.09	1.052631579
Eletrólito 02	7.377	0.11	7.489	0.12	0.973913043
Eletrólito 03	7.43	0.11	7.54	0.1	1.047619048
Eletrólito 04	7.052	0.1	7.177	0.135	1.063829787
Eletrólito 05	8.16	0.11	8.26	0.09	1
Eletrólito 06	7.258	0.1	7.347	0.09	0.936842105
Eletrólito 07	8.3	0.11	8.41	0.11	1
Eletrólito 08	7.338	0.11	7.448	0.095	1.073170732
Eletrólito 09	7.94	0.1	8.05	0.09	1.157894737
Eletrólito 10	7.324	0.1	7.433	0.105	1.063414634
Eletrólito 11	7.198	0.1	7.287	0.08	0.988888889
Eletrólito 12	8.47	0.15	8.61	0.14	0.965517241
Eletrólito 13	6.564	0.08	6.666	0.095	1.165714286
Eletrólito 14	7.74	0.115	7.832	0.085	0.92
Eletrólito 15	7.45	0.1	7.56	0.1	1.1
Eletrólito 16	7.151	0.09	7.245	0.09	1.044444444
Eletrólito 17	7.49	0.1	7.59	0.09	1.052631579

Contudo, cabe ressaltar que quando foram realizados os experimentos para a seleção do melhor eletrólito não se tinha idéia do aspecto do eletroferograma que seria obtido para a

mistura de padrões contendo os ácidos graxos considerados majoritários na amostra de braquiária. No entanto, após a realização dos experimentos, pôde-se perceber que o C14:0 e o C12:0 apresentavam coeluição com a perturbação do sistema (figura 13 letra A). Entretanto, como esses dois ácidos graxos não estão associados com os precursores de CLA, estes foram desconsiderados para efeito de quantificação. Logo, a Figura 13 letra B mostra que o perfil de separação dos ácidos graxos de interesse na amostra de braquiária, ou seja, C18:3, C18:2 e C16:0, apresentou resultado satisfatório para considerações quantitativas.

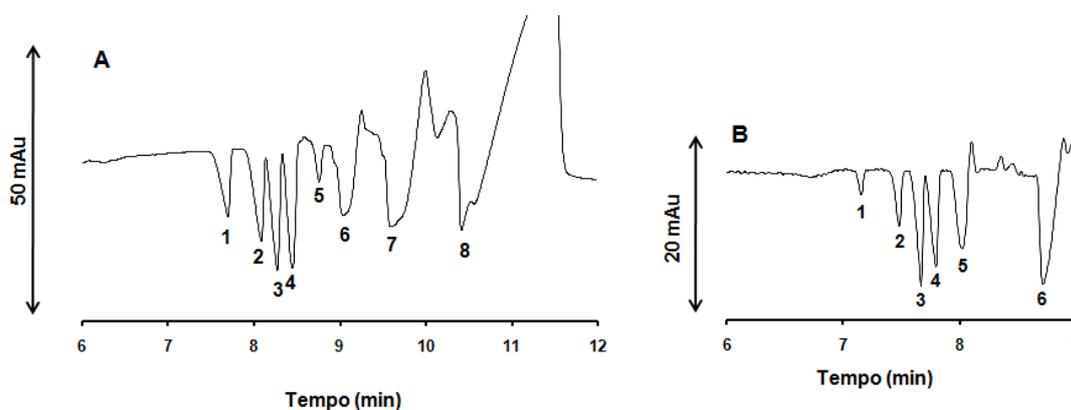


Figura 13: Eletroferogramas do eletrólito (experimento 13) escolhido como melhor com os padrões a uma concentração de 0,5 mmol L⁻¹, onde temos: 1-C18:0, 2-C18:1c, 3-C16:0, 4-C18:2, 5-C18:3, 6-C14:0, 7-C13:0 e 8-C12:0. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

4.3 Otimização do Método de Extração

Foi realizado estudo preliminar envolvendo três métodos de extração descrito na literatura com potencial para extrair a fração lipídica das braquiárias. Os métodos estudados foram: Método de Hara & Radin, Folch e Bligh & Dyer.

Como procedimento padrão, para todos os métodos de extração analisados (Hara & Radin, Micro Folch e Bligh & Dyer), as amostras foram liofilizadas, moídas, mantidas no freezer a uma temperatura -20 °C, para evitar possíveis oxidações.

4.3.1 Extração Hara & Radin (Adaptado)

O procedimento consistiu em pesar 1,0 g de amostra no tubo de Falcon de 50,0 mL adicionar 8,0 mL de isopropanol PA e agitar por 2,0 minutos no vortex a uma velocidade máxima. Adicionar 12,0 mL de hexano PA por 2,0 minutos a uma velocidade máxima. Filtrar a solução, usando um papel de filtro em outro tubo de Falcon de 50,0 mL, utilizando uma solução de 3:2 hexano/isopropanol sobre a amostra que fica retida no filtro e ao mesmo tempo lavando o respectivo papel a fim de remover possíveis ácidos graxos retidos no mesmo. Adicionar 6,0 mL da solução de sulfato de sódio (1,0 g Na_2SO_4 / 15,0 mL de água destilada), agitar por 2,0 minutos no vortex e deixar a solução descansar para visualizar a separação das fases. Retirar com o auxílio de uma pipeta a fase orgânica que se encontra na fase superior e transferir para um balão de rota vapor. Evaporar o solvente no rota vapor a uma temperatura de 40 °C ou deixar dentro da capela ligada de um dia para outro. Adicionar 0,5 a 1,0 mL de acetona e passar sob a corrente de nitrogênio mantendo o balão em contato com a palma da mão, para que ocorra troca de calor. Adicionar 2,0 mL de NaOH 0,5 mol L^{-1} /metanol para saponificação. Conectar o balão a uma haste de vidro de 1,5 m com a função de um condensador, deixando no banho Maria a uma temperatura de 70 a 75 °C por 25,0 minutos. Filtrar a solução no balão de 5,0 mL e completar o volume com metanol.

Os eletroferogramas da figura 14 representam respectivamente: massa pesada de 1ge 3 minutos de agitação no vortex no eletroferograma A e o B representa massa de 1,5ge 2 minutos de agitação no vortex.

