

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA

Renata de Jesus Coelho Castro

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÁCIDOS GRAXOS
PRECURSORES DE CLA EM BRAQUIÁRIAS POR ELETROFORESE
CAPILAR**

JUIZ DE FORA

2015

Renata de Jesus Coelho Castro

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÁCIDOS GRAXOS
PRECURSORES DE CLA EM BRAQUIÁRIAS POR ELETROFORESE
CAPILAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, área de concentração: Química-Analítica como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Departamento de Química - UFJF

CO-ORIENTADOR: Pesq. Dr. Fausto de Souza Sobrinho

Embrapa Gado de Leite - JF

JUIZ DE FORA

2015

*Dedico esta tese ao meu
grande amor Paulo Sérgio...
simplesmente por ter estado e
me apoiado em todos os momentos!!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de todas as coisas e a luz que nos faz vencer diante dos obstáculos, sem **Ele** eu não teria conseguido chegar até ao final.

Ao meu orientador, *Marcone*, pela enorme paciência, pela orientação, por acreditar em mim e por compartilhar todo seu conhecimento, criatividade e bom humor de sempre.

Ao meu co-orientador, *Fausto*, pela amizade, pelo conhecimento, por todo incentivo ao trabalho e por propôs desafios que permitiram o meu crescimento profissional.

Ao meu marido, *Paulo Sérgio*, por acreditar, incondicionalmente, na minha capacidade e no meu trabalho. Tenho plena certeza de que foi o seu incentivo e todo amor e carinho que você me dedicou que permitiram que eu chegasse até aqui. *Amo você!*

Aos meus pais *Carlinhos e Lurdinha*, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os sentidos.

Aos meus irmãos *Amarildo e Adelaide* que mesmo distante, torceram muito por mim e me deram o apoio e a força para continuar lutando, mesmo diante de tantas dificuldades.

Aos meus colegas de grupo, *GQAQ*, por estarem juntos comigo nessa caminhada, em especial a *Renata Sato & Patricia Lopes* pelo companheirismo, ensinamentos, parcerias e momentos de descontração.

A minha grande amiga, *Patricia Barra*, simplesmente pela amizade e auxílio durante todo o trabalho.

A empresa *Empresa Embrapa Gado de Leite*, pelo apoio financeiro, em especial ao pesquisador *Alexander Auad*, pela grande contribuição na minha pesquisa e pelas palavras amigas nos momentos oportunos e a pesquisadora *Ana Luisa* pelos incentivos.

Ao pesquisador *Marco Gama*, por acreditar no meu potencial desde da época da graduação e ao analista *Fernando César* pela grande contribuição durante a execução do projeto.

A técnica do laboratório de Genética Vegetal da Embrapa, *Cristiane*, que se tornou uma grande amiga, pela ajuda inestimável durante todo período do trabalho.

Aos técnicos do laboratório de cromatografia da Embrapa, *Ernando & Hernani*, pela paciência e prestatividade diante de tantos empréstimos de materiais e reagentes.

A professora, *Flávia Marques*, pela gentileza de ceder as dependência do seu laboratório e dos conselhos na hora certa.

Às secretárias da pós-graduação, *Simone & Maristela*, que sempre estiveram prontas a ajudarem com eficiência e disposição.

A todos que diretamente ou indiretamente, colaboraram com esse trabalho, como funcionários do instituto de química, professores e funcionários da Empresa Gado de Leite, entre outros, que certamente

A Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Química.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

A produção de leite e carne de bovinos no Brasil está baseada na utilização de pastagens, por constituírem alimento de menor custo para o produtor. No Brasil, as pastagens são a principal fonte de alimentação do rebanho, sendo responsável por quase 90% da carne bovina e pela maior parte do leite produzido no país. Sendo assim, surge a importância de um monitoramento rigoroso para se obter uma forragem de qualidade, visto que, a dieta desses ruminantes está diretamente relacionada com a qualidade do leite. Nos últimos anos, tem-se dado o interesse de conhecer substâncias químicas presentes nas forragens que possam contribuir tanto para uma boa qualidade do leite, como por exemplo: o ácido linoléico (C18:2 cis-9 cis-12) e o ácido α -linolênico (C18:3 cis-9 cis-12 cis-15), que são ácidos graxos precursores do ácido linoléico conjugado (CLA) quanto para seleção de cultivares resistentes ao estresse causado pela presença das cigarrinhas das pastagens, como por exemplo: ácidos orgânicos (ácidos cítrico, málico, aspártico e succínico). O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de Eletroforese Capilar de Zona (CZE) como uma ferramenta para auxiliar na seleção de materiais com uma maior concentração dos precursores do CLA e materiais mais resistentes à presença das cigarrinhas das pastagens. Para análise dos precursores de CLA, o eletrólito utilizado constituiu-se de 17% de metanol, 33% de ACN, 12 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, 12 mmol L⁻¹ de Brij e pH próximo de 9,5 e as condições de análise foram: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s), voltagem de + 26 kV, temperatura no interior do capilar de 27 °C, detecção direta no UV em 200 nm, capilar de TSU com 75 μ m d.i. e 34 cm de comprimento total. O método de eletroforese capilar de zona (CZE) se mostrou eficaz para análise dos precursores de CLA, em 4 minutos. Foi realizada a comparação do método proposto com o método oficial por cromatografia a gás (CG) em seis amostras de braquiárias, sendo que, os resultados não apresentaram diferenças significativas em um intervalo de confiança a 95 %. Para análises dos ácidos orgânicos, o eletrólito utilizado constituiu-se de 20 mmolL⁻¹ de ácido ftálico,

15 mmolL⁻¹ de TRIS e 0,8 mmolL⁻¹ de CTAB. As condições de análise foram: injeção hidrodinâmica (0,3 psi por 2 s), voltagem de - 15 kV, temperatura no interior do capilar de 25 °C, detecção direta no UV em 240 nm, capilar de TSP com 75 μ m d.i. e 375 μ m d.e., 50,2 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo. O método CZE se mostrou eficaz para análises dos ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido málico, ácidos aspártico e ácido succinico) relacionados aos estresses das plantas, pois foi possível a

identificação em menos de 5 minutos, possibilitando assim um grande número de análises em um curto tempo.

PALAVRAS-CHAVE: Forragem, CLA, Ácidos Orgânicos e Eletroforese capilar de Zona.

ABSTRACT

Bovine milk and meat production in Brazil is based on the use of pastures, as they are less food costing for the producers. In Brazil, pastures are the leading power supply of the herd, which are responsible for almost 90% of bovine meat and the biggest part of milk produced in the country. By this way, rises a rigorous monitoring to get quality forage, considering that the ruminant diet is related to the milk quality. Last years, it has arisen the interest of knowing chemical substances present in the feed that could contribute to a good milk quality, such as: linoleic acid (C18: 2 cis-cis-9-12) and α -linolenic acid (C18: 3 cis-cis-9-cis-12 15), which are precursors of fatty acids conjugated linoleic acid (CLA); and to selection of cultivars resistant to stress caused by the sharpshooters pastures presence, such as the organic acids (citric, malic, succinic and aspartic acid). This paper aimed use the Capillary Zone Electrophoresis (CZE) technique as a tool to assist the selection of materials with a higher concentration of CLA precursors and more resistant materials to the presence of sharpshooters pastures. For analysis of CLA precursors, the electrolyte used consisted of 17% methanol, 33% ACN, 12 mmol L⁻¹ sodium tetraborate, 12 mmol L⁻¹ and Brij pH of 9.5, and analysis conditions were: hydrodynamic injection (25 mbar for 5 sec) + 26 kV voltage, 27 ° C temperature capillary within, direct UV detection at 200 nm, TSU capillary with 75 μ m d.i and 34 cm length. The CZE method is effective for CLA precursors analysis, in 4 minutes. A comparing of the proposed method to the official one was made, by using gas chromatography (GC) at six samples brachiaria, and the results showed no significant differences at a confidence interval of 95%. For analysis of organic acids, the electrolyte used consisted of 20 mmol L⁻¹ phthalic acid, 15 mmol L⁻¹ TRIS and 0.8 mmol L⁻¹ CTAB. The analysis conditions were: hydrodynamic injection (0.3 psi/3 seconds), - 15 kV voltage, 25 ° C temperature capillary within, UV direct detection at 240 nm, TSP capillary with 75 μ m d.i. and 375 μ m d.e., 50,2 cm length and 40.0 cm effective length. The CZE method is effective for organic acids (citric acid, malic acid, aspartic acid and succinic acid) analysis related to the plants, as it was possible its identification in less than 5 minutes, allowing a large number of analyzes in a short time.

KEYWORDS: forrage, CLA, organic acids, capillary zone electrophoresis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos ácidos graxos precursores do CLA.....	21
Figura 2 - Via metabólica proposta para biossíntese do CLA (C18:2 cis-9 trans-11)....	23
Figura 3 - Estrutura dos ácidos orgânicos mais comuns nas forrageiras.....	25
Figura 4 - Representação de um equipamento de eletroforese capilar	28
Figura 5 - Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do ânodo (+) para o cátodo (-) (fluxo normal)	29
Figura 6 - Representação de um equipamento de cromatografia a gás	34
Figura 7 - Figura para reação de hidrólise básica dos glicérides.....	43
Figura 8 - Esquema de saponificação das amostras para análise por CZE.....	44
Figura 9 – Desenho esquemático da gaiola construída de garrafa de plástico (PET)	49
Figura 10 – Fluxograma do método de Extração de ácidos orgânicos.....	50
Figura 11 - Eletroferograma A representa mistura de padrão na concentração de 0,5 mmol L ⁻¹ e B amostra de braquiária <i>ruzizensis</i> . Representação dos sinais: 1- C18:1 trans-9, 2- C18:1 cis-9, 3- C18:2 cis-9 cis-12 e 4- C18:3 cis-9 cis-12 cis-15.....	54
Figura 12 - Representação da injeção em modo <i>inlet</i> e modo <i>outlet</i>	55
Figura 13 - Eletroferogramas da mistura de padrão na concentração de 0,5 mmol L ⁻¹ . Condições experimentais: A - injeção 4 segundos a 25 mbar, voltagem de – 25kV, B - injeção 4 segundos a 25 mbar, voltagem de – 24kV e C - injeção 4 segundos a 25 mbar, voltagem de – 22kV. Representação dos sinais: 1- C18:1 trans-9, 2- C18:1 cis-9, 3- C18:2 cis-9 cis-12 e 4- C18:3 cis-9 cis-12 cis -15.....	56
Figura 14 - Eletroferogramas dos padrões. A - injeção 4 s, V = +27 kV, B - injeção 5 s, V= +27 kV, C - injeção 4 s, V= +26 kV e D - injeção 5 s, V= +26 kV. Representação dos sinais: 1-C18:1 trans-9, 2-C18:1 cis-9, 3-C18:2 cis-9 cis-12 e 4-C18:3 cis-9 cis-12 cis -15	57
Figura 15 - Eletroferogramas de uma mesma mistura de padrões. Representação dos sinais: 1 - C18:1 trans-9, 2 - C18:1 cis-9, 3 - C18:2 cis-9 cis-12 e 4 - C18:3 cis-9 cis-12 cis -15.....	58
Figura 16 - Gráficos de barras das concentrações encontradas dos precursores de CLA nas amostras de braquiárias	67
Figura 17 - Cromatogramas de seis amostras de braquiárias <i>ruzizensis</i> . Representação dos sinais: 1 - C19:0 (PI), 2 - C18:2 cis-9 cis-12 e 3 - C18:3 cis-9 cis-12 cis -15	69

Figura 18 - Eletroferogramas das seis amostras aleatórias de braquiárias ruziziensis que foram comparadas com resultado de GC. Representação do sinal: PI- C18:1 trans-9... 70

Figura 19 - Eletroferograma de mistura de padrões de ácidos orgânicos na concentração de 1,0 mmol L⁻¹, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2-ácido pirúvico, 3-ácido fórmico, 4- ácido cítrico, 5-ácido málico, 6-ácido tartárico, 7-ácido láctico, 8-ácido aspártico, 9-ácido succínico e 10-ácido acético 72

Figura 20 - Eletroferogramas de mistura de padrões de ácidos orgânicos (1,0 mmol L⁻¹) para o planejamento fatorial ácido ftálico/TRIS. Ácidos: 1- oxálico, 2- pirúvico, 3- fórmico, 4- cítrico, 5- málico, 6- tartárico, 7- láctico, 8- aspártico, 9- succínico e 10- acético 74

Figura 21 - Eletroferogramas de mistura de padrões na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ para o planejamento fatorial da pressão e tempo de injeção, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2-ácido fórmico, 3- ácido cítrico, 4- ácido málico, 5-ácido aspártico e 6-ácido succínico 77

Figura 22 - Eletroferogramas da amostra 1 no tempo zero com a adição de cada ácido orgânico correspondente na concentração de 1,0 mmol L⁻¹, sendo os picos: 1- oxálico, 2- cítrico, 3- málico, 4- aspártico e 5- succínico 80

Figura 23 - Eletroferogramas das amostras tempo zero, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2 - ácido cítrico, 3- ácido málico, 4 - ácido aspártico e 5 - ácido succínico..... 82

Figura 24 - Eletroferogramas das amostras no 8^a dia com a presença de cigarrinhas, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2 - ácido cítrico, 3- ácido málico, 4 - ácido aspártico e 5 - ácido succínico 84

Figura 25 - Representação da variação da concentração dos ácidos quantificados onde a barra azul representa a planta no “tempo zero” e barra vermelha a planta na presença do inseto por 8 dias..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico conjugado.....	18
Tabela 2 - Planejamento fatorial 3^2	36
Tabela 3 - Valores para ajuste do modelo da curva de AG	46
Tabela 4 - Valores para ajuste do modelo da 1ª curva de AO	51
Tabela 5 - Valores para ajuste do modelo da 2ª curva de AO	52
Tabela 6 - Concentração dos Ácidos Graxos Estufa versus Liofilização.....	60
Tabela 7 - Valores de F_r calculados para curva de AG	63
Tabela 8 - Resultado da quantificação do C18:2 cis-9 cis-12	65
Tabela 9 - Resultado da quantificação do C18:3 cis-9 cis-12 cis-15	66
Tabela 10 - Resultados dos valores de AG em GC e CE	71
Tabela 11 - Valores do planejamento fatorial ácido ftálico/TRIS.....	72
Tabela 12 - Planejamento fatorial 3^2 para a concentração de ácido ftálico e Tris.....	73
Tabela 13 - Resolução dos picos adjacentes para planejamento fatorial da concentração ácido ftálico/TRIS	75
Tabela 14 - Valores do planejamento fatorial pressão/tempo de injeção	76
Tabela 15 - Planejamento fatorial 3^2 para a pressão e tempo de injeção.....	76
Tabela 16 - Resolução dos picos adjacentes para planejamento fatorial pressão/tempo de injeção.....	78
Tabela 17 - Cálculo do fator de resposta para 1ª curva de AO.....	85
Tabela 18 - Cálculo do fator de resposta para 2ª curva de AO.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - Ácidos graxos

ANOVA - Análise de variância

AO - Ácidos orgânicos

Brij 35 - Éter laurílico de polioxietileno 23, do inglês: *Polyoxyethylenelaurylether*.

CE - Eletroforese capilar, do inglês: *Capillary Electrophoresis*

CLA - Ácido Linoléico Conjugado, do inglês: *Conjugated Linoleic Acids*

CZE - Eletroforese capilar de zona, do inglês: *Capillary Zone Electrophoresis*

CGE - Eletroforese capilar em gel

CITP - Isotacoforese capilar

CIEF - Focalização isoelétrica capilar

d.e. - Diâmetro externo do capilar

d.i. - Diâmetro interno do capilar

DAD - Arranjo de diodos, do inglês: *Diode Array*

EOF - Fluxo eletrosmótico, do inglês: *Electroosmotic Flow*

ECL - Comprimento de cadeia equivalente, do inglês *Equivalent Chain Length*

FI - Força iônica

CG - Cromatografia a gás, do inglês *Gas Chromatography*

CG-FID - Cromatografia a gás com detector de chama, do inglês *Flame Ionization Detector Gas Chromatography*

GC-EM - Cromatografia a gás acoplada com espectro de massa

GLC - Cromatografia gás-líquido

GSC - Cromatografia gás-sólido

HPLC - Cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*

IC - Cromatografia de íons, do inglês:

MS - Matéria Seca

MEKC - Cromatografia eletrocínética capilar micelar, do inglês: *Micellar Electrokinetic Capillary chromatography*

PI - Padrão interno

SDBS - Dodecilbenzenosulfonato do sódio, do inglês: *Sodium Dodecyl Benzenesulfonate*

LISTA DE SÍMBOLOS

- E – campo elétrico
- L_{ef} .- comprimento efetivo do capilar
- L_{tot} . - comprimento total do capilar
- T - temperatura da coluna cromatográfica
- r - raio iônico efetivo
- t_m - tempo de migração do analito
- V - voltagem
- ϵ_0 - constante de permissividade do vácuo
- ϵ_r - permissividade relativa da solução
- ζ - potencial zeta
- μ_a - mobilidade aparente
- μ_{ef} - mobilidade eletroforética
- μ_{eo} - mobilidade eletrosmótica
- μ_{obs} - mobilidade observada
- e_0 - velocidade eletrosmótica
- η – viscosidade
- q - carga do analito
- C_i - concentração dos íons do eletrólito
- Z_i - número de cargas elementares do íon do eletrólito
- F_r - Fator de resposta

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	17
1.1 - ÁCIDOS GRAXOS	20
1.1.1 - Importância da concentração dos ácidos graxos na dieta dos ruminantes.	21
1.1.2 - Análises dos precursores de CLA	23
1.2 - ÁCIDOS ORGÂNICOS	24
1.3 - INSTRUMENTAÇÃO	27
1.3.1 – Eletroforese Capilar	27
<i>1.3.1.1 – Fundamentos Teóricos</i>	28
1.3.1.1.1 - Fluxo eletroosmótico (EOF).....	28
1.3.1.1.2 - Mobilidade eletroforética	30
1.3.1.1.3 - Mobilidade eletro-osmótica	31
1.3.1.1.4 - Mobilidade aparente	32
1.3.1.1.5 - Modos de introdução da Amostra	33
1.3.1.1.6 - Detecção	33
1.3.2 - Cromatografia a gás	34
<i>1.3.2.1 - Instrumentação</i>	34
<i>1.3.2.2 - Detecção</i>	35
1.4 - PLANEJAMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTO	35
1.4.1 - Planejamento fatorial 3^k	36
1.4.2 - Ferramentas estatísticas	36
2 - OBJETIVO	37
2.1 - OBJETIVO ESPECÍFICOS	37
3 - PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1 - REAGENTES	38
3.2 - INSTRUMENTAÇÃO	38
3.3 – ANÁLISE DOS PROCESSOS DE SECAGEM DAS AMOSTRAS DE FORRAGEM	40

3.3.1 - Comparação do processo de secagem das amostras (Estufa <i>versus</i> Liofilização)	40
3.3.2 - Processo de secagem das amostras	41
3.4 – ANÁLISE DOS PRECURSORES DE CLA	41
3.4.1 - Soluções estoque	41
3.4.2 - Preparo da amostra	42
3.4.2.1 - <i>Preparo da amostra para análise em CZE</i>	42
3.4.2.2 - <i>Preparo da amostra para análise em GC</i>	44
3.4.3 - Quantificação dos ácidos graxos para CZE-UV	45
3.4.3.1- <i>Cálculo do Fator de Resposta para CZE-UV</i>	45
3.4.4 - Quantificação dos ácidos graxos para CG - FID	47
3.5 – ANÁLISE DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS	48
3.5.1 - Soluções estoque	48
3.5.2 - Preparo da amostra	48
3.5.2.1- <i>Preparo da amostra para análise em CZE-UV</i>	50
3.5.3- Quantificação dos ácidos orgânicos para CZE-UV	51
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 - ANÁLISES DE AG POR CZE-UV	54
4.1.1 - Otimização das condições de análises de AG por CZE-UV	54
4.1.2 - Processo de secagem Estufa <i>versus</i> Liofilização	59
4.1.3 – Cálculo dos Limites de Detecção e Quantificação	61
4.1.4 - Preparação das amostras para análise de AG por CZE-UV	62
4.1.4.1 - <i>Quantificação dos precursores de CLA por CZE</i>	62
4.1.5 - Análise dos precursores de CLA em amostra de braquiária por GC	68
4.1.5.1- <i>Preparação das amostras</i>	68
4.1.5.2- <i>Comparação entre GC e CE</i>	70
4.2 - ANÁLISE DE ALGUNS ÁCIDOS ORGÂNICOS EM AMOSTRA DE BRAQUIÁRIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA	71
4.2.1 - Otimização das condições de análises	71

4.2.2 - Relação dos ácidos orgânicos com os estresses causados nas plantas.....	78
<i>4.2.2.1- Preparação das amostras para análise no CZE</i>	<i>78</i>
<i>4.2.2.2 - Identificação dos ácidos orgânicos.....</i>	<i>79</i>
4.2.3 - Quantificação dos ácidos orgânicos.....	85
<i>4.2.3.1 - Determinação do teor de ácidos orgânicos nas amostras de braquiárias</i>	<i>86</i>
5 - CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXO.....	98

1 - INTRODUÇÃO

Plantas forrageiras ou forragens podem ser definidas como plantas inteiras ou partes que servem de alimento aos animais domésticos e silvestres. Assim, as forragens são as partes comestíveis das plantas utilizadas como alimento pelos animais em pastejo, ou ainda, colhidas para arraçoamento em condição fresca ou conservada.