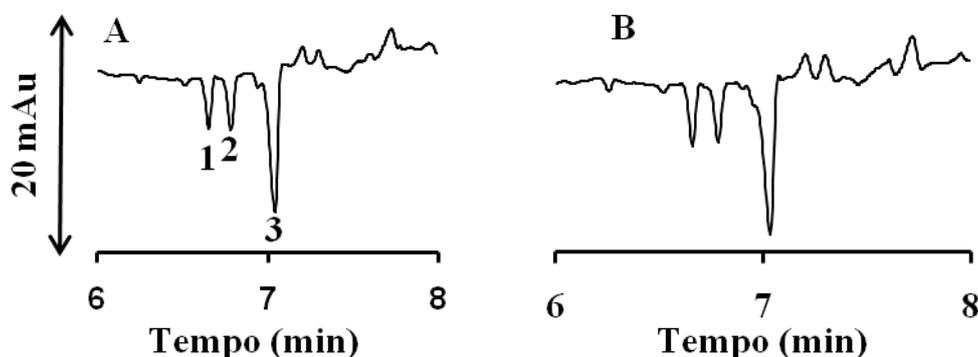


Figura 14: 1-C18:0; 2-C18:1c; 3-C16:0; 4-C18:2; 5-C18:3. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

4.3.2 Extração Micro-Folch

O procedimento consistiu em pesar 100,0 mg de amostra no tubo de Falcon de 15,0 mL, adicionar 1,2 mL da solução 2:1 clorofórmio/metanol e agitar no vortex por 3,0 minutos, adicionar 0,4 mL de metanol e agitar por 3,0 minutos no vortex. Filtrar a solução, usando um papel de filtro em outro tubo de Falcon de 15,0 mL, utilizando uma solução de 2:1 clorofórmio/metanol sobre a amostra que fica retida no filtro e ao mesmo tempo lavando o respectivo papel a fim de remover possíveis ácidos graxos retidos no mesmo. Adicionar 0,8 mL de clorofórmio, adicionar 1,90 mL da solução de NaCl 0,73% e agitar por 2,0 minutos e deixar a solução descansar para visualizar a separação das fases. Transferir a fase inferior para um tubo de rota vapor. Evaporar o solvente no rota vapor a uma temperatura de 40 °C ou deixar dentro da capela ligada de um dia para outro. Adicionar 0,5 a 1,0 mL de acetona e passar sob a corrente de nitrogênio mantendo o balão em contato com a palma da mão, para que ocorra troca de calor. Adicionar 2,0 mL de nabo 0,5 mol/L/metanol para saponificação, colocar o balão conectado a uma haste de vidro de 1,5 m para fazer o papel de um condensador, deixando no banho Maria a uma temperatura de 70 a 75 °C por 25,0 minutos. Filtrar a solução no balão de 5,0 mL e completar o volume com metanol. Os eletroferogramas da figura 15 mostram a variação no método de Folch, indicando a extração 1, 2 e 3 respectivamente.

* extração Micro Folch 1 = massa de 50 mg e diluição de 1/10

* extração Micro Folch 2 = massa de 100 mg e diluição de 1/10

* extração Micro Folch 3 = massa de 150 mg e diluição de 1/10

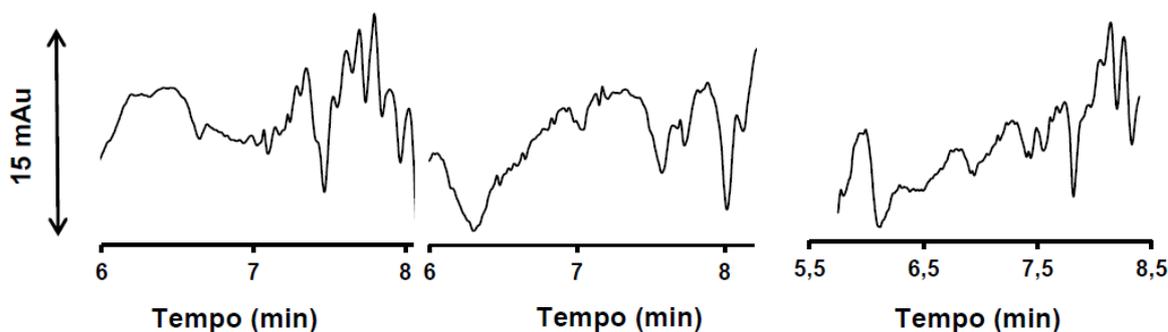


Figura 15: Eletroferogramas da extração Micro Folch com as variações da massa. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

Os eletroferogramas não evidenciaram a confirmação de nenhum pico. Além disso, os resultados qualitativos confirmam a impossibilidade de uso na metodologia, pois gera grande instabilidade na linha base dos eletroferogramas.

4.3.3. Extração de Bligh e Dyer (Adaptado)

O procedimento consistiu em pesar 1 g de amostra no tubo de Falcon de 50,0 mL, adicionar 10 mL de uma solução de 2:1 clorofórmio/metanol e agitar no vortex por 10,0 minutos. Adicionar 5mL de clorofórmio e 5 mL da solução de sulfato de sódio (1,0 g Na_2SO_4 /15,0 mL de água destilada), agitar no vortex por 2,0 minutos e deixar a solução descansar para visualizar a separação das fases. Remover a fase inferior para um balão de rota vapor, através de um funil pequeno com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. Evaporar o solvente no rota vapor a uma temperatura de 40 °C ou deixar dentro da capela ligada de um dia para outro. Adicionar 0,5 a 1,0 mL de acetona e passar sob a corrente de nitrogênio mantendo o balão em contato com a palma da mão, para que ocorra troca de calor. Adicionar 2,0 mL de NaOH 0,5 mol/L em metanol para saponificação, colocar o balão conectado a uma haste de vidro de 1,5 m para fazer o papel de um condensador, deixando no banho Maria a uma temperatura de 70 a 75 °C por 25 minutos. Filtrar a solução no balão de 5,0 mL e completar o volume com metanol.

A figura 16 mostra os eletroferogramas obtidos no processo de extração de Bligh & Dyer. Foram realizados dois processo de extração variando a massa de 0,500g para 1g de amostra de braquiária e dois processo de diluição, ou seja, uma diluição de 1/10 e uma diluição de 1/15, onde o primeiro eletroferograma representa a massa de 0,500g, o segundo 1g e a diluição de 1/10 e o terceiro 1g e diluição de 1/15.

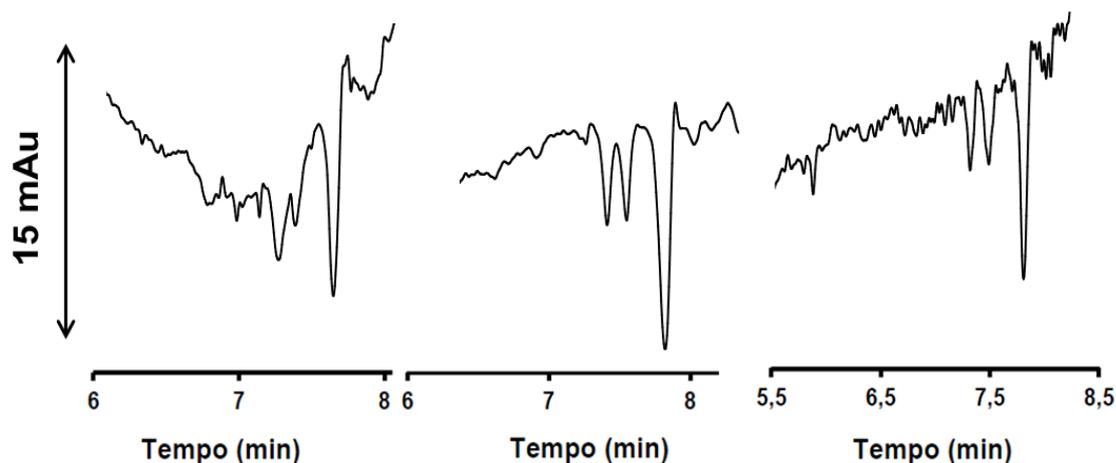


Figura 16: Eletroferogramas da extração Bligh e Dyer. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

Os eletroferogramas mostram que esse não é um bom método, pois apesar de aparecer de forma mais nítida os picos quando se aumenta a massa de amostra (da esquerda para direita) o perfil do eletroferograma não apresenta comportamento satisfatório.