O gênero *Brachiaria* apresenta em torno de 100 espécies de origem essencialmente africana, sendo que as forrageiras mais importantes no Brasil são *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruzizienses* e *B. humidicula* (PEREIRA, 1998). Estima-se que sejam cultivadas, 180 milhões de hectares com pastagens sendo, aproximadamente, 84 milhões cobertos com gramíneas do gênero *Brachiaria* (PEREIRA, 1998), representando cerca de 85% das áreas de pastagens cultivadas no Brasil (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

Embora não seja a espécie mais cultivada, a demanda por sementes da *B. ruzizienses* vêm aumentando de forma acentuada nos últimos anos com o incremento da integração entre agricultura, pecuária e floresta. Esta espécie é sexual e diploide, ao contrário das demais que são, na grande maioria, poliploides e apomíticas, o que possibilita a realização de cruzamentos e geração de variabilidade para seleção de materiais superiores (SOUZA SOBRINHO, 2005; SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2009).

A produção de leite e carne de bovinos no Brasil está baseada, principalmente, na utilização de pastagens, por constituírem alimento de menor custo para o produtor. Sendo assim, torna-se importante o fornecimento de forragens com boa qualidade nutricional, pois quanto maior for a qualidade nutricional da forragem, maior será a qualidade da carne e do leite.

Dentre todas as substâncias presentes na forragem, a fração lipídica, comumente referida como extrato etéreo, compreende de 2 a 3% da matéria seca, sendo aproximadamente metade desta fração constituída por ácidos graxos (AG) esterificados na forma de glicolipídios e fosfolipídios. Embora os teores e as proporções relativas dos AG possam variar em função da forragem (espécie/cultivar) e de outros fatores (idade/estágio de crescimento da planta), os AG tipicamente encontrados em maiores concentrações são: ácido α -linolênico (C18:3 cis-9 cis-12 cis-15), o ácido linoléico (C18:2 cis-9 cis-12) e ácido palmítico (C16:0).

A identificação de espécies/cultivares de forrageiras com maiores teores de C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 e C18:2 cis-9 cis-12, bem como das condições de manejo que proporcionem maiores teores destes AGs, têm sido objeto de estudo na área de ciência animal, uma vez que estes compostos são precursores de um grupo de AG com propriedades benéficas à saúde, denominados ácidos linolêicos conjugados (CLA, do inglês: *Conjugated Linoleic Acids*).

Os CLA compreendem um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido linolêico (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, sendo 27 isômeros já identificados de CLA, os quais estão descritos na Tabela 1 (RULE *et al.*, 2002).

O CLA é um ácido graxo encontrado apenas em produtos de origem animal (carne e laticínios) e não pode ser produzido pelo organismo humano, sendo assim os produtos lácteos e seus derivados são a principal fonte de CLA na dieta humana (SEHAT *et al.*, 1999).

Tabela 1 - Isômeros posicionais e geométricos do ácido linolêico conjugado

cis, trans	trans, cis	cis,cis	trans, trans
cis-13, trans-15	trans-12, cis-14	cis-12, cis-14	trans-13, trans-15
cis-12, trans-14	trans-11,cis-13	cis-11, cis-13	trans-12, trans-14
cis-11, trans-13	trans-10, cis-12	cis-10, cis-12	trans-11, trans-13
cis-10, trans-12	trans-9, cis-11	cis-9, cis-11	trans-10, trans-12
cis-9, trans-11	trans-8, cis-10	cis-8, cis-10	trans-9, trans-11
cis-8, trans-10	trans-7, cis-9	cis-7, cis-9	trans-8, trans-10
cis-7, trans-9	trans-6, cis-8		trans-7, trans-9

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O aumento expressivo da concentração do CLA no leite pode ser obtido por meio do fornecimento de dietas com elevados teores de C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 e C18:2 cis-9 cis-12 aos animais. Assim, se dá a importância de se monitorar a qualidade nutricional da forragem e, ao mesmo tempo, é interessante monitorar a produtividade das pastagens, pois existem alguns fatores externos que podem diminuir drasticamente a produtividade, o desenvolvimento (FRENCH *et al.*, 2000; RULE *et al.*, 2002) e a qualidade nutricional da forragem.

Esses fatores externos, aos quais as plantas constantemente são expostas, são conhecidos como condições desfavoráveis ou estresses. Os estresses são classificados como: estresses abióticos (oscilações drásticas de temperatura, radiação ultravioleta, umidade, acidez do solo, etc) e estresses bióticos (vírus, insetos, etc).

No caso das forrageiras, esses estresses acarretam em um grande prejuízo para os agricultores que utilizam a pastagem como fonte principal da dieta dos ruminantes (CARDONA *et al.*, 2004).

As plantas criam diferentes mecanismos de defesa para se protegerem dessas condições ambientais adversas (MA, J. F., 2000; MA, J.F., 2000; KARSTEN; BAER, 2009). Durante o processo do mecanismo de defesa, as plantas produzem ou alteram a concentração de algumas substâncias com a função de proteção. Dentre essas substâncias, relacionadas com o mecanismo de defesa, pode-se destacar os ácidos salicílico, benzoico e jasmônico, etileno, compostos fenólicos e alguns ácidos orgânicos (AO) (CREELMAN; MULLET, 1997; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2010).

Entre os diferentes estresses que afetam a produtividade e disponibilidade de forragem no Brasil, o ataque de pragas, em especial, as cigarrinhas das pastagens (VALÉRIO; JELLER; PEIXER, 1997) e as condições químicas dos solos, expressa basicamente pela alta concentração de alumínio (MARTINS *et al.*, 2010), podem ser considerados os mais limitantes.

O ataque das cigarrinhas das pastagens é um tipo de estresse biótico que afeta diretamente as pastagens em todo território nacional. Estudos mostraram que milhões de hectares estabelecidos com várias cultivares do gênero *Brachiaria* têm sofrido sensíveis perdas ocasionadas por esse grupo de insetos, pois eles são capazes de reduzir drasticamente a produção e a qualidade nutricional das pastagens (VALÉRIO; JELLER; PEIXER, 1997), sendo esse um problema muito comum, principalmente durante as estações chuvosas. Sabe-se que entre as espécies de braquiárias, a mais suscetível é a *Brachiaria decumbens* e a mais resistente é a *Brachiaria brizantha*. Sendo assim, estudos têm sido desenvolvidos para análises dessas substâncias no intuito de identificá-las e quantificá-las, para se relacionar as mesmas com a resistência das plantas, e encontrar espécies mais resistentes e suscetíveis a esses estresses (VALÉRIO; JELLER; PEIXER, 1997).

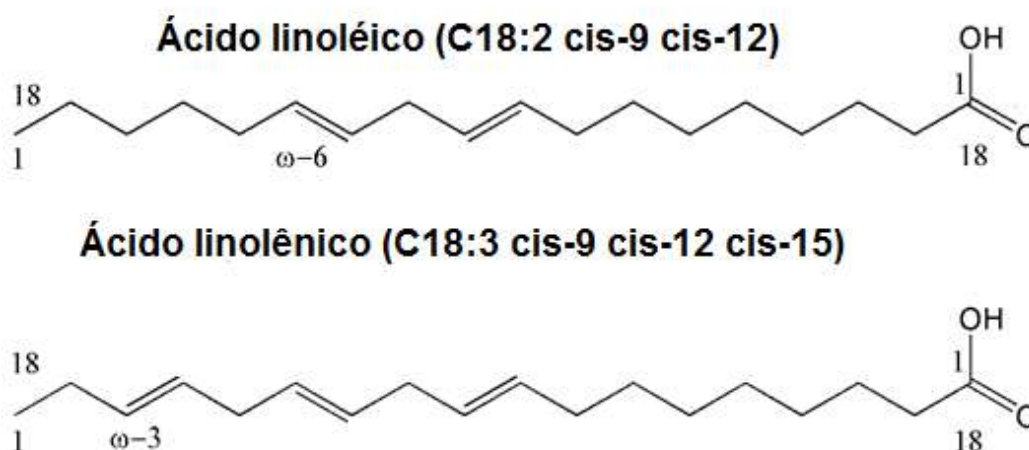
1.1 - ÁCIDOS GRAXOS

Os AG são definidos, de forma genérica, 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. Além disso, na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia hidrocarbonada longa podendo ser saturada, monoinsaturada (no caso de conter uma única insaturação) ou poli-insaturada (no caso de conter mais de uma insaturação). O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula.

Os AG podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes na molécula, sendo denominados AG de cadeia curta aqueles cuja cadeia carboxílica possua de 2 a 4 átomos de carbono, de cadeia média com 6 a 10 átomos de carbono e de cadeia longa com mais de 12 átomos de carbono, como são considerados os ácidos linoleico e linolênico que estão representados na Figura 1 (CURI *et al.*, 2002). Entre as diferentes nomenclaturas dos AG podemos citar, a nomenclatura ÔMEGA (ω), que é definida segundo a numeração do carbono associada à primeira dupla ligação (3º, 6º ou 9º), a partir do radical metila. Esta classificação implica em características estruturais e funcionais destes ácidos graxos.

Os AG precursores do CLA são conhecidos por essa classificação como: o ácido linoléico cis-9 cis-12 como ômega-6 ($\omega 6$) e o ácido α -linolênico cis-9 cis-12 cis-15 como ômega-3 ($\omega 3$).

Figura 1 - Estrutura dos ácidos graxos precursores do CLA



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

1.1.1 - Importância da concentração dos ácidos graxos na dieta dos ruminantes

A gordura do leite de ruminantes contém inúmeros componentes bioativos com efeitos benéficos à saúde humana, cujas concentrações são fortemente influenciadas pela dieta.

Estudos têm demonstrado que a concentração destes componentes no leite varia amplamente em função da dieta fornecida aos animais. Em particular, o fornecimento de forragens frescas de elevada qualidade nutricional tem se mostrado uma estratégia eficaz de se obter aumento das concentrações destes componentes bioativos presentes na gordura do leite (COLLOMB *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2004) levando, portanto, à produção de um leite e produtos lácteos com elevado potencial nutracêutico.

A importância da ingestão de forragens frescas para a secreção de leite com elevados teores de CLA é reconhecida há décadas (MOORE, 1948; KUZDZAL-SAVOIE; KUZDZAL, 1961).

Trabalhos publicados sobre o assunto mostraram que os teores de C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 e de CLA no leite de animais alimentados a pasto foram de 2 a 4 vezes superiores aos observados no leite de vacas recebendo dietas à base de forragens conservadas e concentrados (ELGERSMA; TAMMINGAB; ELLENC, 2006;

KHANAL; DHIMAN; BOMAN, 2008; DEWHURST *et al.*, 2006). Entretanto, as maiores respostas têm sido observadas quando pastos de elevada qualidade nutricional são oferecidos, o que é consistente com a observação de que o teor total de AG totais (g/kg de MS) e o teor de ácido α -linolênico são reduzidos com o avanço do estágio de maturação da forragem (DEWHURST *et al.*, 2006). As braquiárias fornecem lipídeos essenciais e AG na dieta dos ruminantes. Dentre os AG, o ácido α -linolênico (C18:3 cis-9 cis-12 cis-15) é o de maior concentração representando de 50 a 75% do total de ácidos graxos, enquanto os ácidos linoléico (C18:2 cis-9 cis-12) e palmítico (C16:0) são os mais abundantes depois do ácido α -linolênico. Dentre os AG presentes nas braquiárias, o C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 e o C18:2 cis-9 cis-12 são os de maiores interesse do ponto de vista quantitativo, uma vez que são os precursores do CLA (BOUFAÏED *et al.*, 2003).

Em particular, grande atenção tem sido direcionada para o CLA, desde a descoberta de suas propriedades anticarcinogênicas, em estudos conduzidos há mais de duas décadas. Desde então, inúmeros experimentos conduzidos com animais e em cultura de tecido humano têm demonstrado outros efeitos biológicos potencialmente benéficos à saúde humana de certos isômeros de CLA, particularmente, CLA cis-9 trans-11 e o CLA trans-10 cis-12. Tais efeitos incluem: redução na formação de ateromas (atividade antiaterogênica), restauração da sensibilidade à insulina (efeito antidiabetogênico), redução na deposição de gordura corporal (ação antiobesidade) e redução dos efeitos catabólicos desencadeados pela resposta imunológica. Diante das crescentes evidências científicas dos efeitos positivos à saúde humana promovidos pelo CLA, e pelo fato da gordura do leite ser a principal fonte de CLA cis-9 trans-11 na dieta humana, grandes esforços têm sido feitos para aumentar a concentração deste ácido graxo no leite.

O CLA cis-9 trans-11 é o principal isômero de CLA encontrado no leite (75 a 90% do CLA total) e sua concentração na gordura do leite pode variar amplamente, com valores de 0,2 a 54 g/100g de AG totais como observados na literatura (BAUMAN; GRIINARI, 2003; EIFERT *et al.*, 2006).

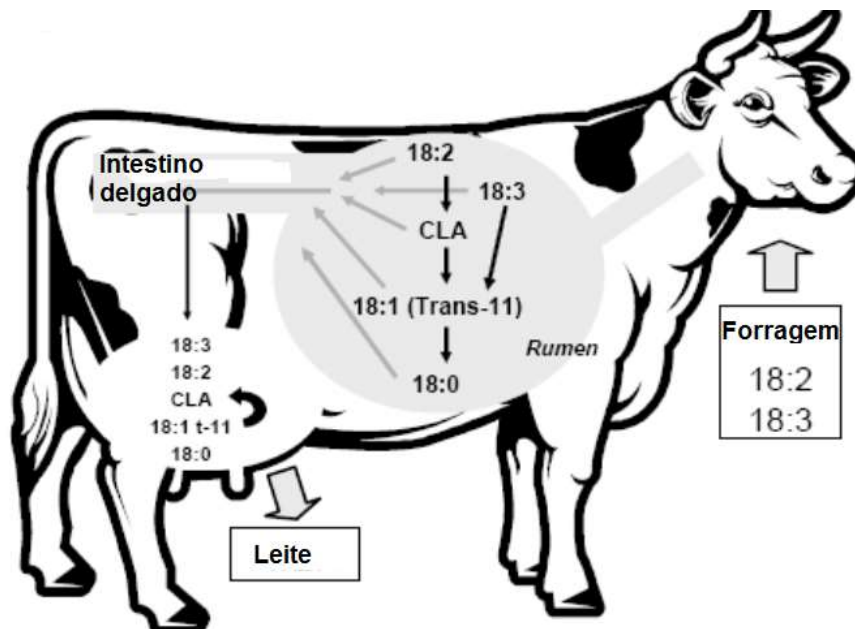
Dos fatores que contribuem para esta variação, a dieta é indubitavelmente o mais importante. Por meio da manipulação da dieta de vacas leiteiras, por exemplo, o teor de CLA no leite pode variar mais do que cinco vezes, ao passo que a influência de fatores como: raça, ordem de parição e estágio de lactação é muito menos significativa. Com

relação à dieta, vários estudos demonstraram que ruminantes mantidos a pasto apresentam um teor de CLA mais elevado do que aqueles recebendo dietas típicas de animais confinados de alta produção (forragens conservadas e concentrados à base de grãos e farelos protéicos) (CHILLIARD; FERLAY; DOREAU, 2001; COLLOMB *et al.*, 2006; DEWHURSTA *et al.*, 2006).

1.1.2 - Análises dos precursores de CLA

Estudos feitos em braquiárias de clima tropical comprovam que o ácido α -linolênico é o principal precursor para síntese de CLA em vacas a pasto (via desaturação endógena do C18:1 trans-11, produzido pela bio-hidrogenação do C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 no rúmen) (KAY *et al.*, 2004), pois maiores teores deste componente nas forragens estão, geralmente, associados a maiores teores de CLA no leite. A Figura 2 representa esquematicamente o que acontece dentro do ruminante após ingerir uma dieta contendo C18:2 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15.

Figura 2 - Via metabólica proposta para biossíntese do CLA (C18:2 cis-9 trans-11)



Fonte: ADAPTADO (KENNELLY; BELL, 2007)

A análise desses ácidos é feita por cromatografia gasosa (GC, do inglês: *gás chromatography*), mas nos últimos anos, a eletroforese capilar (CE, do inglês: *capillary electrophoresis*) tem se mostrado uma técnica alternativa para análises desses ácidos, uma vez que não é necessária a etapa de derivatização do analito. Os AG de interesse podem ser analisados por detecção direta, pelo fato de apresentarem uma ou mais insaturação na sua cadeia carbônica, sendo assim, eles absorvem no comprimento de onda de 200 nm (PORTO; DE SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011).

A análise por detecção direta não requer a presença de um cromóforo no eletrólito, pois a presença da insaturação no analito faz com que eles absorvam radiação na região do UV- Vis.

1.2 - ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos (AO) são compostos que contêm em sua estrutura o grupamento carboxila, composto por um átomo de carbono ligado a um átomo de oxigênio por ligação dupla e a um grupo de hidroxila, por ligação simples (SNYDER, 1995).

O organismo humano produz alguns tipos de AO, no entanto, podem ocorrer erros no metabolismo desses compostos, que são os casos das acidemias e acidúrias orgânicas. Essas doenças são hereditárias e se caracterizam pelo acúmulo de AO e derivados nos tecidos, sangue, urina, além de outros líquidos corpóreos.

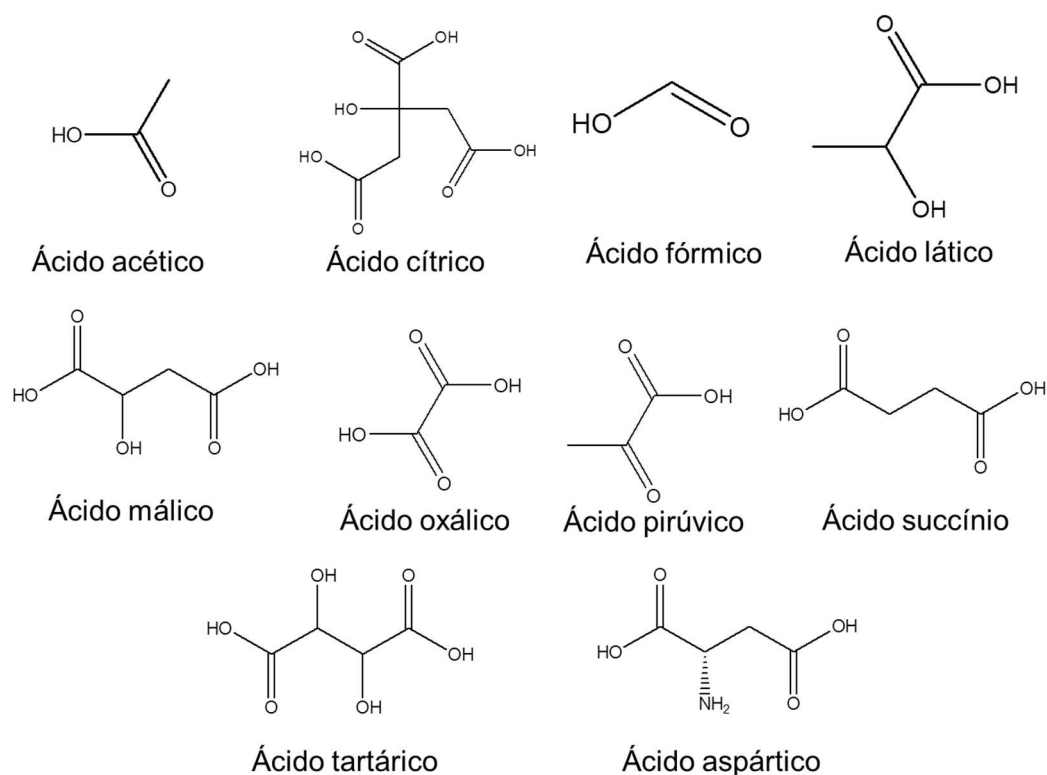
Os AO são largamente aplicados a dietas de animais, como bovinos, suínos e aves de corte. Essa técnica facilita a digestão de proteínas, a absorção de nutrientes no intestino e diminui o pH estomacal, evitando a proliferação exagerada de microorganismos patogênicos, melhorando o trânsito intestinal. Estimulando a produção e a secreção de sucos pancreáticos e a atividade de enzimas proteolíticas é potencializada e isso interfere diretamente no desenvolvimento animal.

Na sua forma sintética são amplamente usados na indústria de alimentos como aditivos, sendo agentes de processamento, para controlar a alcalinidade de muitos produtos, podendo agir como tampões ou simplesmente como agentes neutralizantes ou conservantes, onde podem atuar como agentes antimicrobianos até antioxidantes (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002).

As raízes liberam muitos AO (cítrico, málico, oxálico, butírico, acético, láctico, etc.), cuja concentração depende de fatores genéticos da planta e das condições de estresse às quais estas são submetidas (JONES, 1998).

Os principais AO encontrados nas plantas são: acético, cítrico, fórmico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico, tartárico e aspártico (WANG *et al.*, 2003). Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura dos ácidos orgânicos mais comuns nas forrageiras



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Com base na literatura, sabe-se que as forrageiras do gênero *Brachiaria* constituem as principais fontes de alimento para os rebanhos bovinos, e estas têm sido seriamente atacadas por insetos, que vêm atingindo altos níveis populacionais. Estes insetos promovem sensíveis reduções na capacidade de suporte das pastagens no período chuvoso, época em que as forrageiras deveriam estar disponíveis em quantidade

e qualidade ideais para os animais expressarem a sua maior produção de leite ou ganho de peso (VALÉRIO, 2005).

As cigarrinhas das pastagens são consideradas uma praga limitante na produção de gramíneas forrageiras no Brasil. O estresse causado por altas infestações desses insetos tem influência direta na quantidade e na qualidade da forragem produzida pelas gramíneas, pois os pastos atacados por esses insetos tornam-se amarelados, com muita fibra e baixo valor nutricional para os animais.

As plantas apresentam diferentes e complexos mecanismos de defesa, que atuam em resposta aos estresses, sendo que os AO e compostos fenólicos são substâncias, que estão normalmente associadas a mecanismos de defesa das plantas, sua concentração ou mesmo a presença destas substâncias, tornam as plantas mais resistentes ou mais suscetíveis a essas condições desfavoráveis. Níveis de AO variam entre as espécies, cultivares, ou mesmo entre os tecidos da planta, quando cultivada em condições idênticas.

Atualmente, os métodos mais utilizados para determinação de ácidos orgânicos incluem a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), a Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (GC-MS, Mass Spectroscopy Detector Gas Chromatography) e a cromatografia de íons (IC, Ion Chromatography) (KLAMPFL; BUCHBERGER; HADDAD, 2000a; b). Apesar dessas técnicas apresentarem alta sensibilidade e especificidade analítica, a preparação da amostra requer um pré-tratamento, derivatização e tempos de separação extensos. Sendo assim nos últimos anos tem crescido o interesse de encontrar métodos alternativos que supere algumas das desvantagens dos métodos cromatográficos.

A Eletroforese Capilar de Zona (CZE, Capillary Zone Electrophoresis), nos últimos anos tem se mostrado uma técnica atrativa por apresentar uma alta eficiência, curto tempo de análise, baixo volume de amostra necessário para análise e, normalmente, baixo consumo de reagentes. Tendo como interesse encontrar uma técnica alternativa para análises de ácidos orgânicos em plantas, a CZE se mostrou bem promissora, por ser capaz de analisar 10 ácidos orgânicos em aproximadamente 5 minutos (VAZ *et al.*, 2012).

1.3 - INSTRUMENTAÇÃO

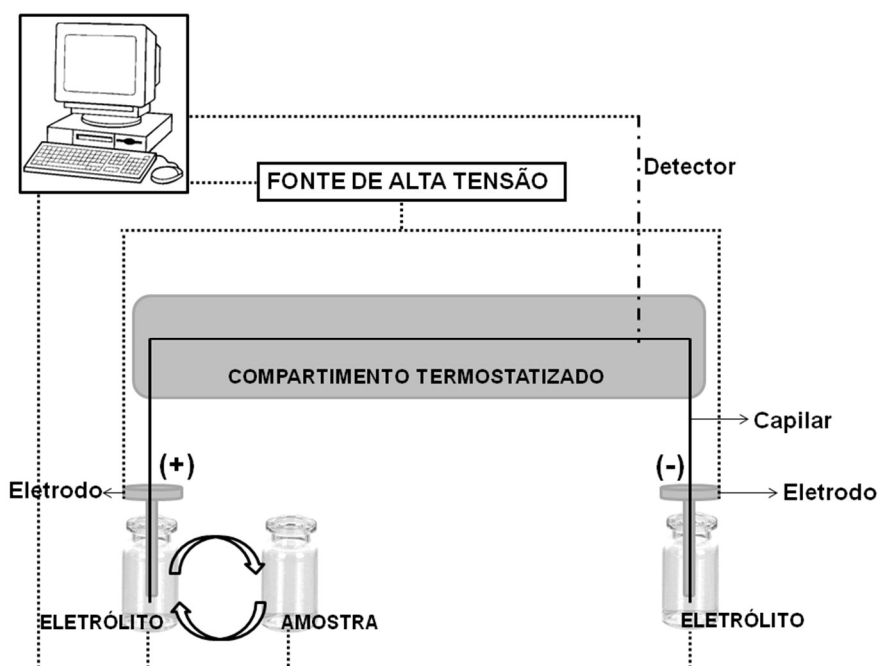
1.3.1 – Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (CE) é definida como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados e espécies ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico da ordem de kVolts/m tangenciando uma coluna capilar a qual contem em seu interior uma solução de eletrólito conveniente, normalmente tamponada, atuando como canal de migração (BAKER, D.R., 1995; TAVARES, M.F.M., 1996).

Historicamente, esta técnica foi desenvolvida por Tiselius, no início da década de 30, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo, através do método da fronteira móvel (TAVARES, M. F. M., 1996). Por este trabalho, foi concedido a Tiselius o prêmio Nobel de 1948. Mas foi somente nos anos de 1990, com a implementação das técnicas capilares, que a eletroforese evoluiu de um formato de manipulação intensiva para um formato totalmente automatizado, ganhando o status de técnica analítica de rotina (Tavares, 1996).

A CE tem como um dos aspectos mais importantes sua simplicidade na instrumentação. O sistema de CE consiste na aplicação de uma alta voltagem (positiva ou negativa), 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 fluoropolímero), um par de eletrodos (geralmente de platina, material inerte), 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. Os comandos para controle do equipamento, aquisição e tratamento de dados são realizados mediante interface com um computador (TAVARES, M.F.M., 1996). A Figura 4 mostra um esquema geral de um aparelho de CE.

Figura 4 - Representação de um equipamento de eletroforese capilar



Fonte: (OLIVEIRA *et al.*, 2014)

1.3.1.1 – Fundamentos Teóricos

Separações por CE são feitas de vários modos: eletroforese capilar de zona (CZE), eletroforese capilar em gel (CGE), isotacoforese capilar (CITP) e focalização isoelétrica capilar (CIEF) (BAKER, D.R., 1995; TAVARES, M.F.M., 1996; SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A., 2002).

Para entender como ocorre o mecanismo de separação pela técnica de CE alguns conceitos são importantes.

1.3.1.1.1 - Fluxo eletrosmótico (EOF)

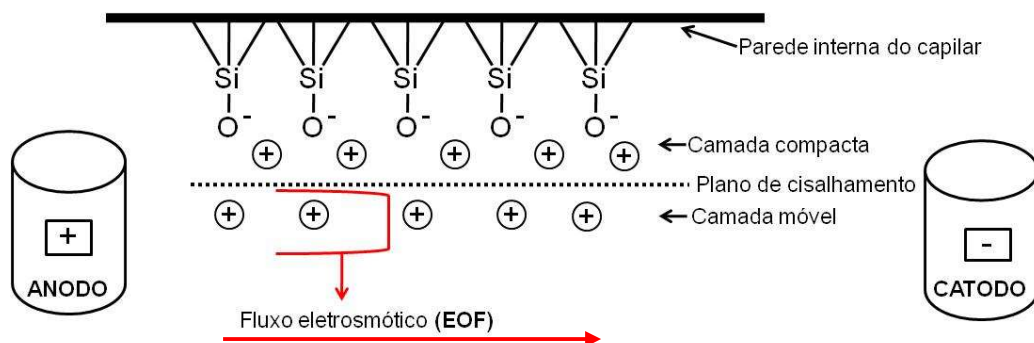
Quando uma alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida ou teflon® contendo uma solução tampão, que se move através do capilar sob a influência de um campo elétrico; este fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico. Sob

a aplicação de voltagem positiva na injeção, utilizando capilar de sílica fundida, a solução tampão flui do reservatório de entrada através do capilar e é descartada no reservatório de saída, ou seja, o fluxo eletrosmótico normal vai do ânodo (+) para o cátodo (-).

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. Enquanto que nos capilares de sílica fundida os grupos silanóis (Si-OH), de caráter ácido (pKa 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 compacta e a outra menos compacta 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, esse processo está esquematizado na Figura 5.

Figura 5 - Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do ânodo (+) para o cátodo (-) (fluxo normal)



Fonte: ADAPTADO (BAKER *et al.*, 1995)

O controle adequado do EOF é de grande importância para a eficiência da separação, por isso 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.

1.3.1.1.2 - Mobilidade eletroforética

A mobilidade eletroforética (μ_{ef}), é o fenômeno exclusivo de um soluto, correspondente a sua velocidade de migração (v_{ef}) 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 hidratado. 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, para íons de mesmo tamanho, quanto maior a carga, maior a força motriz e maior a velocidade de migração e para íons de mesma carga, quanto menor o íon hidratado, menor o atrito e maior a velocidade de migração (SILVA *et al.*, 2007).

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

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

Onde: v_{ef} é a velocidade eletroforética, μ_{ef} é a mobilidade eletroforética, E é o campo elétrico aplicado em $V\ cm^{-1}$, q é a carga do analito em C , η é a viscosidade da solução tampão em $N\ s\ m^{-2}$ e r é o raio iônico efetivo em pm ($10^{-12}\ m$).

1.3.1.1.3 - Mobilidade eletro-osmótica

A distribuição não homogênea dos íons na camada difusa produz um gradiente de velocidade, conhecido como velocidade eletroosmótica (v_{ef}). A v_{ef} pode ser calculada de modo simplificado pela equação de Helmholtz-Smoluchowski (Equação 3) (BAKER, D. R., 1995).

$$\vec{v}_{eo} = -\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (3)$$

Onde: ϵ_r é a permissividade relativa da solução, ϵ_0 é a constante de permissividade do vácuo ($\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$), ζ é o potencial desenvolvido no plano de cisalhamento, denominado potencial zeta, em V, E é o campo elétrico aplicado em V cm^{-1} , η é a viscosidade da solução tampão em N s m^{-2} .

Como está descrito na equação (3), a mobilidade eletroosmótica (μ_{eo}), em $\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pode ser representado pela Equação 4.

$$\vec{\mu}_{eo} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (4)$$

A mobilidade eletroosmótica pode ser otimizada a partir do controle, por exemplo, da força iônica (FI) e do pH da solução do eletrólito. A FI depende da concentração e da carga dos íons em solução conforme demonstra a equação 5.

$$FI = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (5)$$

Onde: C_i é a concentração dos íons do eletrólito em mol L^{-1} e Z_i é o número de cargas elementares do íon do eletrólito.

O pH pode influenciar na mobilidade eletroosmótica em função da carga (e_a) dos grupos silanóis da superfície interna do capilar. Portanto, em um pH mais elevado,

maior será o número de grupos silanóis desprotonados, aumentando, assim, o valor do ζ e da μ_{eo} (Equação 6). (BAKER, D. R., 1995).

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e_a}{\epsilon_r} \quad (6)$$

Onde: ζ é o potencial desenvolvido no plano de cisalhamento, denominado potencial zeta, em V, δ é a espessura da dupla camada e e_a é a carga por unidade de área da superfície interna do capilar.

1.3.1.1.4 - Mobilidade aparente

A mobilidade aparente ($\vec{\mu}_a$) também conhecida como mobilidade observada ($\vec{\mu}_{obs}$), é a soma vetorial da mobilidade eletroforética ($\vec{\mu}_{ef}$) e a mobilidade eletroosmótica ($\vec{\mu}_{eo}$) conforme demonstra a equação 7. (BAKER, D. R., 1995).

$$\vec{\mu}_a = \vec{\mu}_{ef} + \vec{\mu}_{eo} \quad (7)$$

Experimentalmente, pode-se determinar o valor da μ_{obs} através da injeção de uma solução contendo o analito de interesse e conhecendo as dimensões do capilar, a voltagem aplicada e o tempo de migração da espécie de interesse, conforme demonstrado na Equação 8.

$$\mu_{obs} = \frac{L_{ef}L_{tot}}{t_m V} \quad (8)$$

Onde: μ_{obs} é mobilidade observada, L_{ef} é o comprimento efetivo do capilar em cm, L_{tot} é o comprimento total do capilar em cm, t_m é o tempo de migração de cada analito em s e V é a voltagem aplicada em V (volts).

1.3.1.1.5 - Modos de introdução da Amostra

A introdução da amostra em CE utiliza volumes reduzidos, na ordem de 1 a 100 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. Neste trabalho foi realizada a injeção hidrodinâmica.

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 (TAVARES, 1997)

1.3.1.1.6 - Detecção

Pode-se encontrar vários tipos de detectores em CE como: índice de refração, absorção na região do UV-Vis, condutividade, potenciometria, amperometria, fluorescência, espectrometria de massas, dentre outros. A escolha do tipo de detecção vai depender da análise em particular, incluindo a sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e ruído (TAVARES, 1997).

O sistema de detecção empregado neste trabalho foi a detecção direta e indireta na região visível do ultravioleta (UV-VIS). A detecção direta foi empregada para análises dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, que devido a presença das insaturações apresentam absorvidade molar no comprimento de 200 nm e a detecção indireta foi empregada para análises dos ácidos orgânicos que apresentam baixa absorvidade molar, assim, foi utilizado um agente cromóforo (ácido ftálico), que se trata de um composto orgânico com grupos funcionais contendo insaturações que absorvem na região do ultravioleta (SKOOG; CROUCH; PASQUINI, 2009).

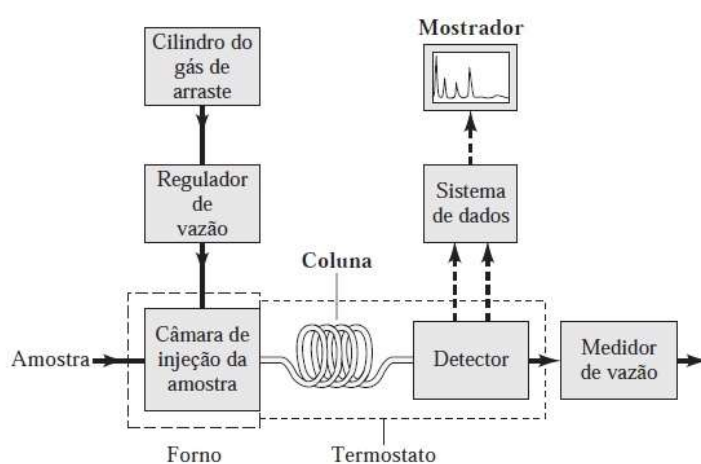
1.3.2 - Cromatografia a gás

Na GC, a amostra é vaporizada e injetada na extremidade de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo gás inerte que atua como fase móvel. Em contraste, como muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, ou seja, sua única função é transportar o analito através da coluna (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002).

1.3.2.1 - Instrumentação

Um esquema simplificado do equipamento de GC está representado na Figura 6. Reguladores de pressão, manômetros e medidores de vazão são necessários para se controlar a vazão do gás de arraste contido em um cilindro externo ao equipamento. A injeção da amostra é feita através de seringas calibradas, podendo ser feita manual ou automaticamente. A coluna deve ser aquecida para proporcionar uma pressão de vapor que possibilite a eluição dos analitos em tempo razoável e, portanto, fica inserida em um forno, onde a temperatura pode ser programada. Em seguida, um detector apropriado faz a interface dos dados obtidos no equipamento com um software.

Figura 6 - Representação de um equipamento de cromatografia a gás



Fonte: (SKOOG; CROUCH; PASQUINI, 2009)

1.3.2.2 - Detecção

O sistema de detecção empregado neste trabalho foi o detector de ionização em chama (do inglês, *Flame Ionization Detector* – FID).

O FID é o mais empregado em aplicações de GC. O processo de detecção ocorre quando o efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio. A maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolizados à temperatura de uma chama ar/hidrogênio. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. Poucas centenas de volts são aplicadas entre a ponta do queimador e um eletrodo, localizado acima da chama, para coletar os íons e elétrons (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002).

1.4 - PLANEJAMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTO

Para executar um planejamento fatorial, é preciso, em primeiro lugar, especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores (ou as versões, nos casos qualitativos) que serão empregados nos experimentos. Cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definido, é um ensaio experimental. Em geral, se houver n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2, ..., e n_k do fator k, o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$, assim será possível investigar todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores em cada ensaio. Para estudar o efeito do fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isso obviamente implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Um planejamento em que todas as variáveis são estudadas em apenas **dois níveis** é, portanto, o mais simples de todos os planejamentos. Havendo k fatores, isto é, k variáveis controladas pelo experimentador, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamado por isso de planejamento fatorial 2^k (BOX; WILSON, 1951).

1.4.1 - Planejamento fatorial 3^k

Planejamentos de três níveis são fáceis de executar e úteis para uma investigação preliminar, quando se deseja selecionar os fatores mais relevantes. Para k fatores, isto é, k variáveis controladas pelo analista, um planejamento completo em três níveis exige a realização de $3 \times 3 \times \dots \times 3 = 3^k$ ensaios diferentes, sendo denominado planejamento fatorial 3^k . Portanto, para um planejamento fatorial 3^2 , serão realizados 9 experimentos em todas as combinações possíveis. A lista dessas combinações é chamada matriz de planejamento que está expressa na Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento fatorial 3^2

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	-	-	-	0	0	0	+	+	+
B	-	0	+	-	0	+	-	0	+

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Com a realização do planejamento fatorial, aumenta a possibilidade de encontrar uma condição ideal para a análise, pois nas maioria das vezes, com apenas uma pequena variação da condição inicial já se tem uma condição ótima.

1.4.2 - Ferramentas estatísticas

Os softwares Microsoft Excel 2010 (Suplemento – Action) e SPSS Statistics 8.0 foram utilizados para cálculo dos pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência dos modelos calculados. A comparação dos resultados obtidos entre GC e CZE foi feita utilizando teste t-student para par de médias (MASSART *et al.*, 1997; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

2 - OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a otimização de metodologia analítica alternativa para análise de ácidos orgânicos e ácidos graxos precursores de CLA em amostras de braquiárias, utilizando a CZE.

2.1 - OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Avaliar a técnica de CE como método alternativo para análise dos precursores de CLA (C18:2 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15) em amostras braquiárias ruziziensis.
- Utilizar a técnica de eletroforese capilar para identificar e quantificar AO (acético, oxálico, cítrico, málico, fórmico, aspártico, succínico, láctico, pirúvico e tartárico) em braquiárias das espécies (decumbens, brizantha e ruzizienses) submetidas a estresses bióticos (presença de cigarrinhas).
- Estudo da influencia do método de secagem (estufa versus liofilizador) sobre o perfil de AG em duas amostras de forragens.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, MA, EUA). Os reagentes acetonitrila (ACN), metanol, ácido clorídrico (HCl) e tetraborato de sódio foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de sódio (Na₂SO₄) obtido da MERCK (Darmstadt, na Alemanha), os reagentes Brij 35®, hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de Acetila (CH₃COCl), carvão ativado, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), metanol anidro grau HPLC, heptano para CG, carbonato de potássio anidro (K₂CO₃) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de ácido eláidico (C18:1 trans-9), ácido linoléico (C18:2 n-6), ácido α -linolênico (C18:3 n-3), ácido nonadecanóico (C19:0), padrão FAME 37 (mistura de ésteres metílicos), ácido acético, ácido aspártico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido málico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido tartárico e ácido propiônico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2 - INSTRUMENTAÇÃO

As análises dos precursores do CLA, por CZE foram realizadas no equipamento de eletroforese capilar da Agilent modelo CE7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EUA), disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com arranjo de diodos (DAD), com detecção direta por UV em 200 nm, temperatura controlada por ar forçada 25°C e aquisição dos dados realizada pelo software HP ChemStation . As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (25 mbar por 5 s), o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal e voltagem constante de + 26 kV. Foi utilizado capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (com 48,5 cm de comprimento total, sendo 40 cm de comprimento efetivo) e capilar com revestimento externo do polímero de flúor (TSU - Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA) (34 cm de comprimento total sendo 25,5 cm de comprimento

efetivo), ambos com 75 μm de diâmetro interno (d.i) e 375 μm de diâmetro externo (d.e).

A análise dos AO foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar da Beckam (Beckman Coulter, modelo P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System fabricado na Bélgica) disponível na Embrapa Gado de Leite, equipado com DAD, comprimento de onda em 240 nm, temperatura controlada por líquido refrigerante (capillary cartridge coolant) no interior do cartucho em 25 °C e a aquisição dos dados em software 32Karat 8.0. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (0,2 psi por 3 s) e o sistema foi operado em polaridade invertida e voltagem constante de -15 kV. Foi utilizado capilar de sílica fundida de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), com 50,2 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm de (d.i) e 375 μm de (d.e).

Antes do uso do CE, os capilares novos foram condicionados através de *flush* com NaOH 1.0 mol L⁻¹ (30 min), água purificada MiliQ (15 min.) e solução do eletrólito (20 min.). Entre as corridas, para análise dos precursores do CLA, houve a limpeza do capilar com NaOH 0,5 mol L⁻¹ (2 min.), água purificada MiliQ (2 min.) e solução de eletrólito (2 min.) e para análise dos AO, houve a limpeza do capilar com NaOH 0,5 mol L⁻¹ (1 min.), água purificada MiliQ (1 min.) e solução de eletrólito (2 min.) Este condicionamento mostrou-se satisfatório para repetibilidade dos tempos de análise e resolução dos picos.