Analisando todos os eletroferogramas mostrados dos processos de extração e fazendo uma análise qualitativa dos mesmos, pode-se concluir-se que o método de Hara & Radin foi o mais promissor para o processo de extração da fração lipídica dos ácidos graxos majoritários encontrados nas braquiárias. Logo, foi realizado um planejamento Box-Behnken 3^3 para o método de extração Hara & Radin para otimização do processo de extração. As variáveis selecionadas para o estudo do sistema foram: x1- massa pesada de amostra, x2- tempo de agitação da amostra no vortex e a x3- variação da proporção de hexano da mistura de solvente (hexano/isopropanol), como mostra a tabela 3. O parâmetro utilizado como resposta da escolha do método foi comparar os eletroferogramas de uma maneira qualitativa. O eletroferograma que apresentasse os ácidos graxos de interesse com uma boa resolução e um menor ruídos na corrida, indicaria uma melhor extração.

Tabela 3: Matriz de planejamento para um Box-Behnken 3³.

ENSAIO	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X₁= massa (g): (-1) 0,5 g; (0) 1,0 g; (1) 1,5 g

X₂= tempo (min): (-1) 1,0; (0) 2,0; (1) 3,0

X₃= solvente (hexano/isopropanol) (ml): (-1) 10,0/8,0; (0) 12,0/8,0; (1) 14,0/8,0

A variável massa foi escolhida pela relação diretamente proporcional entre massa de braquiária e concentração de ácido graxo. A variável tempo de agitação no vortex foi selecionada devido à relação da interação entre o solvente e a fração lipídica da amostra. E a variável volume da mistura de solvente foi selecionada devido sua função de extrair os lipídeos da parte apolar presente na fração lipídica, uma vez que a maior concentração de lipídeos se encontra na parte apolar. A figura 17 e 18 mostra todos os eletroferogramas obtidos para o planejamento Box-Behnken realizado.

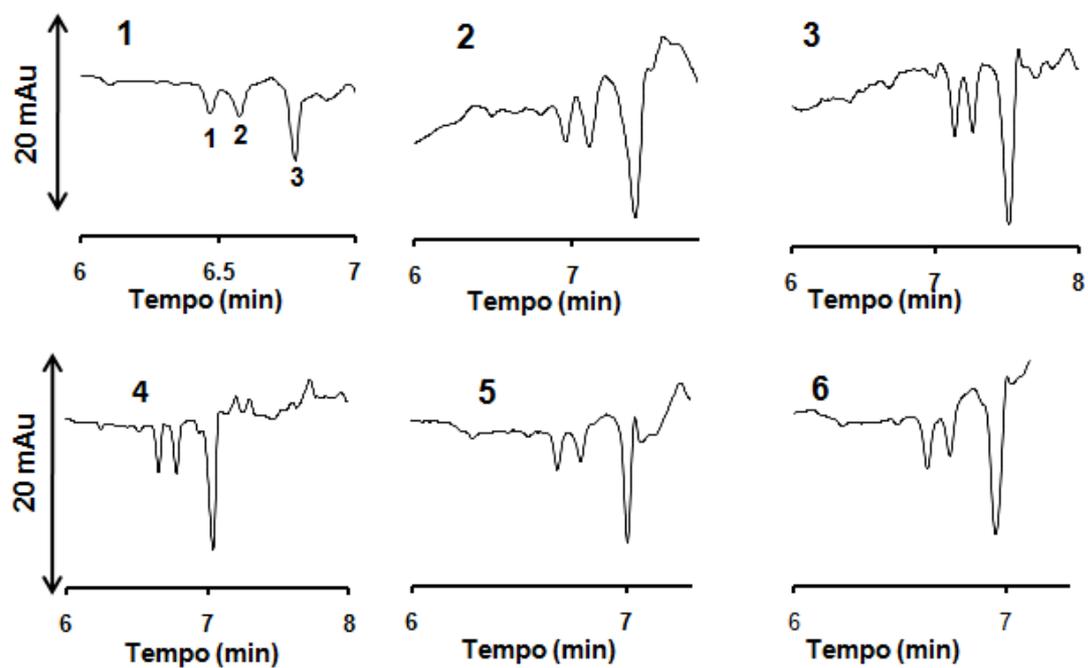


FIGURA 17: Os picos 1, 2 e 3 correspondem respectivamente aos ácidos graxos C16:0, C18:2 e C18:3 em todos os eletroferogramas. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