Para determinação dos AG precursores de CLA, por GC, utilizou-se a metodologia de acordo com trabalhos já publicados (SUKHIJA; PALMQUIST, 1988; PALMQUIST; JENKINS, 2003) . As análises foram executadas em um equipamento GC Agilent modelo 6890N, com detector de ionização de chama (FID), disponível na Embrapa Gado de Leite.

As condições de trabalho foram: injeção com *split*, operado com uma razão de de 1:50 e coluna capilar (HP-FFAP, 25m x 0,2mm x 0,33 μm), fase estacionária de ácido modificado polietilenoglicolnitroterafitálico, utilizando H₂ como gás de arraste a 1,0 mL min⁻¹. Detector FID a uma temperatura de 250 °C, gás de *makeup* N₂ (30 mL/min) e relação 10:1 Ar/H₂, amostrador automático de líquidos, injeção de 1,0 μL , temperatura de 250 °C. Temperatura inicial do forno de 100 °C, com rampa de aquecimento de 15 °C/min até 230 °C, mantida até a completa eluição dos ácidos graxos de interesse. A

identificação dos picos cromatográficos dos ésteres metílicos das amostras foi obtida por comparação do tempo de retenção dos padrões de ésteres metílicos.

3.3 – AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE SECAGEM DAS AMOSTRAS DE FORRAGEM

3.3.1 - Comparação do processo de secagem das amostras (Estufa *versus* Liofilização)

A técnica referência para a análise de AG em forragem é a CG e, para a sua utilização, é necessária a secagem da amostra fresca, que é recomendada ser realizada pelo processo de secagem por liofilização. Este processo de desidratação apresenta algumas vantagens sobre a secagem em estufa, pois ele permite que a amostra permaneça com suas propriedades inalteradas, porém alguns autores sugerem que é possível realizar o processo de secagem em estufa, o que é mais prático e mais comum no preparo de amostra para análises clássicas de alimentos (FDA, FDN, Lignina, Extrato Etéreo) (SUKHIJA; PALMQUIST, 1988).

A grande maioria de AG encontrados na forragem são de cadeia longa e poli-insaturados (C18:1 cis-9 – Ácido Oléico; C18:2 cis-9 cis-12 – Ácido Linoléico; C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 – Ácido Linolênico), sendo assim, são susceptíveis a oxidação com a elevação da temperatura.

Nesse sentido, foi realizada a secagem, por liofilização e em estufa, de duas amostras de forrageiras (*Brachiaria brizantha* e *Brachiaria ruzizienses*) para se verificar se iria ocorrer a oxidação dos AG.

O perfil lipídico das amostras foi analisado por GC, sendo a quantificação realizada através da adição do padrão interno nonadecanoato de metila (C19:0), para verificar se o processo de estufa promove a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

3.3.2 - Processo de secagem das amostras

As amostras foram secas pelo processo de liofilização, que é o método usado para secagem de forragem quando se deseja conhecer o perfil lipídico. Esse método consiste na remoção do vapor de água diretamente das amostras congeladas, por 24 horas, a uma temperatura de - 80 °C, permitindo a remoção de toda água presente na amostra sem a alteração de suas propriedades físico-química, pois o método de secagem na estufa pode alterar a concentração dos AG de interesse do trabalho.

As amostras, após serem coletadas, foram cortadas e colocadas dentro de béqueres de 250 mL e foram levadas ao freezer a uma temperatura de - 80 °C, por 24 horas. Após esse período, foram levadas ao liofilizador por três dias. As amostras foram moídas em um moinho de facas e armazenadas a uma temperatura de - 20 °C até o momento do processo de extração da fração lipídica.

3.4 – ANÁLISE DOS PRECURSORES DE CLA

3.4.1 - Soluções estoque

Para a análise dos AG, por CE, foram preparadas soluções aquosas do tampão de tetraborato de sódio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (100 mmol L^{-1}) e da solução de Brij 35® (50 mmol L^{-1}) para o preparo do eletrólito, solução de 3:2 (v/v) hexano/isopropanol, solução de sulfato de sódio (1,0 g Na_2SO_4 / 15,0 mL de água destilada) para a extração da fração lipídica e solução de NaOH em metanol ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) para o processo de saponificação. Os padrões de AG foram diluídos em metanol a uma concentração de 30 mmol L^{-1} .

Para a análise dos AG por GC, foi preparada uma solução 10% de HCl em MeOH, solução 6% de K_2CO_3 e solução do padrão interno (PI) C19:0 (2 mg/mL de heptano).

3.4.2 - Preparo da amostra

Resultados de pesquisa com a espécie de *B.ruziziensis*, evidenciaram a existência de variabilidade genética para características relacionadas a produtividade e qualidade de forragem (SOUZA SOBRINHO; AUAD; LÉDO, 2010; SOUZA SOBRINHO; LÉDO; KOPP, 2011), bem como para tolerância ou resistência a estresses bióticos e abióticos (MARTINS *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011; MIGUEL *et al.*, 2011). Diante dessas características mencionadas, a espécie de *B.ruziziensis* foi selecionada para a avaliação do estudo deste trabalho.

Visando detectar a variabilidade dentro da espécie de estudo, para os ácidos precursores do CLA, foram coletadas amostras de 80 clones de *B.ruziziensis* obtidos dentro do programa de melhoramento genético disponível na Embrapa Gado de Leite, localizado na cidade de Juiz de Fora/MG. Também foram coletadas as cultivares comerciais Basilisk (*B.decumbens*), Marandu (*B.brizantha*) e Kennedy (*B.ruzizienses*), que foram usadas como testemunhas do experimento. Nesse nosso trabalho, testemunhas do experimento são amostras que já se tem informações, seja na literatura ou em um banco de dados, da concentração dos analitos de interesse, assim os valores encontrados nas testemunhas servirão como referências na interpretação dos resultados encontrados nas amostras de interesse do experimento.

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).

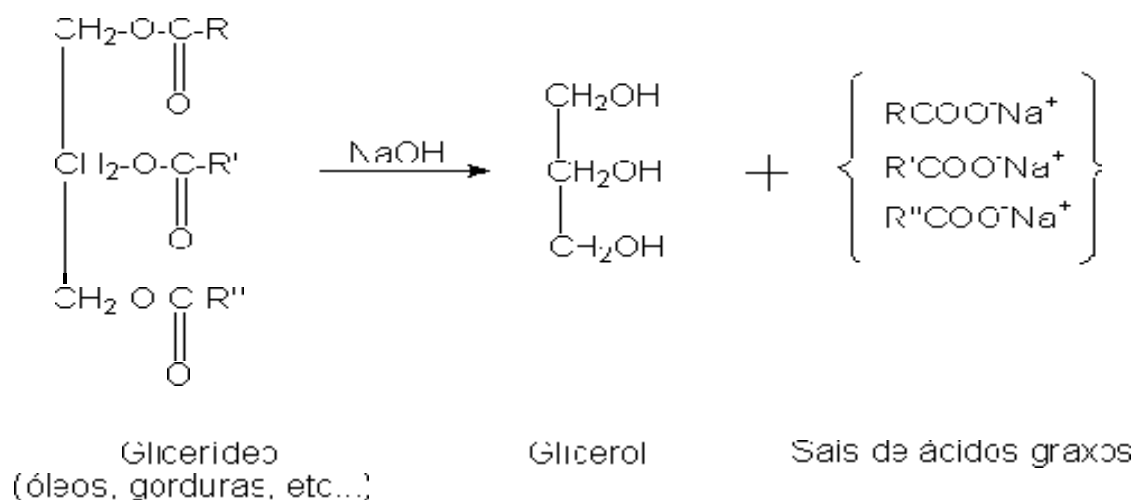
3.4.2.1 - Preparo da amostra para análise em CZE

Para análise por CZE é necessário o processo de extração da fração lipídica e a saponificação. A extração consiste em pesar 1,0 g de amostra seca em um tubo de Falcon de 50,0 mL, adicionar 8,0 mL de isopropanol P.A. e agitar por 2,0 minutos no vortex a uma velocidade máxima; posteriormente, a adição de 12,0 mL de hexano PA e agitar por mais 2,0 minutos. Filtrar a solução em outro tubo de Falcon de 50,0 mL, lavando o filtro com uma solução de 3:2 hexano/isopropanol a fim de remover possíveis AG retidos no mesmo. Adicionar 6,0 mL da solução de sulfato de sódio (1,0 g Na₂SO₄/

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 de 125 mL. Evaporar o solvente no rota vapor a uma temperatura de 40 °C até permanecer apenas a fração lipídica no balão (CASTRO *et al.*, 2013).

A saponificação da fração lipídica para análise dos AG por CZE é necessária porque os ácidos graxos precisam estar 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 AG. Tal reação, como exemplifica o esquema da Figura 7, consiste em uma hidrólise alcalina (saponificação), onde há adição aos glicerídeos de uma base forte (normalmente solução de NaOH preparada em MeOH), em um banho térmico com temperatura controlada de 75 a 80°C sob refluxo contínuo em haste de vidro, resultando na formação de glicerol e sais de AG (MORRISON; BOYD, 1992).

Figura 7 - Figura para reação de hidrólise básica dos glicerídeos

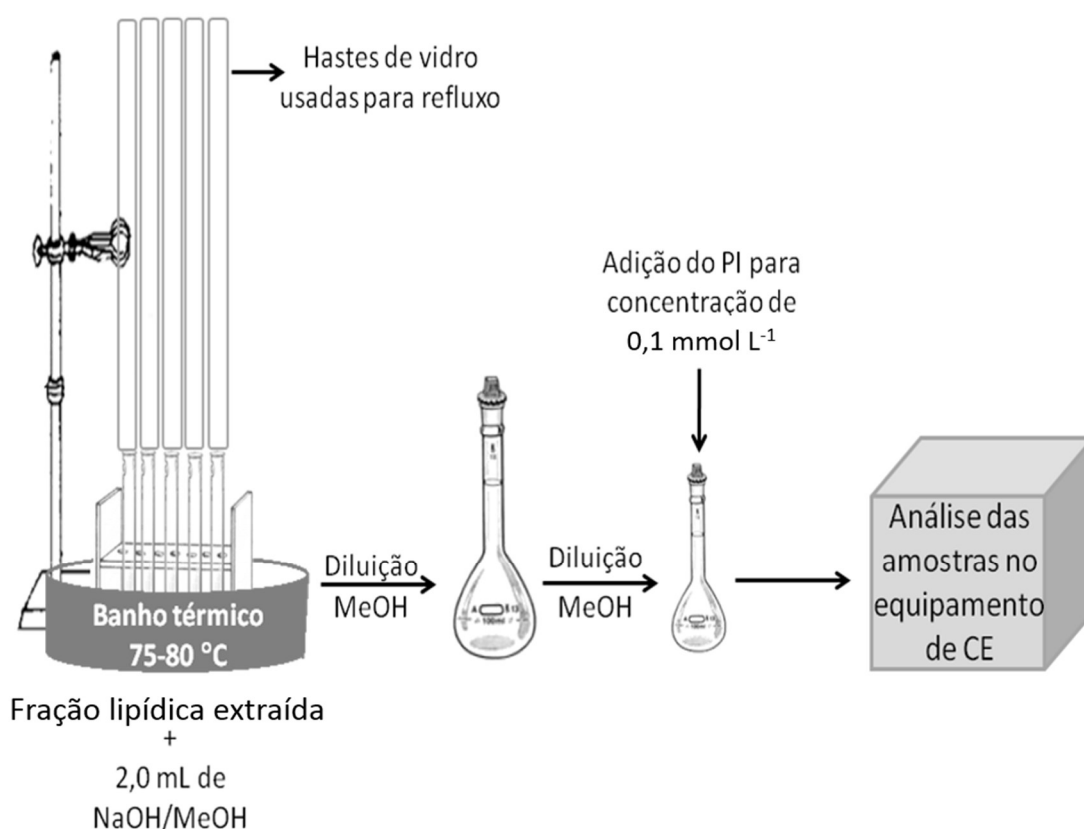


Fonte: (MORRISON & BOYD, 1992)

A saponificação consistiu na adição 2,0 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em metanol (no próprio balão de rota vapor, na qual se encontra a fração lipídica obtida no processo de extração). O procedimento da extração e saponificação são realizados no mesmo dia.

O balão foi conectado a uma haste de vidro de 1,5 m, que tem a função de um condensador, e foi colocado no banho Maria a uma temperatura de 75 °C por 25,0 minutos, conforme demonstra a Figura 8. A solução foi filtrada para um balão de 5,0 mL e o volume completado com metanol. As amostras foram injetadas no equipamento de CE.

Figura 8 - Esquema de saponificação das amostras para análise por CZE



Fonte: ADAPATADO (Barra *et al.*, 2013)

3.4.2.2 - Preparo da amostra para análise em GC

Para a análise por GC é necessário o processo de extração e transesterificação das amostras, no qual consiste em pesar 1,0 g de forragem em um tubo de vidro de rosca (20 X 1500 mm), adicionar 1,0 mL da solução do PI (2 mg de C19:0), 3,0 mL de

heptano e 3,0 mL da solução de HCl metanólica (10% m/v). Agitar o tubo no vortex e levar ao aquecimento (70 °C por duas horas). Após o resfriamento do tubo, adicionar 10,0 mL da solução de 6% de K₂CO₃. Centrifugar a 1500 G, por 8 minutos, onde irá ocorrer a divisão das fases. Transferir a fase orgânica para outro tubo de vidro (13 X 1000 mm). Adicionar 1,0 g de Na₂SO₄ anidro e 1,0 g de carvão ativado, agitar no vortex de 15 em 15 minutos, por uma hora. Centrifugar a 3000 G por 8 minutos e transferir para um vial a fase orgânica. As amostras foram injetadas em um cromatografo a gás.

3.4.3 - Quantificação dos ácidos graxos para CZE-UV

3.4.3.1- Cálculo do Fator de Resposta para CZE-UV

Para as considerações quantitativas dos ácidos graxos na amostra de braquiária, utilizou-se o conceito de fator de resposta (F_r). Para cálculo do F_r , foi elaborada uma curva de calibração para cada ácido graxo de interesse. A curva do C18:2 cis-9 cis-12 consistiu em cinco níveis de concentração, em replicatas autênticas: 1 - 0,01; 2 - 0,05; 3 - 0,10; 4 - 0,15 e 5 - 0,20 mmol L⁻¹ e a curva de C18:3 cis-9 cis-12 cis-1 com sete níveis de concentração em replicatas autênticas: 1 - 0,01; 2 - 0,05; 3 - 0,10; 4 - 0,15; 5 - 0,20; 6 - 0,25 e 7 - 0,30 mmol L⁻¹, em ambas as curvas, utilizou-se o ácido eláidico (C18:1 trans-9) como PI, cuja concentração foi fixada em 0,10 mmol L⁻¹.

Para o ajuste do modelo, verificou-se a normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade foi verificada utilizando o teste de Levene para a curva do C18:3 cis-9 cis-12 cis-15, como está representado na Tabela 3. A curva para C18:2 cis-9 cis-12 apresentou comportamento normal e heterocedástico, ou seja, as variâncias apresentaram forte dispersão ao longo da retas. Desse modo, fez-se necessário o uso do modelo de regressão que utiliza método dos mínimos quadrados ponderados (MASSART *et al.*, 1997).

Tabela 3 - Valores para ajuste do modelo da curva de AG

AG	[C _{AG}]/ [C _{C18:1}]	1 ^a Replicata	2 ^a Replicata	3 ^a Replicata
C18:2	0,1	0,38	0,22	---
	0,5	1,36	1,16	1,30
	1,0	3,01	3,70	---
	1,5	4,71	4,88	4,61
	2,0	6,49	---	6,78
C18:3	0,1	0,23	0,31	---
	0,5	1,82	1,84	2,04
	1,0	4,57	5,83	4,13
	1,5	7,06	8,04	7,49
	2,0	9,28	10,45	9,87
	2,5	11,26	12,72	14,44
	3,0	17,66	16,01	15,23

*Teste de normalidade (Shapiro–Wilk): C18:2 cis-9 cis-12 **p-valor 0,336** e C18:3 cis-9 cis-12 cis -15 **p-valor 0,702**

*Teste de homocedasticidade (Levene) C18:3 cis-9 cis-12 cis -15 **p-valor 0,129**

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Após a implementação da regressão, a falta de ajuste do modelo foi verificada através do teste de hipótese *a priori* (ANOVA) (DANZER, K.; CURRIE, L. A., 1998). (Equação 9)

$$F_{calc} = \frac{S_{y,x}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (9)$$

Onde: **m_i** é o número de réplicas de cada nível da curva, **p** é o número de níveis usados na construção da curva analítica e **m** é o número total de observações, ou seja, número de níveis multiplicado pelo número de réplicas em cada nível.

Os valores calculados de **F_{calc}** (p-2, m-p) foram menores que o valor de **F_{tabelado}** dentro do intervalo estimado, assim não houve falta de ajuste no modelo e o coeficiente angular da equação obtida poderá ser usado como **F_r** para quantificação de AG em amostras de braquiárias.

3.4.4 - Quantificação dos ácidos graxos para CG - FID

A quantificação dos AG nas amostras de braquiárias foi adaptada do estudo de Sukhija e Palmquist (1988), na qual relaciona os valores das áreas com o valor da massa de PI. O padrão utilizado foi nanodecanoato de metila (C19:0) e os cálculos foram realizados de acordo com as Equações (10), (11) e (12) e expressos em mg/100 g de amostra seca.

Primeiramente para calcular o teor de AG totais, faz-se o somatório total das áreas (Σ Área total) dos picos identificados e não identificados, excluindo a área do PI (A_{PI}). Em seguida relaciona-se a área do PI à massa adicionada de C19:0 (m_{PI}) durante o preparo da amostra, como demonstra a Equação 10.

Cálculo da massa de ácidos graxos:

$$\text{Massa total de AG} = \frac{[(\Sigma \text{Área total AG} - A_{PI})] (m_{PI})}{A_{PI}} \quad (10)$$

Onde: A_{PI} é a área do padrão interno obtida no cromatograma e m_{PI} é a massa do padrão interno que foi adicionada a amostra.

Em seguida, relaciona-se a massa total de AG, que está em mg, com o valor da massa pesada de amostra, em gramas (m_p). No caso deste trabalho a massa utilizada para este cálculo foi a massa pesada de forragem seca (aproximadamente 1g), como demonstra a equação 11. Assim, teremos o cálculo do teor de AG corrigido.

Cálculo do Teor Total de Ácidos Graxos Corrigidos:

$$\text{Teor AG corrigidos} = \frac{(\text{Teor total de AG}) (1g)}{m_p} \quad (11)$$

Onde: m_p é a massa pesada da amostra (amostra seca).

Para calcular a massa de um AG de interesse de cada amostra extraída e metilada, relaciona-se ao valor da área do referido AG e com o somatório total das áreas, excluindo a área do PI juntamente com o teor total de AG corrigido calculado na expressão 11, (equação 12).

Cálculo do Ácido Graxo de interesse (mg.g⁻¹):

$$AG = \frac{(\text{Área do pico de interesse}) (\text{Teor total de AG corrigido})}{\Sigma \text{Área total AG} - A_{PI}} \quad (12)$$

Onde: A_{PI} é a área do padrão interno obtida no cromatograma

3.5 – ANÁLISE DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

3.5.1 - Soluções estoque

Para a análise dos AO, por eletroforese capilar, foram preparadas soluções aquosas de ácido ftálico a 20 mmol L⁻¹, TRIS a 15 mmol L⁻¹ e CTAB a 0,8 mmol L⁻¹ para o preparo do eletrólito. Os padrões de AO foram diluídos em água Milli-Q a uma concentração de 100 mmol L⁻¹.

3.5.2 - Preparo da amostra

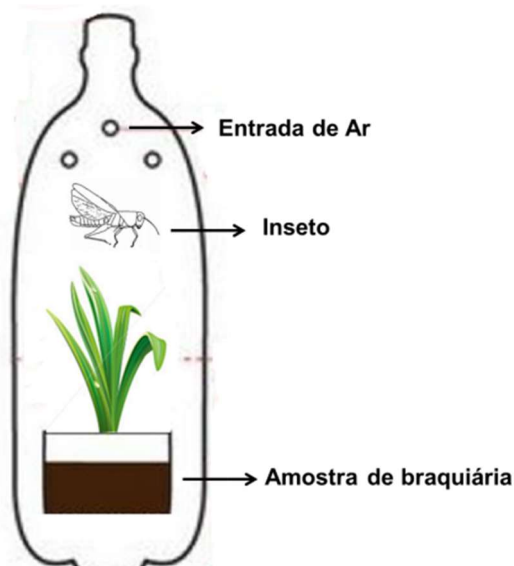
O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. Sendo conduzido em delineamento de blocos casualizados, modelo fatorial (7 x 2), com duas repetições e parcelas de uma planta/vaso. Avaliaram-se cinco genótipos de *B. ruziziensis* e, como testemunhas, foram utilizadas as cultivares Marandu (*B. brizantha*) e Basilisk (*B. decumbens*) que são contrastantes para reação ao ataque das cigarrinhas das pastagens, sendo a primeira considerada resistente e a segunda suscetível. As plantas dos diferentes genótipos avaliados foram obtidas por meio de clonagem e foram cultivadas em vasos de 500 mL contendo substrato à base de

terra, areia e esterco na proporção de 1:1:1. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até o início do experimento, com irrigação e adubação controlada.

Para a avaliação do estresse na planta, foram colocados 5 cigarrinhas das pastagens (*Deois schach*) em cada vaso de plantas, por 8 dias, sendo o experimento dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foram avaliadas as plantas antes do ataque dos insetos, ou seja, no tempo zero (0). A segunda etapa, correspondeu à avaliação das plantas após 8 dias de permanência dos insetos. Para garantir a permanência das cigarrinhas nas plantas, os vasos foram mantidos dentro de gaiolas construídas com garrafas PET, como demonstra a Figura 9. O número de insetos foi verificado, diariamente, durante todo o período experimental, sendo feito a reposição daqueles mortos, de modo a manter a densidade desejada.

Na avaliação do experimento, tanto na primeira quanto na segunda etapa, procedeu-se o corte da parte aérea das plantas, a qual foi armazenada em freezer a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da extração.

Figura 9 – Desenho esquemático da gaiola construída de garrafa de plástico (PET)

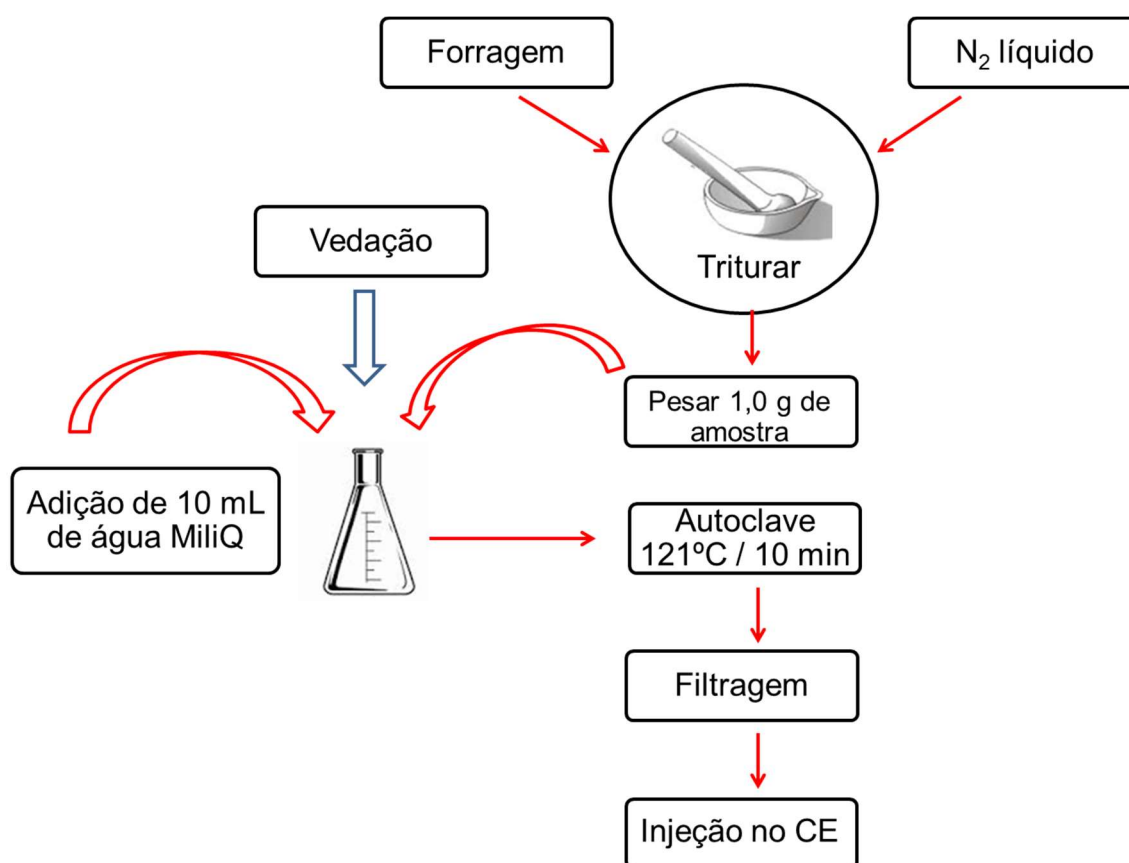


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

3.5.2.1- Preparo da amostra para análise em CZE-UV

O processo de extração representado na Figura 10, consiste em macerar a parte aérea da planta com auxílio de almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido. Posteriormente, pesou-se 1,0 g de amostra macerada em um erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 10,0 mL de água Milli-Q. Em seguida, as amostras foram auto clavadas por 10 minutos a uma temperatura de 121°C, sendo os erlenmeyers vedados com papel alumínio e plástico parafilm (PASSOS *et al.*, 2006). Após o resfriamento, as amostras foram filtradas com auxílio de papel de filtro e injetadas no equipamento de eletroforese capilar no mesmo dia da extração.

Figura 10 – Fluxograma do método de Extração de ácidos orgânicos



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

3.5.3- Quantificação dos ácidos orgânicos para CZE-UV

A quantificação de AO foi determinada através do cálculo do F_r , utilizando o ácido propiônico como PI. Para se calcular o F_r , duas curvas analíticas (uma para cada ácido orgânico correspondente) foram construídas com triplicatas autênticas em cada ponto. Foram utilizadas soluções padrões de ácido cítrico, málico, aspártico e succínico. A primeira curva de calibração com dez níveis de concentração com incremento de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$: 1 - 0,05; 2 - 0,10; 3 - 0,15; 4 - 0,20; 5 - 0,25; 6 - 0,30; 7 - 0,35; 8 - 0,40; 9 - 0,45 e 10 - $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ e uma segunda curva de calibração em sete níveis de concentração com incremento de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ com os pontos: 1 - 0,50; 2 - 0,75; 3 - 1,00; 4 - 1,25 ; 5 - 1,50; 6 - 1,75 e 7 - $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$. Em ambas as curvas a concentração do PI fixada em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Os valores utilizados nos modelos de regressão estão contidos nas Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4 - Valores para ajuste do modelo da 1ª curva de AO

AO	$[C_{AO}]/[C_{PI}]$	1 ^a	2 ^a	3 ^a	AO	$[C_{AO}]/[C_{PI}]$	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Cítrico	0,05	0,05	0,06	0,05	Aspártico	0,05	0,06	0,06	0,06
	0,10	0,10	0,11	0,10		0,10	0,13	0,12	0,13
	0,15	0,16	0,15	0,16		0,15	0,19	0,19	0,19
	0,20	0,19	0,21	0,20		0,20	0,24	0,25	0,26
	0,25	0,31	0,26	0,25		0,25	0,33	0,32	0,30
	0,30	0,32	0,35	0,37		0,30	0,40	0,40	0,40
	0,35	0,38	0,39	0,40		0,35	0,44	0,47	0,46
	0,40	---	---	---		0,40	0,54	0,49	0,50
	0,45	---	---	---		0,45	0,59	0,58	0,59
	0,50	0,57	0,55	---		0,50	0,65	0,64	0,64
Málico	0,05	0,05	0,06	0,06	Succínico	0,05	0,07	0,07	0,06
	0,10	0,11	0,12	0,11		0,10	0,11	0,11	0,12
	0,15	0,17	0,17	0,18		0,15	0,17	0,15	0,17
	0,20	0,21	0,23	0,24		0,20	0,24	0,22	0,23
	0,25	0,31	0,29	0,29		0,25	0,29	0,29	0,29
	0,30	0,39	0,39	0,36		0,30	0,39	0,35	0,36
	0,35	0,43	---	0,43		0,35	0,41	0,41	0,44
	0,40	0,49	0,46	---		0,40	0,47	0,47	0,47
	0,45	0,53	0,55	0,54		0,45	0,54	0,54	0,53
	0,50	0,62	0,61	0,61		0,50	0,60	0,60	0,57

*Teste de normalidade (Shapiro–Wilk): ácido cítrico p-valor 0,187; ácido málico p-valor 0,268; ácido aspártico p-valor 0,475 e ácido succínico p-valor 0,221

*Teste de homocedasticidade (Cochran): ácido aspártico p-valor 0,141 e ácido succínico p-valor 0,114

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Para o ajuste do modelo da 1ª curva construída, verificou-se a normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk para os quatro ácidos correspondentes, e foi verificada a homocedasticidade utilizando o teste de Cochran para a curva do ácido aspártico e o ácido succínico, como representado na Tabela 4. A curva do ácido cítrico e o ácido málico apresentaram comportamento heterocedástico. Assim, fez-se necessário o uso do modelo de regressão que utiliza método dos mínimos quadrados ponderados (MASSART *et al.*, 1997). Após a implementação da regressão, a falta de ajuste do modelo foi verificada através do teste de hipótese *a priori* (ANOVA) (DANZER, K. ; CURRIE, L. A. , 1998).

Tabela 5 - Valores para ajuste do modelo da 2ª curva de AO

AO	[CAo]/ [Cpi]	1ª	2ª	3ª	AO	[CAo]/ [Cpi]	1ª	2ª	3ª
Cítrico	0,50	0,57	0,54	0,58	Aspártico	0,50	0,65	0,66	0,69
	0,75	0,82	0,86	0,89		0,75	0,96	1,00	0,99
	1,00	1,24	---	1,29		1,00	1,33	---	1,30
	1,25	1,51	1,55	1,59		1,25	---	---	---
	1,50	2,02	1,95	---		1,50	1,95	1,96	1,96
	1,75	---	2,27	2,20		1,75	2,32	2,49	2,41
	2,00	2,54	2,57	2,63		2,00	2,71	2,74	2,80
Málico	0,50	0,61	0,62	0,62	Succínico	0,50	0,64	0,66	0,67
	0,75	0,90	0,96	0,93		0,75	0,96	0,97	0,98
	1,00	1,27	1,24	---		1,00	1,30	---	1,25
	1,25	1,53	1,54	1,56		1,25	---	1,61	1,58
	1,50	1,87	1,94	1,80		1,50	1,90	1,98	1,92
	1,75	2,18	2,38	2,37		1,75	2,28	2,37	2,28
	2,00	2,65	2,64	2,73		2,00	2,65	2,64	2,72

*Teste de normalidade (Shapiro–Wilk): ácido cítrico p-valor 0,656; ácido málico p-valor 0,699, ácido aspártico p-valor 0,531 e ácido succínico p-valor 0,863

*Teste de homocedasticidade (Levene): ácido cítrico p-valor 0,160 e ácido aspártico p-valor 0,123

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Para o ajuste do modelo da 2ª curva construída, verificou-se a normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk para os quatro ácidos correspondentes e foi verificada a homocedasticidade utilizando o teste de Levene (número de réplicas diferentes) para a curva do ácido cítrico e o ácido aspártico, como representado na Tabela 5. As curvas do ácido málico e ácido succínico apresentaram comportamento heterocedástico. Assim, fez-se necessário o uso do modelo de regressão que utiliza

método dos mínimos quadrados ponderados. Após a implementação da regressão, a falta de ajuste do modelo foi verificada através do teste de hipótese *a priori* (ANOVA).

Todos os modelos apresentaram comportamento normal, independência dos resíduos e algumas curvas apresentaram comportamento homocedástico e outros heterocedástico. Após a implementação da regressão, a falta de ajuste do modelo foi verificada, sendo que o valor de F_{cal} foi menor que o valor de F_{tab} , dentro do intervalo estimado de 95% de confiança, não havendo falta de ajuste do modelo e o coeficiente angular da equação obtida poderá ser usado como F_r para a quantificação do respectivo AO nas amostras de braquiárias.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

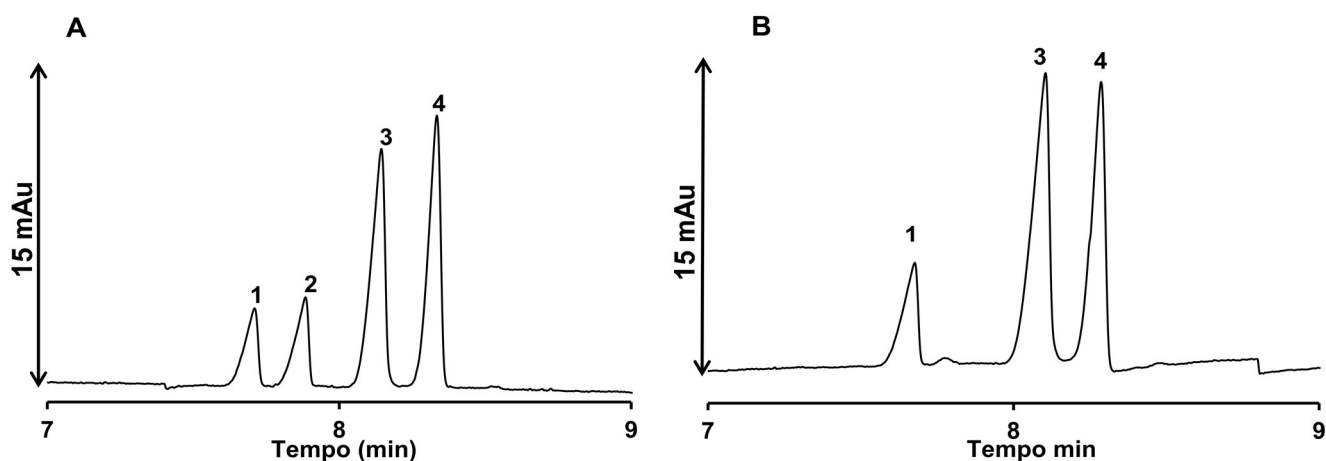
4.1 - ANÁLISES DE AG POR CZE-UV

4.1.1 - Otimização das condições de análises de AG por CZE-UV

O eletrólito de corrida utilizado para as análises de AG foi baseado em Porto *et al* (PORTO; DE SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011) que consiste em 17% de metanol, 33% de ACN, 12 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, 12 mmol L⁻¹ de Brij 35® e pH próximo de 9,5.

Foram realizadas duas injeções com as mesmas condições utilizadas no trabalho de Porto *et al*, sendo a primeira uma mistura de padrões de AG e a outra uma amostra de forragem, conforme demonstra a Figura 11. Com as condições supracitadas conseguiu-se uma boa separação entre os picos de interesse em um tempo aproximado de 9 minutos.

Figura 11 - Eletroferograma **A** representa mistura de padrão na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ e **B** amostra de braquiária *ruzizensis*. Representação dos sinais: 1- C18:1 trans-9, 2- C18:1 cis-9, 3- C18:2 cis-9 cis-12 e 4- C18:3 cis-9 cis-12 cis-15

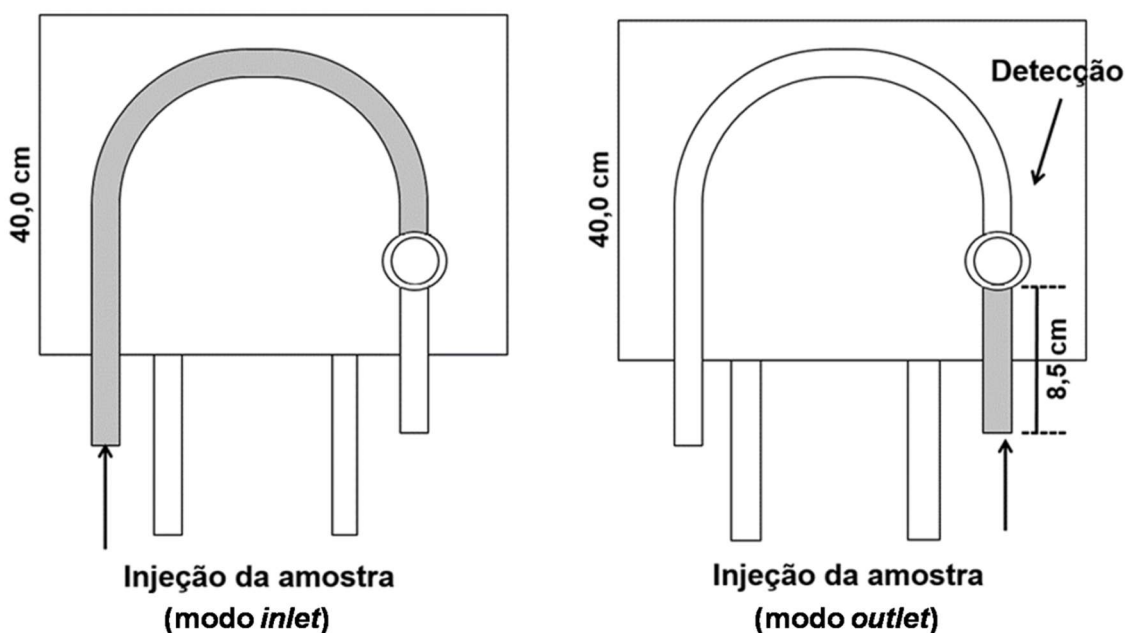


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Com o intuito de diminuir o tempo de análise, o que levaria a um aumento da frequência analítica, foi realizado um teste preliminar utilizando a injeção no modo *outlet*, ou seja, do outro lado da extremidade do capilar, onde o comprimento efetivo é de 8,5 cm.

O modo de injeção *outlet*, requer o uso da polaridade negativa a fim de inverter a direção de migração. Entretanto, quando o sistema permite o acesso aleatório de vials, tanto no *inlet* quanto no *outlet*, a injeção poderá ser realizada em ambas as extremidades do capilar separadamente. O equipamento permite a injeção por *inlet* ou por *outlet*. Assim, o comprimento efetivo passa a ser 8,5 cm, na injeção pelo *outlet* e não mais de 40,0 cm como era na injeção do modo *inlet* conforme demonstra a Figura 12.

Figura 12 - Representação da injeção em modo *inlet* e modo *outlet*



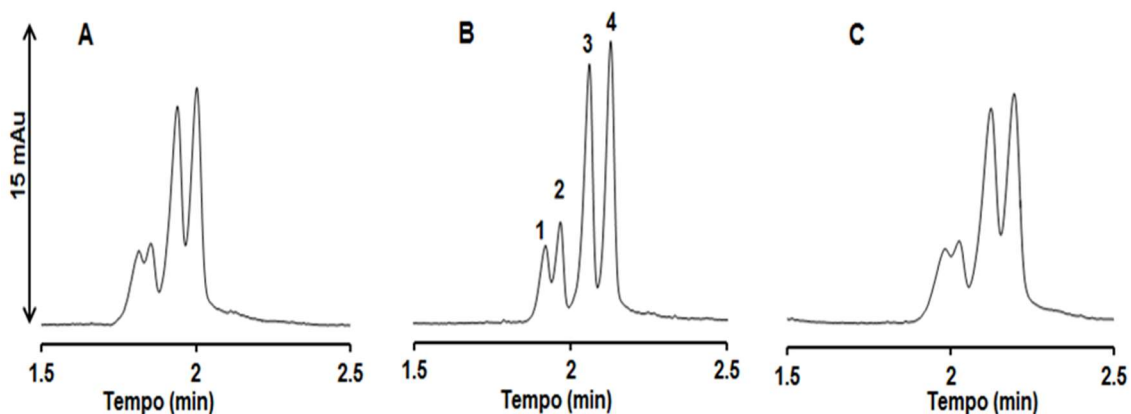
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

A vantagem de se utilizar comprimentos efetivos curtos é a redução no tempo de análises e também promover maiores eficiência e sensibilidade, pois capilares com

comprimentos menores oferecem capacidades de separação suficientes, especialmente, para amostras simples ou quando a seletividade e a resolução são altas.

Uma variação na aplicação da voltagem foi realizada no intuito de atingir uma melhor separação dos analitos. Contudo, a princípio, não foi obtida uma boa separação conforme observa-se nos eletroferogramas da mistura de padrão (Figura 13).