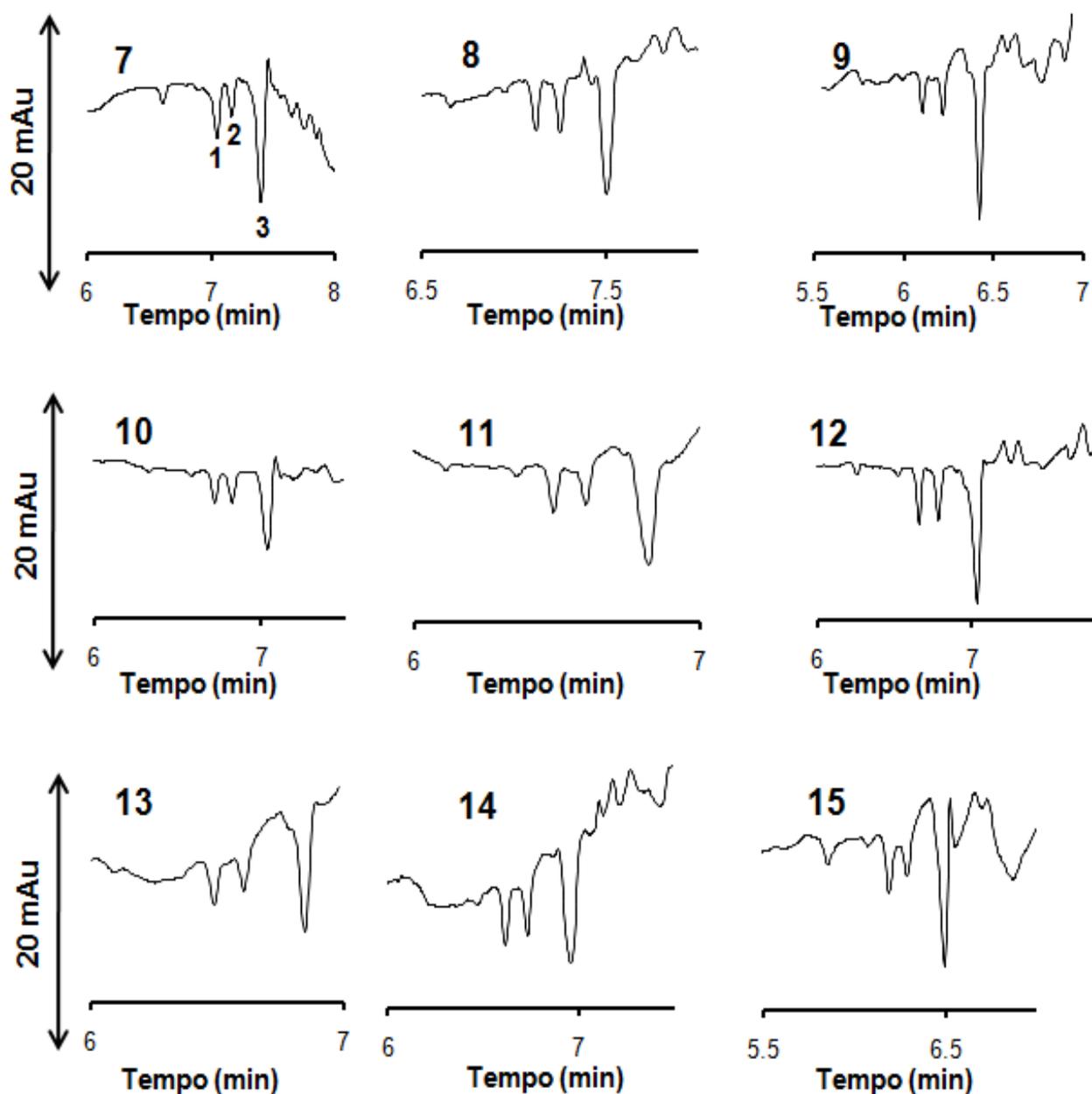


Figura 18: Os picos 1, 2 e 3 correspondem respectivamente aos ácidos graxos C16:0, C18:2 e C18:3 em todos os eletroferogramas. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

Analisando os dados sob uma ótica qualitativa, no experimento **4** (+1, +1, 0), **10** (0, +1, -1), e **12** (0, +1, +1) temos visivelmente uma melhor extração da parte lipídica, pois em

todos esses experimentos foi possível identificar os três ácidos graxos de interesse. O par crítico (16:0/C18:2) nesses experimentos apresentou uma resolução visivelmente acima de **1,5**, e estabilidade de linha base quando comparados aos demais. Nos experimentos 4, 10 e 12 temos o valor alto da variável **2**, que é o tempo de agitação no vortex, o que evidencia que quanto maior o tempo de interação do solvente com a amostra maior é a quantidade extraída. Dentro deste contexto, o experimento 12 foi selecionado como ótimo.

4.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS NA AMOSTRA DE BRAQUIÁRIA

4.4.1. Cálculos do Fator de resposta e verificação da Falta de Ajuste do Modelo

Para as considerações quantitativas dos ácidos graxos na amostra de braquiária, utilizou-se o conceito de fator de resposta. Para cálculo do fator de resposta, foi elaborada uma curva de calibração para cada ácido graxo em cinco níveis de concentração em replicatas autênticas com incremento de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$: 1- 0,030; 2- 0,050; 3- 0,070; 4- 0,090; 5- $0,110 \text{ mmol L}^{-1}$ e uma segunda curva de calibração em cinco níveis de concentração com incremento de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ com os pontos: 1- 0,10; 2- 0,20; 3- 0,30; 4- 0,40 ; 5- $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. Em ambas as curvas utilizou-se o ácido tridecanóico (C13:0) como padrão interno, cuja concentração foi fixada em $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. Foi necessária a construção de duas curvas de calibração devido à diferença entre as concentrações dos ácidos graxos. A faixa de concentração de C18:3 é cinco vezes maior do que a concentração do C16:0 e do C18:2. Deve-se ressaltar ainda que foram realizadas curva de calibração tanto no equipamento da Agilent (disponível na UFJF) quanto no equipamento da Beckman (disponível na Embrapa Gado de Leite – JF), devido ao interesse em quantificar as amostras usando diferentes equipamentos.

Para verificar se o modelo proposto pode ser realmente usado como modelo de previsão para o sistema estudado deve-se realizar análise da variância e verificar se há evidências de falta de ajuste (NETO *et al.* 2007). Logo, utilizou-se Teste de hipótese *a priori* (equação 5) recomendado pela IUPAC (DANZER & CURRIE, 1998) para a realização deste estudo.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_{x,y}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p \frac{m_i(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{(p-2)}}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} \frac{(y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{(m-p)}} \quad (5)$$

Onde: m_i = número de medidas de cada ponto ($m_i=3$); p = número de pontos ($p=5$); $m = m_i \times p$ ($m=15$).

Se o valor calculado de F_{calc} ($p-2, m-p$) for menor que o valor de F_{tabelado} dentro do intervalo estimado, não haverá falta de ajuste no modelo e o coeficiente angular da equação obtida poderá ser usado como fator de resposta (R_f) para quantificação de ácidos graxos em amostras de braquiárias. A equação 6 mostra como pode ser obtido o fator de resposta.

$$\frac{A_{\text{CAG}}}{[\text{AG}]} = R_f \cdot \frac{A_{\text{C13:0}}}{[\text{C13:0}]} \quad (6)$$

Onde: A_{CAG} é a área de cada ácido graxo, $A_{\text{C13:0}}$ é a área correspondente ao padrão interno (PI) C13:0, $[\text{AG}]$ é a concentração de cada ácido graxo em mmol/L e $[\text{C13:0}]$ é a concentração do padrão interno (PI).

Os modelos descritivos foram obtidos a partir de réplicas autênticas (tabelas 4 e 5) para cada nível de concentração da curva e forneceram como resultado uma curva analítica para a razão das áreas de cada ácido graxo correspondente ($A_{\text{CAG}}/A_{\text{C13:0}}$) versus a razão das concentrações ($[\text{CAG}]/[\text{C13:0}]$). Alguns pontos que estavam fora da curva puderam ser retirados sem prejudicar o modelo, uma vez que foram feitas réplicas autênticas.

Tabela 4:Valores usados para implementação do modelo de regressão para a 1ª curva analítica

AG	[C _{AG}]/[C _{13:0}]	CE _{AGILENT}			CE _{BECKMAN}		
		1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata	1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata
	0,06		0,099	0,062	0,016	0,007	0,006
	0,10	0,121	0,149		0,020	0,021	0,022
C18:0	0,14		0,212	0,202	0,082	0,081	0,083
	0,18	0,291		0,280	0,108	0,091	
	0,22				0,127		
	0,06		0,078	0,054	0,018	0,010	0,006
	0,10	0,098	0,123		0,017	0,018	0,028
C18:1	0,14		0,197	0,202			0,030
	0,18	0,267		0,220		0,041	0,039
	0,22				0,064	0,052	0,054
	0,06	0,056	0,058	0,039		0,012	0,010
	0,10	0,085	0,082		0,020	0,025	0,026
C16:0	0,14		0,124	0,165			0,052
	0,18			0,194			
	0,22		0,208	0,209	0,062	0,057	0,066
C18:2	0,22	0,389	0,325	0,345	0,097	0,062	
	0,18				0,034	0,044	0,046
	0,14		0,295	0,225	0,032		0,033
	0,10	0,238		0,146		0,014	0,014
	0,06		0,069	0,074	0,011	0,013	0,008
C18:3	0,06		0,103	0,093		0,026	0,020
	0,10	0,154	0,179		0,044	0,041	0,042
	0,14	0,176		0,280	0,096	0,084	
	0,18	0,214		0,332	0,114		0,082
	0,22		0,383	0,416	0,118		0,103