Figura 13 - Eletroferogramas da mistura de padrão na concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Condições experimentais: A - injeção 4 segundos a 25 mbar, voltagem de -25 kV , B - injeção 4 segundos a 25 mbar, voltagem de -24 kV e C - injeção 4 segundos a 25 mbar, voltagem de -22 kV . Representação dos sinais: 1- C18:1 trans-9, 2- C18:1 cis-9, 3- C18:2 cis-9 cis-12 e 4- C18:3 cis-9 cis-12 cis -15

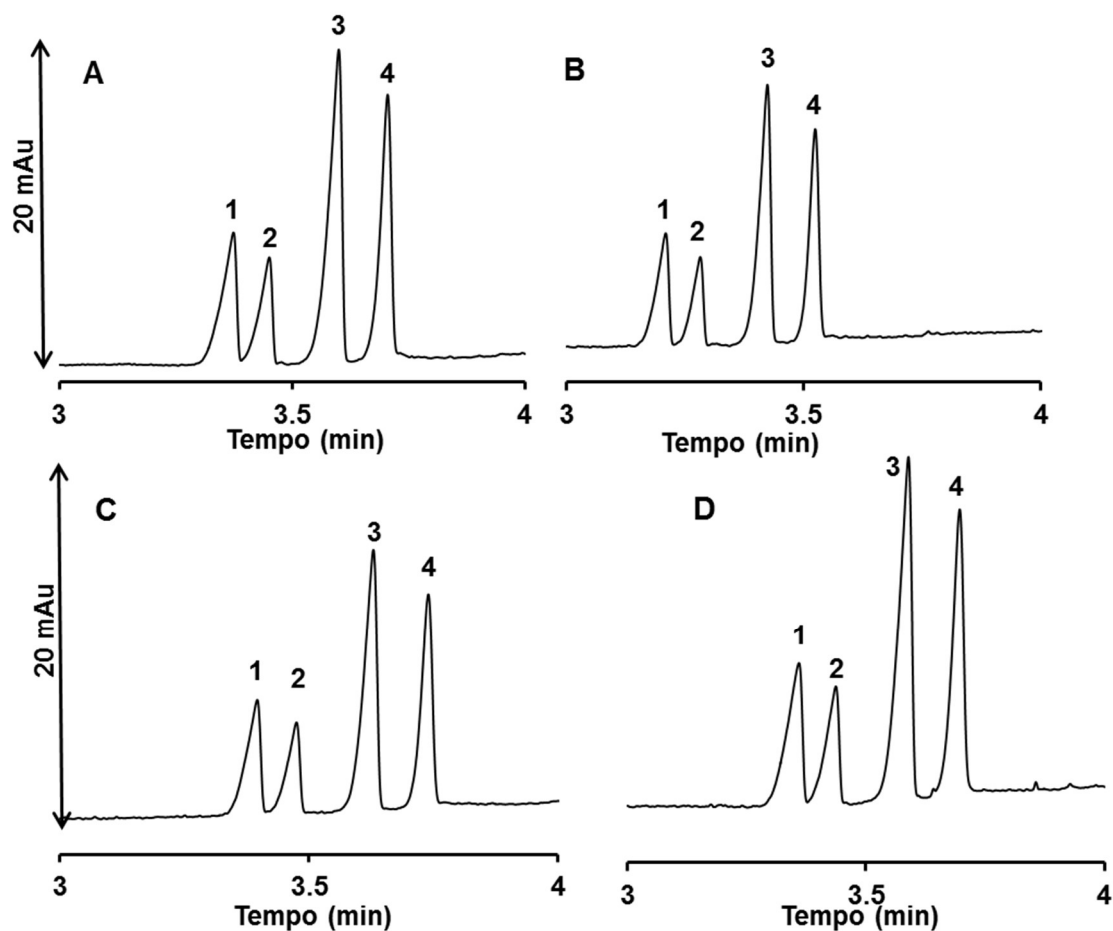


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Ainda com a finalidade de se obter um menor tempo de análise para um aumento da frequência analítica, foi realizado um teste com o capilar TSU, utilizando o método de injeção *inlet* com o comprimento total de 34 cm (menor comprimento para o cartucho da Agilent), sendo que, os comprimentos mínimos dos capilares variam de acordo com o tipo e marca dos equipamentos. O capilar de TSU apresenta uma grande vantagem frente ao capilar de poliimida, pois apresenta transparência maior que 90% a 214 nm, região do espectro em que muitos analitos são detectados, com isso, elimina-se a necessidade de remoção do revestimento para criar uma região transparente à radiação (janela óptica de detecção), deixando a metodologia mais eficaz, uma vez que a remoção do revestimento para a construção da janela deixa o capilar quebradiço.

Foi realizada uma variação na voltagem e no tempo de injeção das amostras, a fim de verificar se as diferenças seriam representativas para as análises, conforme demonstra a Figura 14.

Figura 14 - Eletroferogramas dos padrões. **A** - injeção 4 s, V = +27 kV, **B** - injeção 5 s, V= +27 kV, **C** - injeção 4 s, V= +26 kV e **D** - injeção 5 s, V= +26 kV. Representação dos sinais: 1-C18:1 trans-9, 2-C18:1 cis-9, 3-C18:2 cis-9 cis-12 e 4-C18:3 cis-9 cis-12 cis -15



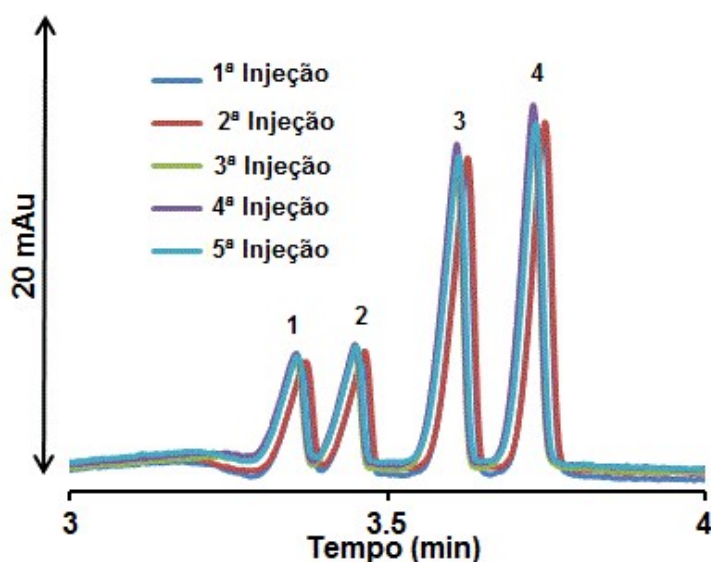
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Assim, nos quatros eletroferogramas podemos observar um bom resultado na separação dos AG de interesse e um tempo menor que 4 minutos, indicando um ganho na frequência analítica bem representativa quando se tem um grande interesse de se realizar muitas análises.

Nos eletroferogramas **B** e **C** ocorreram uma melhor separação, entre os picos 1 e 2, sendo que na condição **B**, os analitos de interesse foram eluidos em um menor tempo, mas como a diferença entre os tempos de migração foram muito pequenas, optou-se em selecionar a condição **C**, simplesmente por apresentar um menor tempo de injeção e uma voltagem mais baixa de trabalho. Lembrando que essa avaliação foi realizada visualmente.

Para se verificar a repetitividade do método, injetou-se uma mesma amostra de uma mistura de padrões 5 vezes, com isso, se observou uma precisão do método conforme demonstra a Figura 15.

Figura 15 - Eletroferogramas de uma mesma mistura de padrões. Representação dos sinais: 1 - C18:1 trans-9, 2 - C18:1 cis-9, 3 - C18:2 cis-9 cis-12 e 4 - C18:3 cis-9 cis-12 cis -15



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Assim, a condição ótima para separação dos precursores do CLA será: **o capilar TSU de 34 cm de comprimento total, sendo 25,5 cm de comprimento efetivo e 8,5 cm até a janela de detecção, 4 segundos de injeção a 25 mbar e a voltagem de +26 kV.**

4.1.2 - Processo de secagem Estufa versus Liofilização

Para verificar se existe diferença na concentração dos AG poli-insaturados presentes nas forragens, um teste preliminar foi montado. Foram coletadas duas amostras de braquiárias (*B. ruziensis* e *B. brizantha*) no campo experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco (MG). A parte aérea (folhas e caules) de cada braquiária foi dividida em duas partes e secada de duas maneiras diferentes, pelo processo de estufa e pelo processo de liofilização.

O processo da secagem na estufa, foi realizado em uma estufa Odondoto bras disponível nas dependências do Departamento de Química da UFJF. A temperatura da estufa foi mantida e controlada a 55 °C por três dias. As amostras foram colocadas inteiras dentro de um saco de papel pardo e distribuídas de forma uniforme sobre as prateleiras, sendo que, duas vezes ao dia elas eram invertidas em sua posição para uma melhor homogeneidade de calor, já que não havia uma estufa de ar forçada disponível.

O processo de liofilização, foi realizado utilizando o liofilizador Labconco, disponível nas dependências da Embrapa Gado de Leite. As amostras foram cortadas no tamanho (aproximadamente 2 cm) e colocadas dentro de um recipiente de alumínio (embalagem para refeição tipo marmitex) e levadas ao freezer a uma temperatura de – 80 °C por 24 horas. Após este período, as amostras foram acomodadas dentro do liofilizador de maneira uniforme e submetidas à vácuo por três dias.

Após o processo de secagem na estufa e no liofilizador, as amostras foram moídas (moinho de facas dotadas de peneiras com perfurações de 1 mm) e armazenadas no freezer a uma temperatura de – 20 °C, para evitar possíveis oxidações.

Foram realizados os processos de análises do perfil lipídico das amostras secas em estufa e no liofilizador, a fim de se verificar diferenças significativas na concentração dos AG poli-insaturados.

O processo de extração e a quantificação das amostras foram realizados conforme descritos nos itens 3.4.2.2 e 3.4.4 e os resultados estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração dos Ácidos Graxos Estufa versus Liofilização

AG	<i>Brizantha</i>			<i>Ruziensiensis</i>		
	Liofilizada (mg.g ⁻¹)	Estufa (mg.g ⁻¹)	Alteração (%)	Liofilizada (mg.g ⁻¹)	Estufa (mg.g ⁻¹)	Alteração (%)
C14:0	0,0447	0,0505	-12,98	0,0758	0,0725	4,35
C16:0	2,7097	1,7321	36,08	2,0593	1,6037	22,12
C18:0	0,1464	0,1173	19,88	0,2447	0,2037	16,76
C18:1 n-9	0,3834	0,2272	40,74	0,4090	0,2633	35,62
C18:2 n-6	3,0299	1,3849	54,29	2,4286	1,5373	36,70
C18:3 n-3	3,7552	1,8320	51,21	2,4951	1,5776	36,77

C14:0 – Ácido Mirístico; C16:0 – Ácido Palmítico; C18:0 Ácido Esteárico; C18:1 cis-9 – Ácido Oléico; C18:2 cis-9 cis-12 – Ácido Linoléico; C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 – Ácido Linolênico

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

A análise da Tabela 6 mostra que a concentração dos AG se alteram devido ao processo de secagem da forragem em estufa. Pois quanto maior a temperatura, maior serão os processos oxidativos nas amostras. A concentração dos AG poli-insaturados precursores de CLA, C18:2 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15, na *B. brizantha* reduziram, respectivamente em 54,29 e 51,21% enquanto que na *B. ruziensiensis* reduziram, 36,70 e 36,77% respectivamente, indicando uma mudança considerável do perfil lipídico. A concentração de C14:0 aumentou durante o processo de secagem, mas por ser um ácido graxo que não apresenta insaturação na sua cadeia carbônica, acredita-se que ocorreu um erro de integração do mesmo, ou seja, integração de uma substância que apresenta o mesmo tempo de retenção.

Os resultados deste experimento evidenciaram uma forte redução na concentração dos AG precursores do CLA em amostras submetidas ao processo de secagem em estufa. Assim, podemos concluir que o processo de secagem em estufa compromete as análises do perfil lipídico, indicando que o processo por liofilização é o recomendando.

O monitoramento da fração lipídica nas forragens torna-se importante, uma vez que, quanto maior a concentração dos precursores de CLA na forragem, maior será a concentração desta substância presente na gordura encontrada no leite e na carne.

4.1.3 – Cálculo dos Limites de Detecção e Quantificação

A concentração de AG encontrados nas amostras de forragens são baixos, assim se fez importante os cálculos do limite de detecção (LOD, *Limit of Detection*) e do limite de quantificação (LOQ, *Limit of Quantification*) do método. Sendo que o LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada e pode ser calculado de três maneiras diferentes:

1) método visual (determinado pela análise de amostras em concentrações conhecidas do analito).

2) método relação sinal-ruído (aplicada somente em procedimentos analíticos que exibem ruído da linha de base, comparando-se os sinais medidos a partir de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito).

3) método baseado em parâmetros da curva analítica (utilizando-se os coeficientes angular e linear da curva analítica) (GROUP, 2005).

O LOQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis e pode ser calculado através dos métodos: visual, relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica (GROUP, 2005).

No presente trabalho, tanto LOD quanto LOQ, foram calculados a partir da relação sinal-ruído de uma amostra de braquiaria de concentração conhecida. (Equações 13 e 14, respectivamente)

$$LOD = \frac{3 \times S_{ruído} \times C_{analito}}{H_{máxima} - H_{mínima}} \quad (13)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{ruído} \times C_{analito}}{H_{máxima} - H_{máxima}} \quad (14)$$

Onde: $S_{ruído}$ é o desvio padrão do ruído, $C_{analito}$ é a concentração do analito, $H_{máxima}$ é a altura máxima do pico e $H_{mínima}$ é a altura da base do pico.

Os limites de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$) foram 2,77 para C18:2 cis-9 cis-12 e 2,10 para C18:3 cis-9 cis-12 cis-15. Os limites de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$) foram 9,22 e 7,00 para C18:2 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15, respectivamente.

4.1.4 - Preparação das amostras para análise de AG por CZE-UV

As amostras foram secas pelo processo de liofilização, para garantir a estabilidade das insaturações, em seguida, as amostras foram moídas (moinho dotado de peneiras com perfurações de 1 mm) e armazenadas no freezer a uma temperatura de -20°C . Em seguida, as amostras foram extraídas e saponificadas conforme descrito no item 3.4.2.1. Com base na literatura, sabe-se que, as braquiárias contêm de 2 a 3% de lipídeos totais e desses, 40 a 50% são formados por AG. Logo, tem-se 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, sendo assim, é necessária a etapa de extração da fração lipídica. Em matrizes onde a concentração de ácidos graxos é mais elevada não é necessária a etapa de extração da fração lipídica.

As amostras foram injetadas, sendo necessárias duas diluições, para uma melhor resolução dos picos de interesse, diluição de 1:100 para o C18:2 cis-9 cis-12 e de 1:50 do C18:3 cis-9 cis-12 cis-15. Foi adicionado um volume fixo de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de C18:1 trans-9 usado PI em cada amostra para o processo de quantificação.

4.1.4.1 - Quantificação dos precursores de CLA por CZE

A quantificação dos AG de interesse (C18:2 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15) nas amostras de braquiárias foi baseada em um estudo estatístico envolvendo o cálculo do F_r usando o ácido elaídico C18:1 trans-9 como PI (DE CASTRO *et al.*, 2010).

Os valores de F_r calculados para todas as curvas de calibração foram menores que os valores tabelados como demonstra a Tabela 7, com isso pode-se afirmar que para o intervalo de 95% estimado, não há evidência de falta de ajuste no modelo implementado e, portanto, o F_r referente de cada equação da reta dos AG pode ser

utilizado para quantificar as amostras braquiárias ou outras matrizes, que apresentam concentrações de ácidos graxos dentro do intervalo das curvas construídas.

Tabela 7 - Valores de F_r calculados para curva de AG

AG	F_{cal}	F_{tab}	Coefficiente angular	Intercepto	r
C18:2	0,88	3,26*	0,542 ($\pm 0,010$)	0,953 ($\pm 0,012$)	0,99
C18:3	0,20	3,48&	0,052 ($\pm 0,055$)	-0,028 ($\pm 0,067$)	0,99

* $F_{tab}(v1=4,v2=12)$ e & $F_{tab}(v1=4,v2=10)$;
 v1: grau de liberdade do numerador; v2: grau de liberdade do denominador.
 Intervalo de 95% de confiança.

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

A expressão matemática que descreve o F_r está descrita a seguir na Equação 15:

$$\frac{A_{AG}}{[AG]} = F_r \frac{A_{PI}}{[PI]} \quad (15)$$

Onde: A_{AG} é a área do pico do padrão do AG de interesse; A_{PI} é a área do pico do padrão interno; $[AG]$ é a concentração do ácido graxo de interesse; F_r é o fator de resposta e $[PI]$ é a concentração de padrão interno fixada em 0,10 mmol L⁻¹.

Como foi adicionado o PI a cada amostra, basta utilizar os valores encontrados das áreas referentes na equação 15. Assim, teremos a concentração de cada ácido graxo de interesse, não havendo a necessidade da construção de uma nova curva de calibração para cada amostra distinta.

O percentual de AG encontrados em cada amostra, pode ser calculado através de um rearranjo da equação 15, levando em conta a massa pesada da amostra e o fator de diluição, como demonstra a equação 16.

$$AG(mg/g \text{ de amostra pesada}) = \frac{A_{AG} \cdot [PI] \cdot V \cdot MM_{AG}}{F_r \cdot A_{PI} \cdot m} \quad (16)$$

Onde: A_{AG} é a área de cada ácido graxo correspondente, $[PI]$ é a concentração do padrão interno, V é o volume utilizado para diluir a massa de amostra em litros, MM_{AG} é a massa molar do ácido graxo correspondente em $g\ mol^{-1}$, F_r é o fator de resposta obtido pela curva do modelo descritivo obtido com padrões, A_{PI} é a área correspondente ao padrão interno e m é a massa de amostra pesada em miligramas.

Foram realizadas injeções das 84 amostras de braquiárias, sendo 80 clones de *B. ruzizensis* e três testemunhas do experimento (uma *B. brizantha*, uma *B. decumbes* e uma *B. ruzizensis* comercial), nas quais, se sabe a concentração de AG. O intuito era selecionar através da concentração dos precursores do CLA os clones que apresenta-se as maiores concentrações. Os valores se encontram respectivamente, nas Tabela 8 e Tabela 9.

Tabela 8 - Resultado da quantificação do C18:2 cis-9 cis-12

Am	C18:2/C18:1t	Massa (mg g⁻¹)	Am	C18:2/C18:1t	Massa (mg g⁻¹)
1	0,41	3,45	44	0,51	4,34
2	0,47	3,97	45	0,60	5,04
3	0,36	3,05	46	0,59	4,96
4	0,38	3,22	47	0,56	4,70
5	0,42	3,55	48	0,41	3,48
6	0,50	4,21	49	0,52	4,38
7	0,44	3,68	50	0,41	3,48
8	0,45	3,75	51	0,40	3,40
9	0,38	3,20	52	0,33	2,81
10	0,40	3,37	53	0,39	3,31
12	0,44	3,71	54	0,43	3,58
13	0,47	3,99	55	0,37	3,14
14	0,53	4,48	56	0,35	2,92
15	0,43	3,60	57	0,41	3,44
16	0,33	2,81	58	0,47	3,99
17	0,41	3,41	59	0,41	3,45
18	0,34	2,86	60	0,41	3,44
19	0,40	3,33	61	0,53	4,44
20	0,50	4,25	62	0,40	3,39
21	0,52	4,37	63	0,40	3,33
22	0,36	3,05	64	0,36	3,07
23	0,45	3,79	65	0,41	3,49
24	0,55	4,62	66	0,57	4,75
25	0,41	3,42	67	0,41	3,45
26	0,41	3,45	68	0,36	3,02
27	0,37	3,11	69	0,37	3,14
28	0,50	4,17	70	0,39	3,27
29	0,40	3,37	71	0,36	3,05
30	0,41	3,43	72	0,40	3,32
31	0,50	4,23	73	0,41	3,46
32	0,39	3,29	74	0,37	3,11
33	0,34	2,83	75	0,36	3,02
34	0,44	3,75	76	0,38	3,19
35	0,34	2,86	77	0,39	3,27
36	0,45	3,81	78	0,35	2,92
37	0,40	3,35	79	0,45	3,79
38	0,39	3,30	80	0,45	3,81
39	0,46	3,86	81	0,44	3,69
40	0,41	3,48	82	0,39	3,26
41	0,46	3,86	83	0,41	3,45
42	0,43	3,61	84	0,39	3,25
43	0,53	4,44			

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

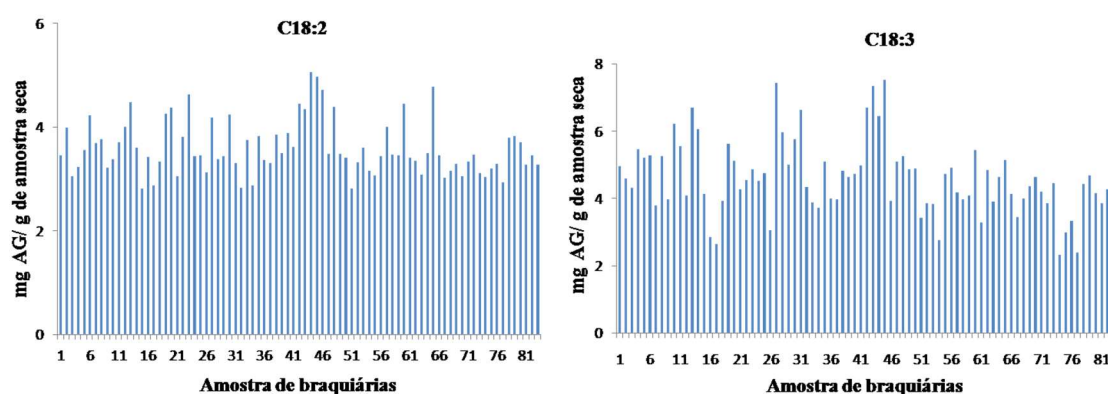
Tabela 9 - Resultado da quantificação do C18:3 cis-9 cis-12 cis-15

Am	C18:3/C18:1t	Massa (mg g⁻¹)	Am	C18:3/C18:1t	Massa (mg g⁻¹)
1	1,95	4,92	44	2,88	7,27
2	1,80	4,55	45	2,53	6,38
3	1,70	4,28	46	2,96	7,47
4	2,14	5,40	47	1,54	3,89
5	2,04	5,15	48	2,00	5,05
6	2,07	5,22	49	2,06	5,20
7	1,49	3,77	50	1,91	4,82
8	2,07	5,22	51	1,92	4,84
9	1,56	3,93	52	1,34	3,39
10	2,44	6,15	53	1,52	3,83
12	2,18	5,51	54	1,51	3,80
13	1,60	4,04	55	1,08	2,73
14	2,63	6,64	56	1,58	3,99
15	2,38	6,00	57	1,93	4,87
16	1,62	4,09	58	1,64	4,14
17	1,12	2,82	59	1,56	3,94
18	1,04	2,62	60	1,60	4,05
19	1,54	3,90	61	2,14	5,39
20	2,20	5,57	62	1,29	3,24
21	2,01	5,08	63	1,90	4,78
22	1,68	4,24	64	1,53	3,86
23	1,78	4,49	65	1,82	4,59
24	1,91	4,82	66	2,02	5,08
25	1,78	4,48	67	1,62	4,10
26	1,86	4,70	68	1,35	3,42
27	1,20	3,02	69	1,57	3,95
28	2,91	7,35	70	1,71	4,31
29	2,34	5,90	71	1,82	4,60
30	1,96	4,95	72	1,65	4,16
31	2,26	5,72	73	1,51	3,82
32	2,60	6,56	74	1,75	4,42
33	1,70	4,29	75	0,91	2,30
34	1,52	3,85	76	1,17	2,96
35	1,46	3,68	77	1,31	3,30
36	2,00	5,04	78	0,94	2,36
37	1,57	3,97	79	1,74	4,38
38	1,56	3,94	80	1,84	4,63
39	1,89	4,78	81	1,63	4,10
40	1,82	4,58	82	1,51	3,81
41	1,85	4,67	83	1,68	4,24
42	1,95	4,92	84	1,51	3,79
43	2,63	6,62			

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O que se pode observar é que ocorreu uma grande variação na concentração dos precursores de CLA mediante aos diferentes tipos de genótipos, como mostram os gráficos na Figura 16.