Tabela 5:Valores usados para implementação do modelo de regressão para a 2ª curva analítica

AG	[C _{AG}]/ [C13:0]	CE _{AGILENT}			CE _{BECKMAN}		
		1ª Replicata	2ª Replicata	3ªReplica ta	1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata
	0,2	0,128	0,120		0,013		0,018
	0,4	----	0,204	0,207	0,098	0,125	0,104
C18:0	0,6			0,354	0,133		0,140
	0,8	0,412		0,480	0,169	0,227	
	1,0	0,513	0,120		0,277		0,297
	0,2	0,093	0,103	0,101	0,015	0,067	0,050
	0,4	0,209		0,232	0,037	0,073	0,116
C18:1	0,6		0,314	0,378	0,185	0,144	0,170
	0,8	0,449			0,204	0,234	0,172
	1,0	0,551	0,103		0,300	0,417	0,290
	0,2	0,159	0,071	0,112	0,037	0,036	0,037
	0,4	0,262	0,223	0,229	0,082	0,087	0,104
C16:0	0,6		0,365	0,444	0,180	0,194	0,176
	0,8	0,524			0,238	0,232	0,192
	1,0	0,595		0,567	0,278		0,273
	1,0		0,618	0,599			
	0,8	0,483	0,518	0,530		0,250	0,242
C18:2	0,6		0,378	0,480		0,153	0,164
	0,4	0,308		0,379	0,082	0,077	0,081
	0,2	0,136	0,118	0,097	0,024		0,021
	0,2	0,128	0,171	0,127	0,028	0,057	0,037
	0,4	0,294	0,299	0,305	0,079	0,158	0,171
C18:3	0,6	0,372					
	0,8	0,555		0,721	0,359	0,306	
	1,0	0,725	0,793		0,428		0,334

As tabelas 6,7,8 e 9 resumem algumas informações sobre as curvas analíticas obtidas, bem como: o coeficiente angular e o coeficiente linear da reta, o valor de r múltiplo, o resultado do Teste de a priori utilizado na verificação da falta de ajuste dos modelos, o valor de $F_{\text{significância}}$ que, no presente caso, em todos os modelos foi cinco vezes maior do que o valor tabelado.

Tabela 6: Curva 1 - UFJF

<i>AG</i>	<i>C. angular</i>	<i>C. linear</i>	<i>r</i>	<i>R_f</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>F_{SIG}</i>	<i>F_{cri}</i>
C 18:0	1,718 ($\pm 0,124$)	0,029 ($\pm 0,016$)	0,98	1,72	0,48	192,91	$F_{2,4} = 6,94$
C 18:1	1,552 ($\pm 0,161$)	0,031 ($\pm 0,020$)	0,97	1,55	0,92	92,98	$F_{2,4} = 6,94$
C 16:0	1,045 ($\pm 0,082$)	0,012 ($\pm 0,011$)	0,98	1,05	0,14	161,41	$F_{2,6} = 5,41$
C 18:2	1,644 ($\pm 0,235$)	0,004 ($\pm 0,036$)	0,93	1,64	1,03	48,63	$F_{2,8} = 4,46$
C 18:3	1,773 ($\pm 0,255$)	0,015 ($\pm 0,038$)	0,93	1,77	3,88	48,27	$F_{2,6} = 5,41$

Tabela 7: Curva 2 - UFJF

<i>AG</i>	<i>C. angular</i>	<i>C. linear</i>	<i>r</i>	<i>R_f</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>F_{SIG}</i>	<i>F_{cri}</i>
C 18:0	0,521 ($\pm 0,035$)	0,015 ($\pm 0,021$)	0,99	0,521	0,98	215,47	$F_{3,3} = 9,28$
C 18:1	0,575 ($\pm 0,025$)	- 0,011 ($\pm 0,014$)	0,99	0,575	0,32	522,05	$F_{3,4} = 6,59$
C 16:0	0,608 ($\pm 0,042$)	- 0,002 ($\pm 0,025$)	0,98	0,608	1,50	208,51	$F_{3,6} = 4,76$
C 18:2	0,594 ($\pm 0,052$)	0,040 ($\pm 0,034$)	0,96	0,594	4,06	128,52	$F_{3,7} = 4,35$
C 18:3	0,783 ($\pm 0,054$)	- 0,019 ($\pm 0,033$)	0,98	0,783	0,01	206,62	$F_{3,6} = 4,76$

Tabela 8: Curva 1 - EMBRAPA

<i>AG</i>	<i>C. angular</i>	<i>C. linear</i>	<i>r</i>	<i>R_f</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>F_{SIG}</i>	<i>F_{cri}</i>
C 18:0	0,803 ($\pm 0,072$)	- 0,045 ($\pm 0,009$)	0,96	0,95	2,15	123,19	$F_{2,5} = 5,79$
C 18:1	0,279 ($\pm 0,025$)	- 0,007 ($\pm 0,004$)	0,96	0,28	0,46	127,34	$F_{3,7} = 4,35$
C 16:0	0,315 ($\pm 0,018$)	- 0,008 ($\pm 0,002$)	0,99	0,28	0,98	313,75	$F_{2,6} = 5,14$
C 18:2	0,386 ($\pm 0,062$)	- 0,019 ($\pm 0,009$)	0,90	0,41	0,21	38,03	$F_{3,6} = 4,76$
C 18:3	0,584 ($\pm 0,074$)	- 0,010 ($\pm 0,010$)	0,93	0,58	2,64	62,36	$F_{3,6} = 4,76$

Tabela 9: Curva 2 - EMBRAPA

<i>AG</i>	<i>C. angular</i>	<i>C. linear</i>	<i>r</i>	<i>R_f</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>F_{SIG}</i>	<i>F_{cri}</i>
C 18:0	0,31 ($\pm 0,02$)	- 0,04 ($\pm 0,01$)	0,97	0,31	2,00	146,37	$F_{3,6} = 4,76$
C 18:1	0,36 ($\pm 0,04$)	- 0,04 ($\pm 0,03$)	0,93	0,36	1,53	78,08	$F_{3,10} = 3,71$
C 16:0	0,31 ($\pm 0,03$)	- 0,03 ($\pm 0,02$)	0,98	0,31	2,99	323,91	$F_{3,9} = 3,86$
C 18:2	0,36 ($\pm 0,03$)	- 0,05 ($\pm 0,02$)	0,96	0,36	1,52	120,87	$F_{2,7} = 4,74$
C 18:3	0,44 ($\pm 0,04$)	- 0,04 ($\pm 0,02$)	0,97	0,44	0,45	115,39	$F_{2,6} = 5,14$

Como o valor de F calculado para todas as curvas de calibração foi menor que o de F tabelado, pode-se afirmar que para o intervalo de 95% estimado, não há evidência de falta de ajuste no modelo implementado e, portanto, o fator de resposta (R_f) referente de cada equação da reta dos ácidos graxos pode ser utilizado para quantificar as amostras braquiárias ou outras matrizes, que apresentam concentrações de ácidos graxos dentro do intervalo das curvas construídas. Para isto, basta utilizar C13:0 como padrão interno em uma concentração de 0,50 mmol L⁻¹ adicionado a cada amostra, para que a concentração do analito de interesse seja obtida utilizando a equação (7), sem haver necessidade de construção de nova curva de calibração para cada amostra distinta.

$$\% AG = \frac{A_{AG} [C13:0].V.MM_{AG}}{R_f.A_{C13:0.m}} \times 100 \quad (7)$$

Onde: A_{CAG} é a área de cada ácido graxo correspondente, [C13:0] é a concentração do padrão interno (PI), V é o volume utilizado para diluir a massa de amostra em litros, MM_{AG} é a massa molar do ácido graxo correspondente em g/mol, R_f é o fator de resposta obtido pela curva do modelo descritivo obtido com padrões, $A_{C13:0}$ é a área correspondente ao padrão interno (PI) C13:0 e m é a massa de amostra pesada em miligramas.

4.4.2. Quantificação da amostra de braquiária

Foi realizada a análise de uma mesma amostra de braquiária em seis réplicas autênticas, nos dois equipamentos de eletroforese capilar. É importante ressaltar que no equipamento de eletroforese capilar da Beckman foi necessário desligar a bomba de coolant (que é responsável por garantir a temperatura do cartucho estável durante a corrida), pois o mesmo reage com o capilar revestido de teflon gerando vapores, os quais danificam dispositivos do equipamento. O uso do capilar revestido de teflon é necessário, uma vez que o capilar de poliimida sofre ataque de solventes orgânicos. A temperatura do cartucho foi monitorada, sendo detectado ocorrências de oscilações de $\pm 3^\circ\text{C}$ no interior do cartucho, na verdade a temperatura do cartucho foi dependente da temperatura ambiente ajustada através de ar condicionado.

Logo, foi possível fazer a quantificação, utilizando a equação 7, com os resultados obtidos nos dois equipamentos. A integração dos picos foi realizada manualmente. A figura 19 ilustra os eletroferogramas de uma das réplicas da amostra de braquiária obtida no equipamento da Agilent (UFJF) e no equipamento da Beckman (Embrapa).

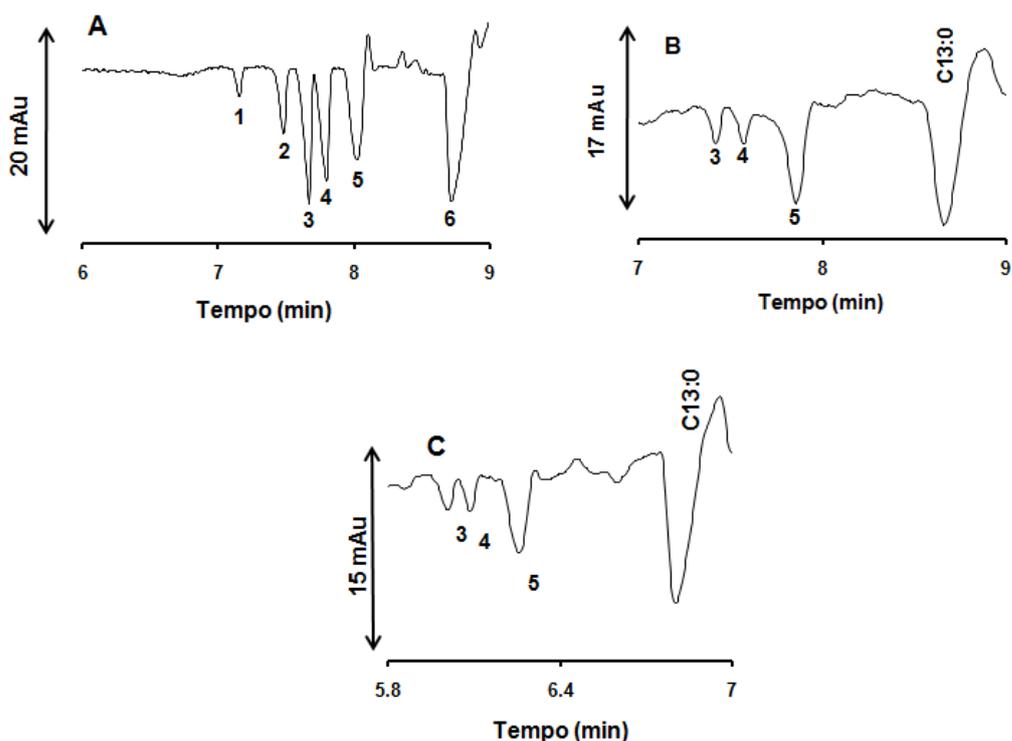


Figura 19: O eletroferograma A corresponde a mistura de padrões onde os picos 1, 2, 3, 4 e 5 são respectivamente aos ácidos graxos C18:0, C18:1c, C16:0, C18:2 e C18:3, o eletroferograma B corresponde ao resultado da amostra de braquiária no equipamento da Agilent e o eletroferograma C corresponde ao resultado da amostra de braquiária no equipamento da Beckman. Condições experimentais: injeção 4 segundos a 0,2 psi, voltagem de +19 kV, temperatura no cartucho de 25°C, detecção indireta em 224nm, dimensões do capilar: comprimento total de 50,0 cm; efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo no equipamento.

4.3 Comparação entre a metodologia otimizada por CE e o método oficial para análises de ácidos graxos.

O método oficial (AOCS996.06) utiliza cromatografia à gás (GC) com coluna capilar de sílica de 60 metros com fase estacionária composta por um filme líquido de cyanopropylpolysiloxano com 0,25 μm de espessura, temperatura da coluna constante a 180°C e detector de ionização de chama (FID). Todo o procedimento de análise foi realizado na Embrapa de Agroindústria de Alimentos em Guaratiba, Rio de Janeiro.

A amostra de braquiária foi submetida à etapa de metilação de acordo com descrito no item 3.4.4. deste trabalho e injetada com as condições especificadas no método oficial, usando o C13:0 como padrão interno. A figura 21 mostra um dos cromatogramas obtidos da amostra.

As setas vermelhas indicam os ácidos graxos de maiores concentrações. Confirmando que realmente o ácido graxo de maior concentração na braquiária é o C18:3, seguido pelo C16:0 e o C18:2.