Figura 16 - Gráficos de barras das concentrações encontradas dos precursores de CLA nas amostras de braquiárias



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Os resultados encontrados no experimento foram utilizados para o programa de melhoramento genético, pois estes resultados evidenciaram a existência de variabilidade genética dentro da espécie *B. ruzizienses*.

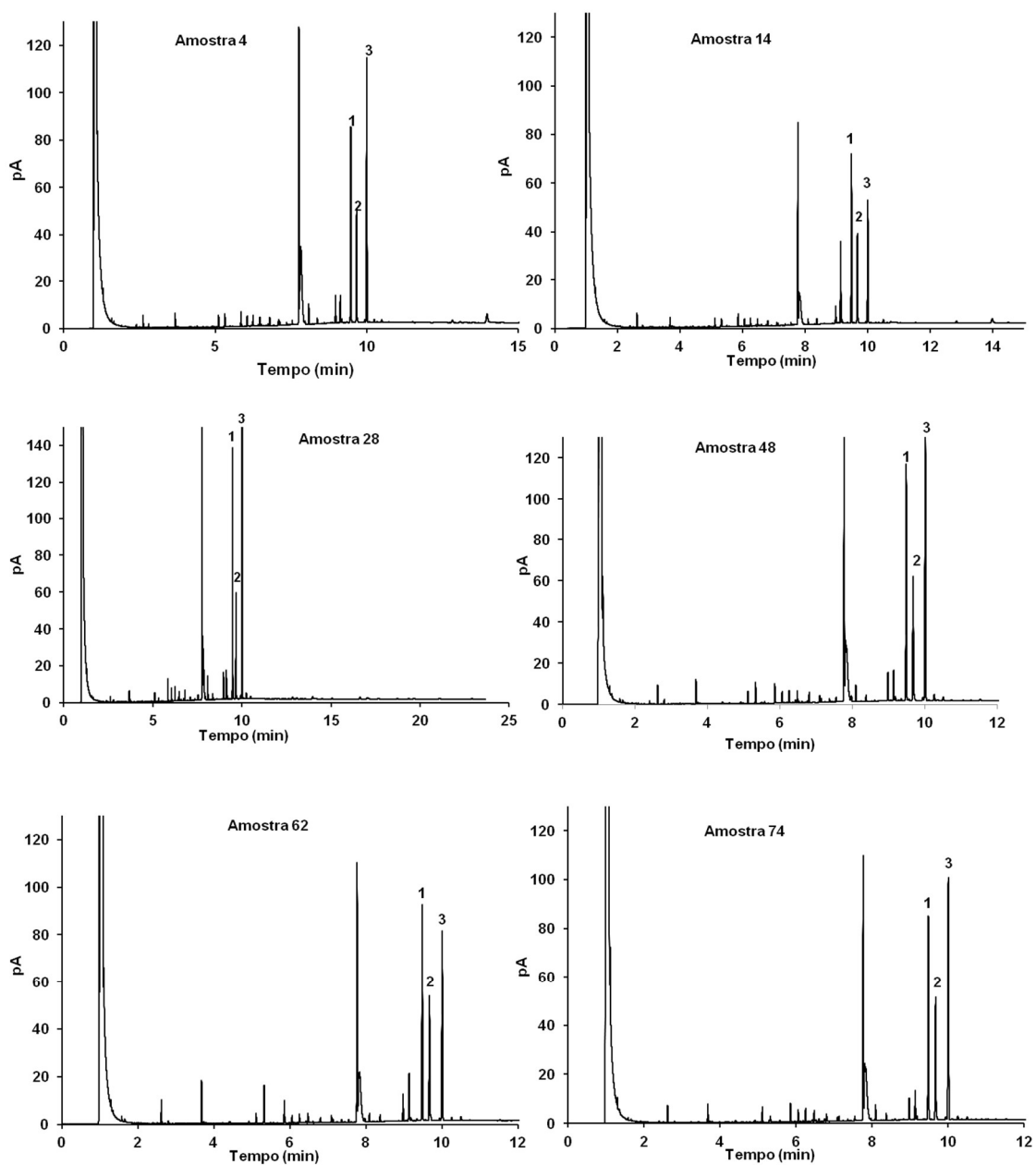
Associando a alta variabilidade genética detectada entre os clones de *B.ruzizienses* com a informação de que quanto maiores os teores destes compostos na forragem, maiores são os valores de CLA obtidos no leite das vacas alimentadas, a análise dos precursores de CLA, por CZE, torna-se uma ferramenta auxiliar para o programa de melhoramento genético, pois com essas informações, poderão ser obtidos cultivares de forrageiras com maiores concentrações de C18:2 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15, o que levaria a produção de leite com características nutracêuticas mais favoráveis.

4.1.5 - Análise dos precursores de CLA em amostra de braquiária por GC

4.1.5.1- Preparação das amostras

Foram selecionadas 6 amostras de forma aleatória dos 80 clones selecionado para análise nesse trabalho, a fim de verificar a concentração dos precursores de CLA pelo método oficial, O processo de extração e quantificação das amostras foram realizados conforme descrito nos itens 3.4.2.2 e 3.4.4. Os seis cromatogramas obtidos estão representados na Figura 17, onde estão identificados o C19:0, que foi adicionado como PI, o C18:2 cis-9 cis-12 e o C18:3 cis-9 cis-12 cis-15.

Figura 17 - Cromatogramas de seis amostras de braquiárias ruziziensis. Representação dos sinais: 1 - C19:0 (PI), 2 - C18:2 cis-9 cis-12 e 3 - C18:3 cis-9 cis-12 cis -15

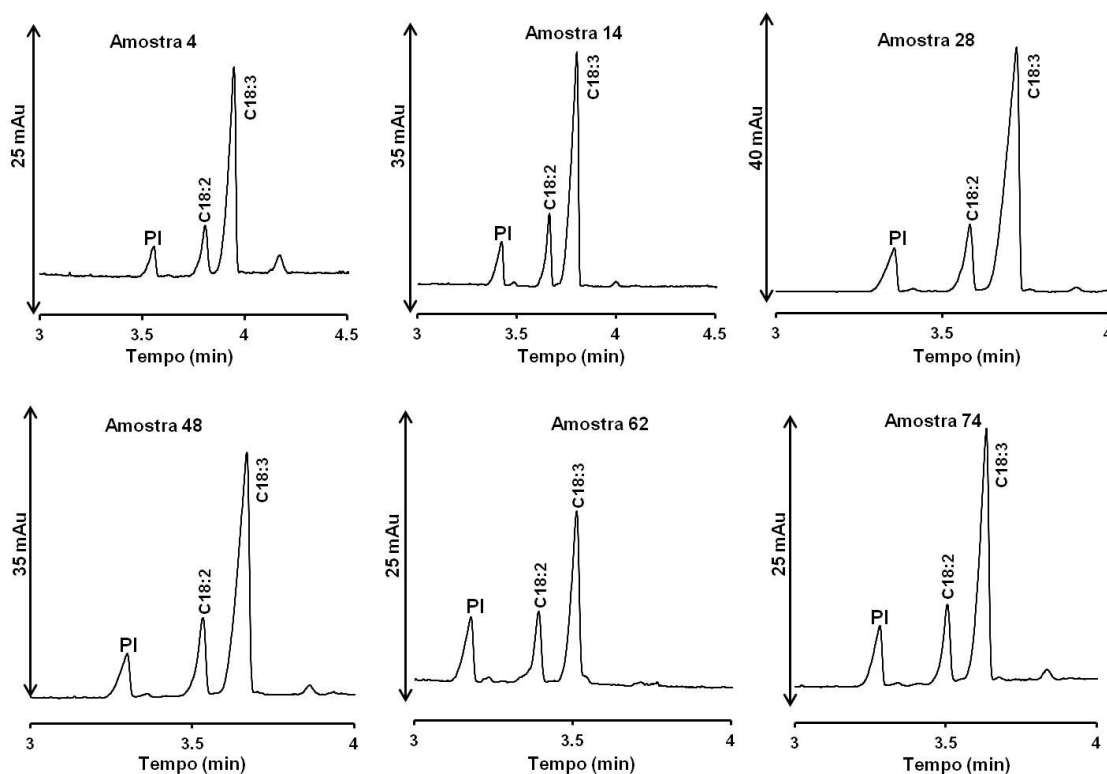


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

4.1.5.2- Comparação entre GC e CE

Para mostrar a confiabilidade do método proposto por CZE para determinação dos precursores de CLA, os resultados obtidos foram comparados com a metodologia oficial por GC. Os cromatogramas obtidos para seis amostras de forragem, selecionadas aleatoriamente estão apresentados na Figura 17 e os eletroferogramas destas mesmas amostras estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Eletroferogramas das seis amostras aleatórias de braquiárias ruziziensis que foram comparadas com resultado de GC. Representação do sinal: PI- C18:1 trans-9



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

A Tabela 10 apresenta os resultados estatísticos obtidos para CE e GC (Teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste t-student pareado). Para teste de normalidade, não foram encontradas diferenças significativas para intervalos de 95% de confiança. Em

relação ao teste *t-student* pareado, que trata-se da comparação de um conjunto de dados de amostras diferentes, não foram verificadas diferenças significativas entre as duas metodologias em um intervalo de 95% de confiança entre o método alternativo por CZE e o método oficial por GC (p-valor > 0,05).

Tabela 10 - Resultados dos valores de AG em GC e CE

Amostras	AG	CG(mg/g)	CE (mg/g)
4	C18:2	3,35	3,22
	C18:3	5,30	5,40
17	C18:2	3,72	3,41
	C18:3	3,04	2,82
28	C18:2	4,28	4,17
	C18:3	7,44	7,35
48	C18:2	3,49	3,48
	C18:3	5,17	5,05
62	C18:2	3,31	3,39
	C18:3	3,28	3,24
74	C18:2	3,19	3,11
	C18:3	4,42	4,42

Teste Shapiro-Wilk: C18:2 cis-9 cis-12 p-value 0,875 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 p-value 0,999

Teste t pareado: C18:2 cis-9 cis-12 p-value 0,135 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 p-value 0,232

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

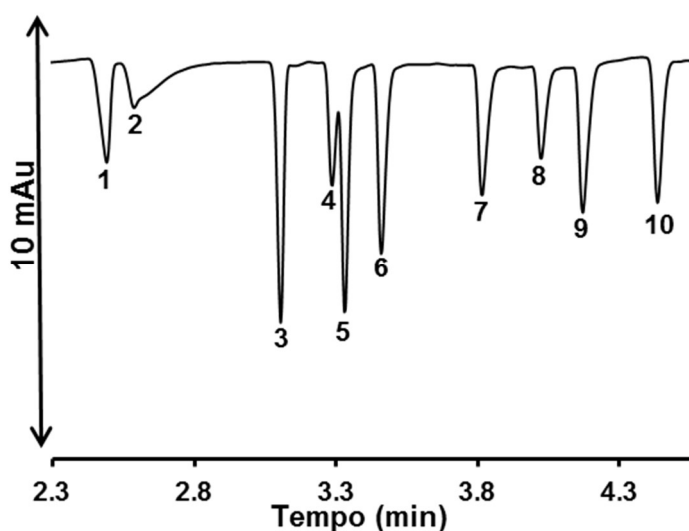
4.2 - ANÁLISE DE ALGUNS ÁCIDOS ORGÂNICOS EM AMOSTRA DE BRAQUIÁRIA POR CZE

4.2.1 - Otimização das condições de análises

O eletrólito utilizado para as análises de ácidos orgânicos foi baseado em um trabalho publicado pelo GQAQ (VAZ *et al.*, 2012) que consiste em 20 mmol L⁻¹ de ácido ftálico, 15 mmol L⁻¹ de TRIS, 0,8 mmol L⁻¹ de CTAB em pH= 3,40 (ajustado com

uma solução de 16 mmol L⁻¹ de TRIS). Uma mistura com os padrões foi injetada hidrodinamicamente a uma pressão de 0,3 psi, por 3 segundos e o sistema eletroforético foi operado em polaridade invertida e voltagem constante de -15 kV, conforme descrito no trabalho a fim de se verificar a separação dos ácidos orgânicos (Figura 19) (VAZ *et al.*, 2012).

Figura 19 - Eletroferograma de mistura de padrões de ácidos orgânicos na concentração de 1,0 mmol L⁻¹, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2-ácido pirúvico, 3-ácido fórmico, 4-ácido cítrico, 5-ácido málico, 6-ácido tartárico, 7-ácido láctico, 8-ácido aspártico, 9-ácido succínico e 10-ácido acético



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Após a primeira avaliação de separação dos ácidos orgânicos, verificou-se que os picos referentes aos ácidos cítrico e málico não apresentavam uma resolução acima de 1,5, que é o valor recomendado. Um primeiro planejamento 3² descrito na Tabela 11, foi realizado com o intuito de encontrar um eletrólito capaz de melhorar a separação desses dois analitos que estavam coeluído.

Tabela 11 - Valores do planejamento fatorial ácido ftálico/TRIS

Fatores	Limite inferior	Valor referência	Limite superior
Ácido ftálico (mmol L ⁻¹)	19	20	21
TRIS (mmol L ⁻¹)	14	15	16

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

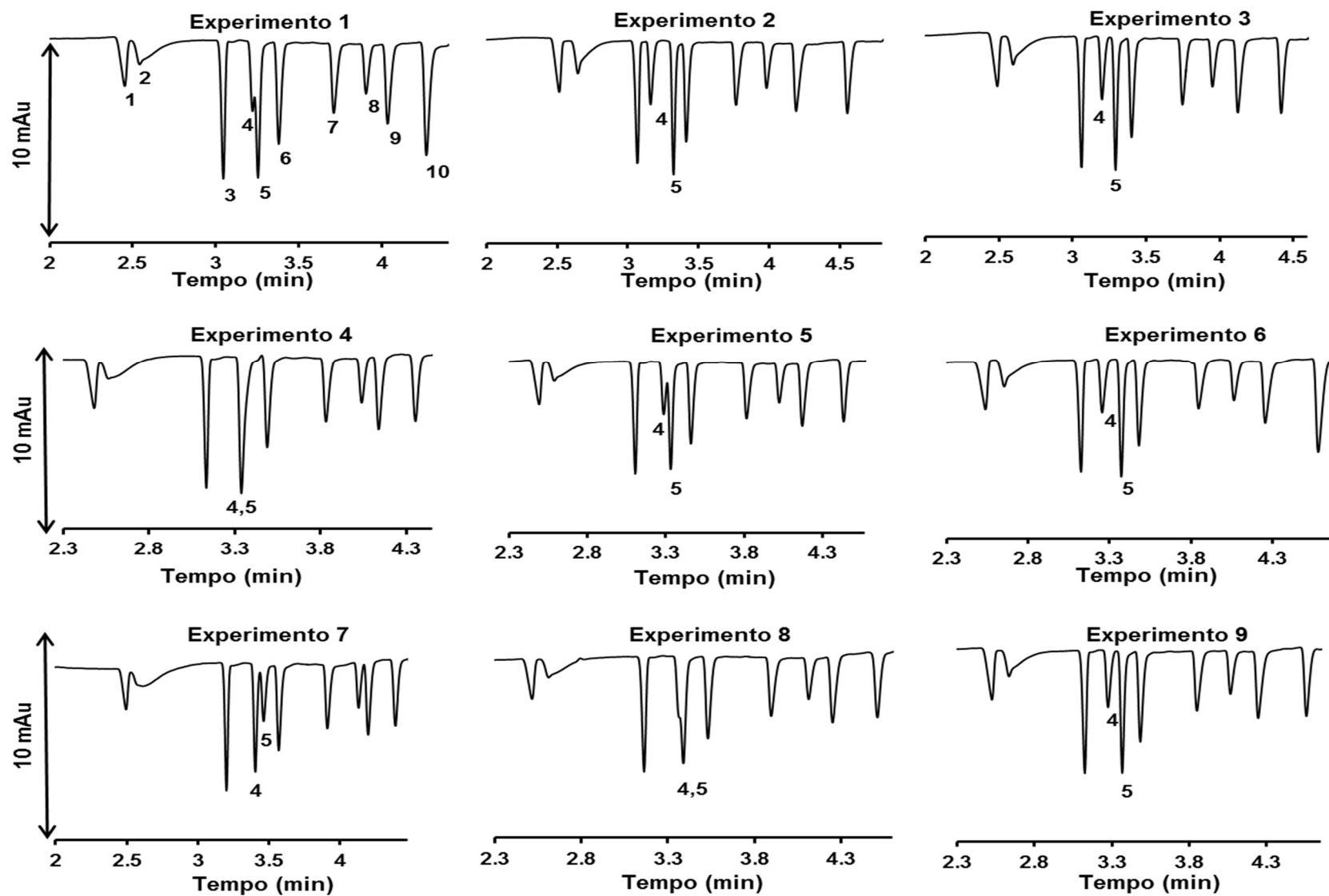
Variou-se a concentração do ácido ftálico e o Tris como demonstra a Tabela 12, as demais condições experimentais como concentração do inversor do fluxo eletrosmótico (CTAB), comprimento do capilar, voltagem, pressão, tempo de injeção, comprimento de onda e temperatura no interior do cartucho foram mantidas constantes, A Figura 20 mostra os eletroferogramas obtidos no planejamento.

Tabela 12 - Planejamento fatorial 3^2 para a concentração de ácido ftálico e Tris

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ácido ftálico (mmol L ⁻¹)	-	-	-	0	0	0	+	+	+
Tris (mmol L ⁻¹)	-	0	+	-	0	+	-	0	+

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Figura 20 - Eletroferogramas de mistura de padrões de ácidos orgânicos ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) para o planejamento fatorial ácido ftálico/TRIS. Ácidos: 1- oxálico, 2- pirúvico, 3- fórmico, 4- cítrico, 5- málico, 6- tartárico, 7- lático, 8- aspártico, 9- succínico e 10- acético



É possível observar na Figura 20 que os eletrólitos representados pelos números 2, 3, 6 e 9 apresentam a separação completa de todos AO avaliados em menos de 5 minutos, com uma resolução linha base acima de 1,50, resolução mínima para completa separação dos picos (MILLER; MCNAIR, 2009).

Para a seleção da melhor composição do eletrólito, foram calculadas a resolução entre os picos dos ácidos cítrico e málico ($R_{4,5}$), por serem pares críticos, com tempos de migração mais próximos. Os valores das resolução dos eletrólitos que visivelmente apresentaram uma resolução acima de 1,50, estão apresentados na Tabela 13. A equação 17 foi utilizada para o cálculo das resoluções.

$$R = 1,175 \frac{(t_{(i+1)} - t_i)}{(w_{1/2(i)} + w_{1/2(i+1)})} \quad (17)$$

Onde: t é o tempo de migração dos analitos, $w_{1/2}$ é a largura do pico à meia altura e o índice i corresponde ao analito (neste caso, 4 e 5)

Tabela 13 - Resolução dos picos adjacentes para planejamento fatorial da concentração ácido ftálico/TRIS

Eletrólito	$R_{4,5}$
2	1,98
3	3,46
6	2,56
9	1,95

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O eletrólito selecionado foi o número 3 que apresentou maior resolução entre os picos adjacentes (4 e 5), constituído por 19 mmol L⁻¹ de ácido ftálico, 16 mmol L⁻¹ de TRIS e 0,8 mmol L⁻¹ de CTAB, com pH 3,50.

Outro planejamento 3² descrito nas Tabela 14 e Tabela 15 foi realizado com o intuito de encontrar uma melhor condição de tempo de injeção e pressão na injeção da amostra. Foi variada a pressão e o tempo de injeção.