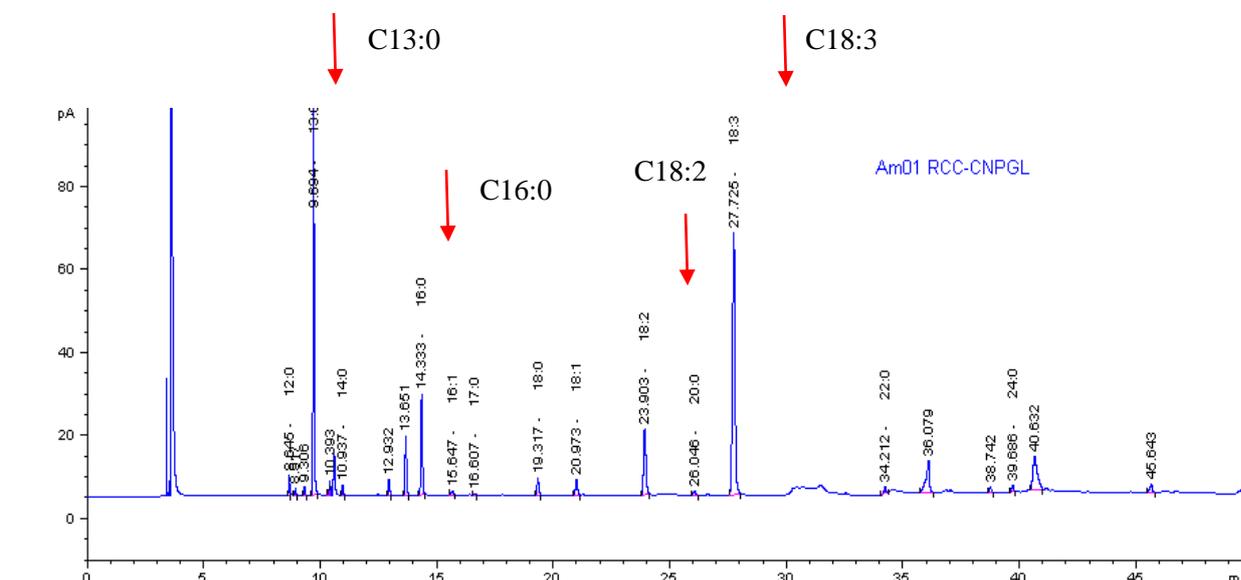


Figura 20: Cromatograma dos ésteres metílicos de ácidos graxos de braquiárias em análise por GC/FID, o padrão interno utilizado foi o C13:0. Condições cromatográficas: temperatura da coluna mantida isotermicamente a 200°C, temperatura do injetor e detector mantida a 280°C; gás de arraste hidrogênio ultra puro a 2,4 mL/min a 40 graus, detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de cyanopropylpolysiloxano (60 m x 0,32 mm id, 0,25 μm).

Nos resultados da cromatografia gasosa foi possível identificar 13 ácidos graxos, sendo os picos identificados por comparação entre os tempos de retenção da amostra e os padrões metílicos (FAMEs). Mesmo sendo possível apenas a identificação dos três picos de maiores concentração na braquiária, essa técnica ainda é promissora para esse tipo de análises, pois o interesse é de se conhecer a concentração do C18:2 e C18:3. Temos que saber se os métodos apresentam desempenhos similares. Logo, do ponto de vista estatístico, para se comparar os métodos, deve-se averiguar se os dados obtidos seguem uma distribuição normal (gaussiana). Para verificar a normalidade dos dados, utiliza-se o teste de Shapiro-wilk ($n < 50$) para a diferença dos valores entre o método por CE e GC. No presente trabalho foi realizado o teste pelo programa SPSS tanto para os resultados obtidos no equipamento da UFJF, onde foi encontrado o p-valor igual a **0,436** quanto para os resultados obtidos no equipamento da Embrapa, onde o valor de p-valor foi igual a **0,578**. Assim o pressuposto de normalidade não foi violado para ambos os métodos, uma vez que o valor obtido de p-valor foi maior que **0,05** no intervalo de 95% de confiança. Os resultados obtidos por CE nos dois equipamentos e por GC se encontram na tabela 10.

Tabela 10: Resultados do equipamento de CE da Agilent e da Beckman comparado com os resultados de GC.

Réplicas	AG	CE _{AGILENT} (%m/m)	CE _{BECKMAN} (%m/m)	GC (%m/m)
1	C16:0	4.59	5.58	4.35
	C18:2	3.64	3.26	4.38
	C18:3	18.80	17.93	18.88
2	C16:0	3.31	2.75	2.53
	C18:2	3.06	2.42	2.58
	C18:3	13.87	14.83	10.97
3	C16:0	4.07	3.49	4.39
	C18:2	4.27	3.95	4.51
	C18:3	21.93	18.49	18.81
4	C16:0	5.01	3.20	5.03
	C18:2	5.24	5.70	5.27
	C18:3	23.04	20.44	21.20
5	C16:0	4.85	5.87	4.02
	C18:2	3.89	4.44	4.05
	C18:3	18.09	15.90	17.38
6	C16:0	5.15	6.61	5.11
	C18:2	5.34	5.55	5.19
	C18:3	20.34	23.78	21.82

Logo, testes estatísticos paramétricos podem ser usados para comparação dos métodos. No presente caso foi realizado o teste t pareado. Como os valores de p-valor obtidos p-valor igual a 0,12 (CE Agilent) e 0,55 (CE Beckman) foram maiores que 0,05, não há evidências de diferenças significativas entre os resultados obtidos pelo método oficial por GC e o método otimizado por eletroforese capilar no intervalo de 95% de confiança.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi proposta uma metodologia alternativa para quantificação do teor de ácidos graxo em amostras de *B. ruziziensis* por CZE sob detecção indireta por UV. Foi selecionada por não haver muitos relatos a respeito da composição de ácidos graxos dessa forrageira tropical na literatura, a braquiária *ruziziensis*.

O método otimizado foi comparado com a metodologia oficial AOCS-996.06 para amostra de *B. ruziziensis*. Os métodos não apresentaram diferenças significativas para um intervalo estimado de 95% de confiança, evidenciando a potencialidade do método otimizado por eletroforese capilar para a quantificação do teor dos ácidos graxos (C16:0, C18:2 e C18:3) em amostras de *B. ruziziensis*. Cabe ressaltar que a metodologia por CE não apresenta passos de derivatização, não faz uso de colunas específicas, é simples, rápido (tempo de corrida de 10 minutos) quando comparado com GC.

6.REFERÊNCIAS

- ALTRIA, K.D.; Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 856, n. 1-2, p. 443-463, sept. 1999.
- BAKER, D.R.; **Capillary Electrophoresis**, New York: Wiley-Interscience, 1995.
- BARGO, F.; DELAHOY, J.E.; SCHROEDER, G.F.; BAUMGARD, L.H.; MULLER, L.D. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of CLA in milk. **Animal Feed Science and Technology**., v.131, p. 226-240, 2006.
- BAUMAN, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, and J. M. Griinari. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**. 1999. Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15-29, 2001.
- BAUMAN, D.; GRIINARI, J.M. Biosynthesis of CLA and its incorporation into meat and milk of ruminants. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.77, p.117, Supplement 1, 1999.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p.203-227, 2003.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BOTREL, M. de A.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F. Avaliação de gramíneas forrageiras na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 683-689, abr. 1999.
- BOUFAIED, H.; Chouinard, P. Y.; Tremblay, F. F.; Petit, H. V.; Michaud, R.; Belanger, G. Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. **Canadian Journal of Animal Science**., 83, 501-511, 2003.
- BYERS, F.M.; SCHELLING, G.T. Los lipidos en la nutricion de los rumientes. In: CHURCH, C. D. (Ed). **El ruminante: fisiologia digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, p.339-35, 1993.
- CASTRO, P.M. Otimização de metodologia de análise de ácido graxo trans (C18:1 9t) por eletroforese capilar em amostras alimentícias. 2010. **Dissertação (Mestrado em Química Analítica)** – Instituto de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2010.
- CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, C. K., PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura – Os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002.

DANZER, K., CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, North Carolina, USA, v. 70, p. 993-1014, 1998.

DE CASTRO, P.M., BARRA, M.M., RIBEIRO, M. C. R., AUED-PIMENTEL, S., DA SILVA, S. A., DE OLIVEIRA, M.A.L. Total Trans Fatty Acid Analysis in Spreadable Cheese by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1403–1409, 2010.

DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F. et al. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science and Technology**. v.131, p.168-206, 2006.

DHIMAN, T.R.; ANAND, G.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p.2146-2156, 1999.

ELGERSMA, A. et al. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled ryegrass (*Lolium perenne*L.), affected of cultivar and regrowth interval. **Animal Feed Science and Technology**, v. 108, n. 1-4, p.191-205,2003.

FERNANDES, S.A.G.; MATTOS, W.R.S; MATARAZZO, S.V. et al. Perfil de ácidos graxos em alimentos de clima tropical utilizados na dieta de ruminantes. **Boletim de Indústria Animal**, v.64, p.19-27, 2007.

FRENCH, P.; Stanton, C.; Lawless, F.; O’Riordan, E. G.; Monahan, F. J.; Caffrey, P. J.; Oloney, A. P. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. **Journal of Animal Science**. 78, 2849-2855, 2000.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1956.

GUIL-GUERRERO, J.L.; MAROTO, F.F.G.; GIMÉNEZ, A.G. Fatty acids profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of gamma-linolenic acid. **The Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v.78, n.7, p.677-684, 2001.

GRIINARI, J. M.; MCGUIRE, M. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D.L. Role of the insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 80, p.1076-1084. 1997.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**. v.90, p.420-426, 1978.

HARWOOD, J. L. Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. Pages 2–48 in P. K. Stumpf. **The biochemistry of plants**. Vol. 4. Academic Press, New York, NY, 1980.

KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E.; BAUMAN, D.E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentration in milk from lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.128, p.881-885, 1998.

KHAN, N.A.; CONE, J.W.; HENDRIKS, W.H. Stability of fatty acids in grass and maize silages after exposure to air during the feed out period. **Animal Feed Science and Technology**. v.154, p.183-192, 2009.

JURJANZ S. ; MONTEILS V. ; JUANEDA P. ; LAURENT F. Variations of trans octadecenoic acid in milk fat induced by feeding different starch-based diets to Cows. **Lipids**. vol. 39, no1, pp. 19-24, 2004.

LAWSON, R.E.; MOSS, A.R.; GIVENS, D.I. The role of dairy products in supplying CLA to man's diet: a review. **Nutrition Research Reviews**, v.14, p. 153-172, 2001.

LOOR, J.J., DOREAU, M., CHARDIGNY, J.M., OLLIER, A., SEBEDIO, J.L., CHILLIARD, Y. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of trans-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. **Animal Feed Science and Technology**. 199, 227-246, 2005.

McDonald, P., Henderson, A. R. and Heron, S. J. E..Losses during ensilage. Pages 237–249 in P. McDonald, N.Henderson, and S. Heron, eds. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications. Aberystwyth, UK,1991.

MORRISON, R., BOYD, R. **Química orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 7th ed., p. 1253, 1981.

OLIVEIRA, M, A. L., MICKE, G. A., BRUNS, R., TAVARES, M. F. M. Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 924, p. 533-539, 2001.

OLIVEIRA, M, A. L., SOLIS, V. S., GIOELLI, L. A., POLAKIEWICZ, B., TAVARES, M. F. M. Method development for the analysis of trans-fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, GE, v. 24,p. 1641-1647, 2003.

OLIVEIRA, M. A. L. Análise de ácidos graxos em óleos e gorduras por eletroforese capilar. 2003. **Tese (Doutorado em Química Analítica)** - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v.40, p.283-298, 2001.

PARIZA, M. W. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**. 79 (Suppl.), 1132S-1136S, 2004.

ROACH, J.A.G.; MASSOBA, M.M.; YURAWECZ, P.M. et al. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta**. v.465, p.207-226, 2002.

ROY, A.; FERLAY, A.; SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. **Animal Science**.82:479-492, 2006.

SILVA, J. A. F., COLTRO, W. K. T., CARRILHO, E., TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 740-744, 2007.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; Eletroforese Capilar e Eletrocromatografia Capilar. In: **Princípios da Análise Instrumental**, 5ª ed., Porto Alegre: Bookman, p. 686, 694, 695, 696, 697-700, 2002.

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil In: **Forragicultura e Pastagens: Temas em evidência**.1 ed.Lavras : Editora Ufla, v.1, p. 65-120, 2005.

SOUZA SOBRINHO, F., MAGALHAES, J. R., AUAD, A.M., MORAIS, L.E., SAMPAIO, F., LÉDO, F.J.S., PEREIRA, A.V., LIMA, M. M. L. S. Comportamento de progênies de *B. ruziziensis* na presença de alumínio tóxico In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, João Pessoa. **Produção Animal em Biomas Tropicais**. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v.43,2006.

SOUZA SOBRINHO, F., MORAIS, L.E., SAMPAIO, F., OLIVEIRA, J.S., AUAD, A.M., PEREIRA, A.V., LÉDO, F.J.S., FONSECA, C. S. Quebra de dormência de sementes de *Brachiaria ruziziensis* In: Congresso Panamericano do Leite, Porto Alegre. **Congresso Panamericano do Leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v.9. 2006.

SOUZA SOBRINHO, F.; CARNEIRO, H.; MAGALHAES, J.R.; MIRANDA, J.E.C.; PEREIRA, A.V.; LÉDO, F.J.S.; REIS, M.C.; BRUM, S.S.; OLIVEIRA, J.S.; BOTREL, M.A. Produtividade e qualidade da forragem de *Brachiaria* na Região Norte Fluminense. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2005, Goiânia. **A produção animal e o foco no agronegócio Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia**. v. 42, 2005.

TAVARES, M.F.M.; Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, mar./abr. 1996.

TAVARES, M.F.M.; Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, set./out. 1997.

VALLE, C. B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis News.**, v.3, p.11-13, 1991.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles, J. W.; Maass, B. L.; Valle C. B. do (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; EMBRAPA. p.147-163, 1996.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2 ed. Ithaca: CORNELLUNIVERSITY. p. 476,1994.

VEUTHEY, J.L.; Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin/Heidelberg, v. 381, n. 1, p. 93-95, jan. 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist**. 1 Ed. Toronto: Churchill Livingstone, p. 293-300,1999.