Tabela 14 - Valores do planejamento fatorial pressão/tempo de injeção

Fatores	Limite inferior	Valor referência	Limite superior
Pressão (psi)	0,3	0,4	0,5
Tempo de injeção (segundos)	2	3	4

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

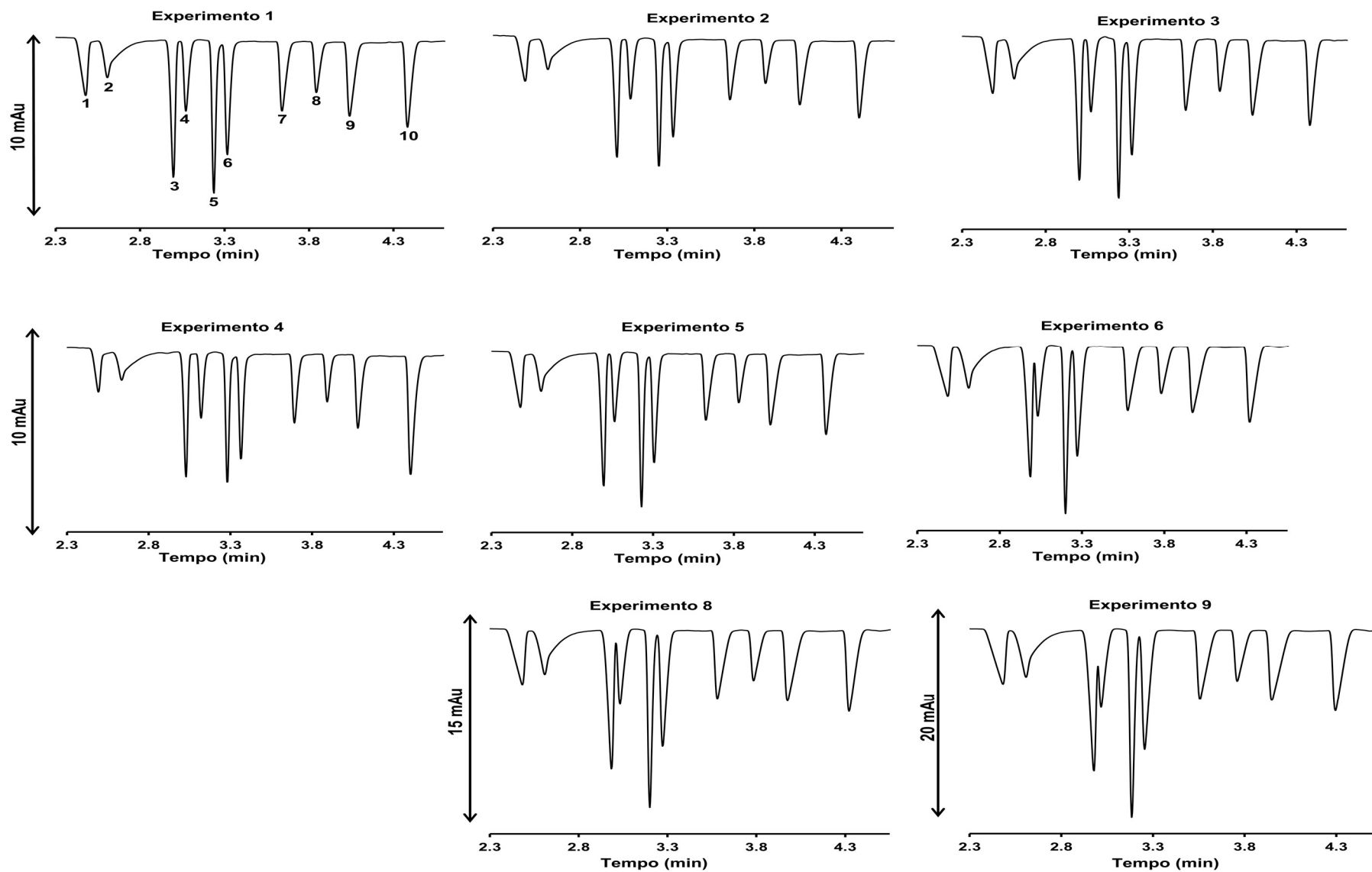
Tabela 15 - Planejamento fatorial 3^2 para a pressão e tempo de injeção

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pressão (psi)	-	-	-	0	0	0	+	+	+
Tempo de injeção (segundos)	-	0	+	-	0	+	-	0	+

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Neste planejamento, o experimento 7, que consiste na pressão de 0,5 psi com um tempo de injeção de 2s não foi realizado, uma vez que, esta condição não é permitida pelo equipamento. A tabela 15 mostra os eletroferogramas obtidos no planejamento.

Figura 21 - Eletroferogramas de mistura de padrões na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o planejamento fatorial da pressão e tempo de injeção, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2-ácido fórmico, 3- ácido cítrico, 4- ácido málico, 5-ácido aspártico e 6-ácido succínico



Com o aumento da pressão, verificou-se um comprometimento na separação dos analitos, como podemos observar nos testes 6, 8 e 9 como podemos observar na tabela 16, os demais testes apresentaram resultados satisfatórios. Assim, calculou-se a resolução dos picos adjacentes entre os testes 1, 2, 3, 4 e 5 para se encontrar a melhor condição, esses valores estão apresentados na Tabela 16. Foram calculados, a resolução dos picos 3, 4, 5 e 6 referentes aos ácidos fórmico, cítrico, málico e tartárico, respectivamente, por serem os ácidos que migram com um tempo de eluição bem próximo.

Tabela 16 - Resolução dos picos adjacentes para planejamento fatorial pressão/tempo de injeção

Experimento	R_{3,4}	R_{5,6}
1	2,01	1,93
2	1,56	1,77
3	1,30	1,61
4	1,45	1,70
5	1,27	1,66

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O experimento 1 apresentou maior resolução, portanto foi selecionado a condição de **0,3 psi por 2 segundos** para a injeção das amostras.

4.2.2 - Relação dos ácidos orgânicos com os estresses causados nas plantas

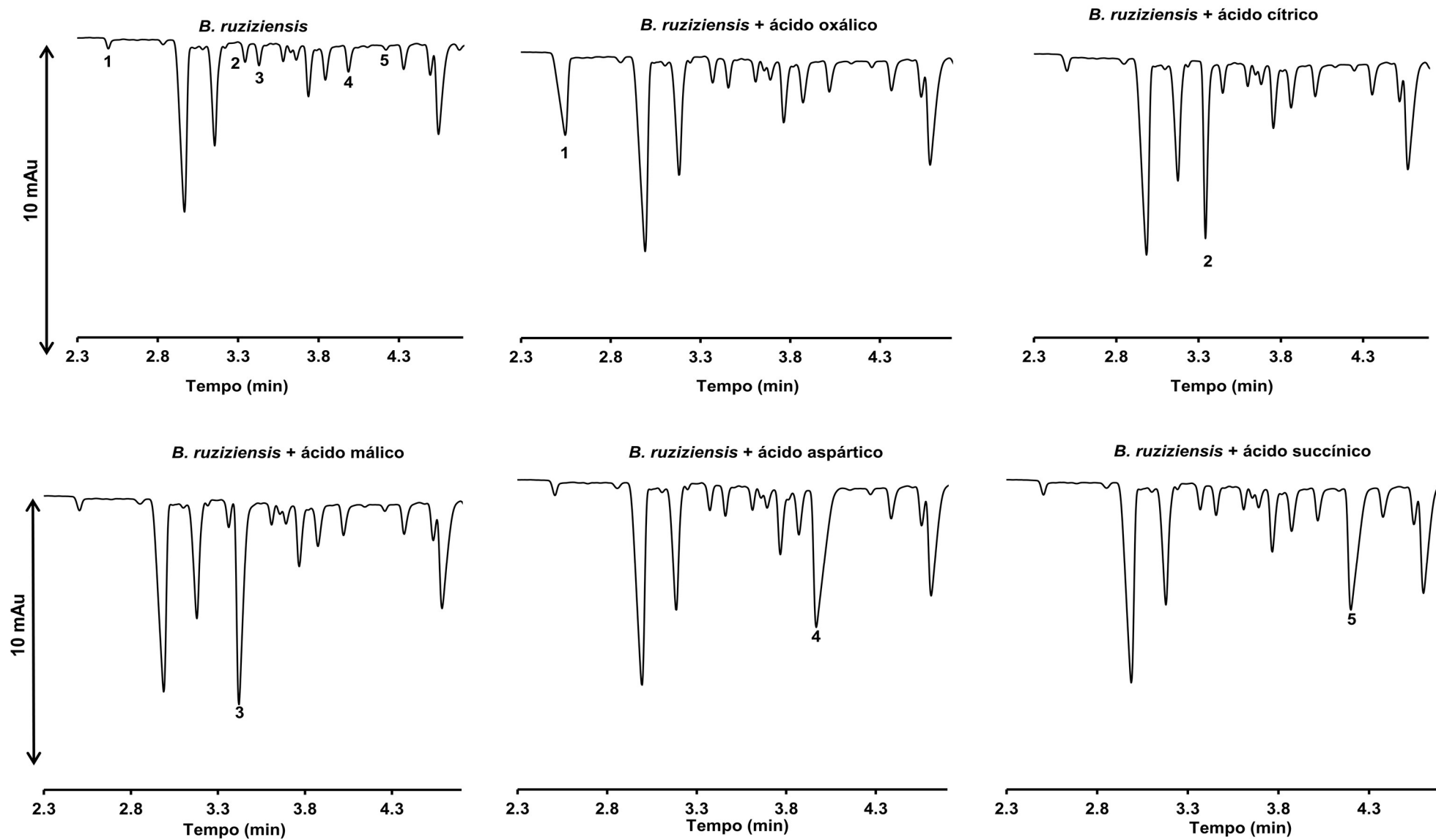
4.2.2.1- Preparação das amostras para análise no CZE

As amostras foram extraídas de acordo com a figura 10 e injetadas no equipamento de eletroforese capilar (sem nenhum processo de diluição). Foi adicionado, em cada amostra, 1,0 mmol L⁻¹ de ácido propiônico como PI para a quantificação.

4.2.2.2 - Identificação dos ácidos orgânicos

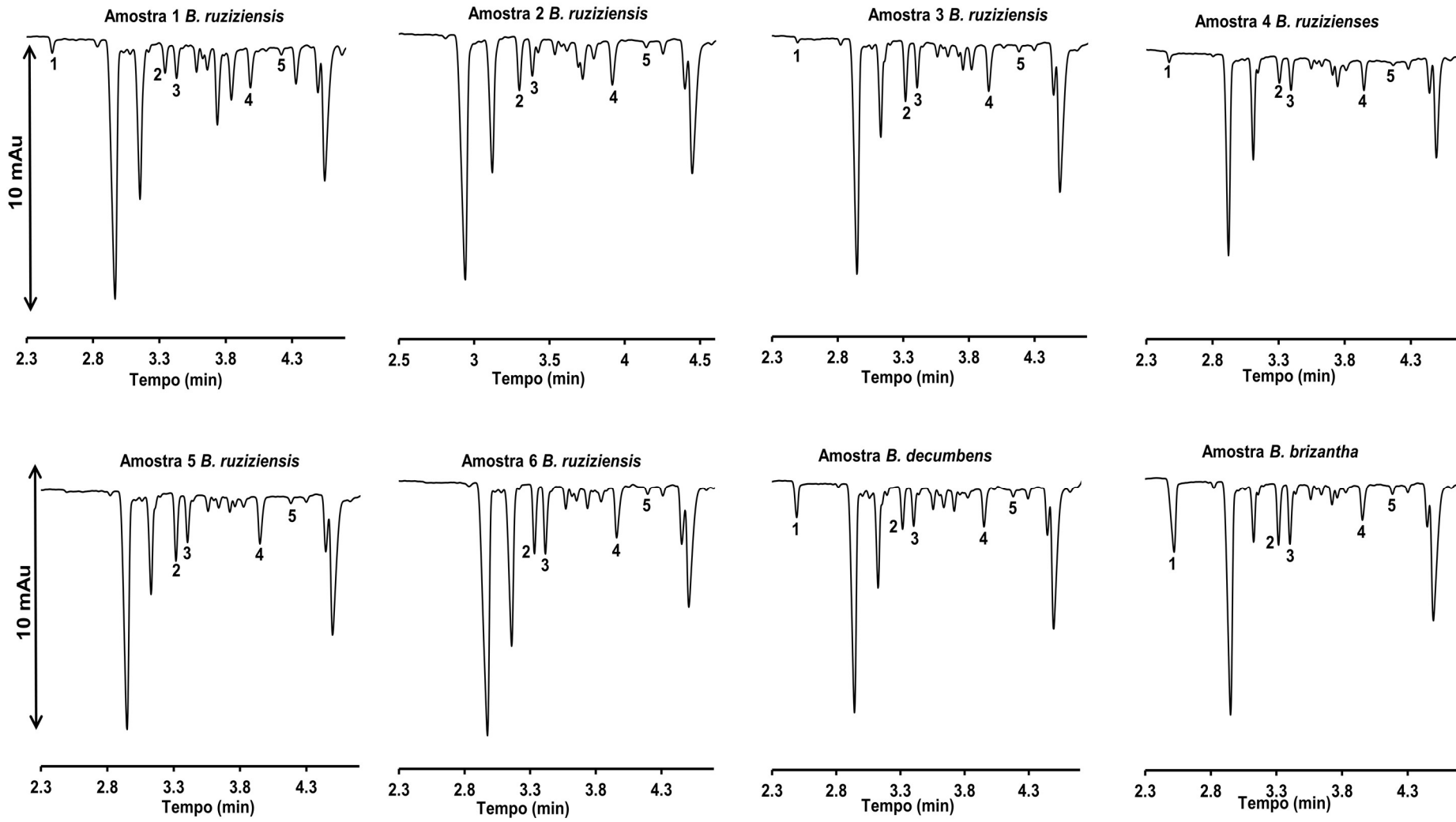
Foi adicionado a uma mesma amostra de *B.ruzizensis*, um volume fixo e conhecido de cada AO separadamente ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), a fim de verificar se realmente teria uma aumento do AO referente, em outras palavras, foi realizada a “dopagem” da amostra com padrão. Sendo assim, foi possível identificar 4 ácidos orgânicos presentes nas amostras de braquiárias (cítrico, málico, aspártico e o succínico), como demonstra na figura 22.

Figura 22 - Eletroferogramas da amostra 1 no tempo zero com a adição de cada ácido orgânico correspondente na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo os picos: 1- oxálico, 2- cítrico, 3- málico, 4- aspártico e 5- succínico



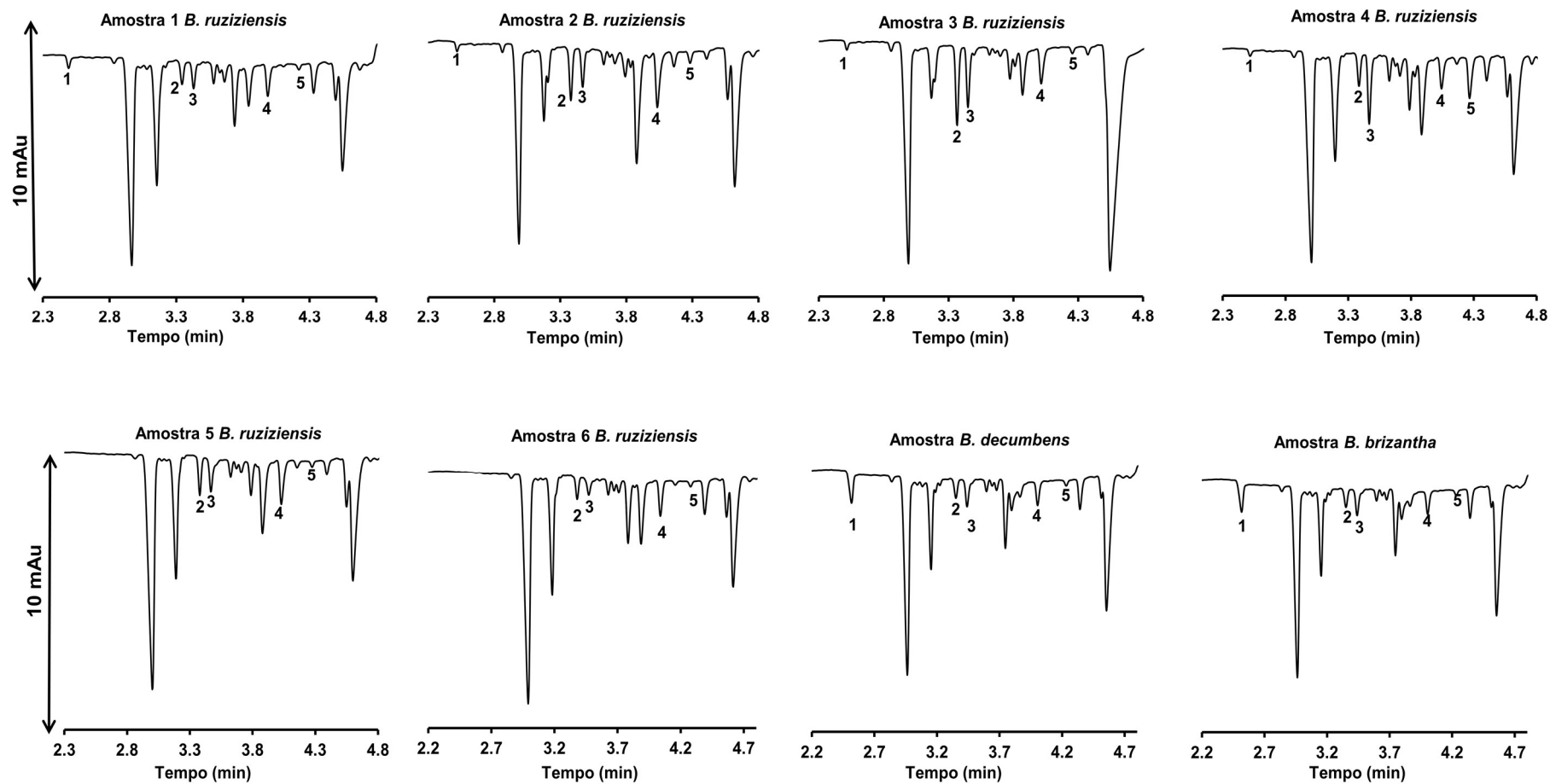
No intuito de identificar a presença de algum desses 10 ácidos orgânicos nas condições otimizadas mencionadas, foi injetado, primeiramente, as amostras que não tiveram contato com nenhum inseto, nomeadas como “tempo zero” (23). Sendo possível a identificação dos ácidos cítrico, málico, aspártico e succínico.

Figura 23 - Eletroferogramas das amostras tempo zero, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2 - ácido cítrico, 3- ácido málico, 4 - ácido aspártico e 5 - ácido succínico



As amostras que permaneceram na presença do inseto por 8 dias foram injetadas, a fim de se verificar o aumento ou a diminuição dos AO identificados. Os eletroferogramas estão mostrados na figura 24.

Figura 24 - Eletroferogramas das amostras no 8^a dia com a presença de cigarrinhas, sendo os picos: 1- ácido oxálico, 2 - ácido cítrico, 3- ácido málico, 4 - ácido aspártico e 5 - ácido succínico



4.2.3 - Quantificação dos ácidos orgânicos

Foram realizados os cálculos para os F_r dos AO de interesse, sendo que os valores de F_{cal} foi menor que o valor de F_{tab} para todas as curvas analíticas obtidas. Então, pode-se afirmar, com 95% de confiança, que para o intervalo estimado, não há evidências de falta de ajuste nos modelos implementados e, portanto, os F_r encontrados podem ser utilizados para quantificar os AO. Os valores encontrados no ajuste do modelo estão contidos nas Tabela 17 e Tabela 18.

Tabela 17 - Cálculo do fator de resposta para 1ª curva de AO

<i>AO</i>	<i>C.angular</i>	<i>Intercepto</i>	<i>r</i>	<i>F_r</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>F_{sig}</i>	<i>F_{tab}</i>
Ácido Cítrico	1,120 (± 0,015)	-0,009 (± 0,002)	0,99	1,12	1,37	1913	$F_{6,15} = 2,79$
Ácido Málico	1,236 (± 0,006)	-0,007 (± 0,001)	0,99	1,236	1,90	5949	$F_{8,18} = 2,51$
Ácido Aspártico	1,301 (± 0,016)	-0,006 (± 0,004)	0,99	1,301	1,11	7021	$F_{8,20} = 2,45$
Ácido Succínico	1,199 (± 0,014)	-0,005 (± 0,004)	0,99	1,199	1,55	6684	$F_{8,20} = 2,45$

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Tabela 18 - Cálculo do fator de resposta para 2ª curva de AO

<i>AO</i>	<i>C.angular</i>	<i>Intercepto</i>	<i>r</i>	<i>F_r</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>F_{sig}</i>	<i>F_{tab}</i>
Ácido Cítrico	1,349 (± 0,019)	-0,108 (± 0,026)	0,99	1,349	2,04	4784	$F_{5,11} = 3,20$
Ácido Málico	1,278 (± 0,009)	-0,024 (± 0,005)	0,99	1,278	2,34	2175	$F_{5,13} = 3,03$
Ácido Aspártico	1,388 (± 0,024)	-0,054 (± 0,033)	0,99	1,388	2,91	3332	$F_{4,11} = 3,36$
Ácido Succínico	1,339 (± 0,018)	-0,041 (± 0,024)	0,99	1,339	2,21	5628	$F_{5,12} = 3,11$

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

4.2.3.1 - Determinação do teor de ácidos orgânicos nas amostras de braquiárias

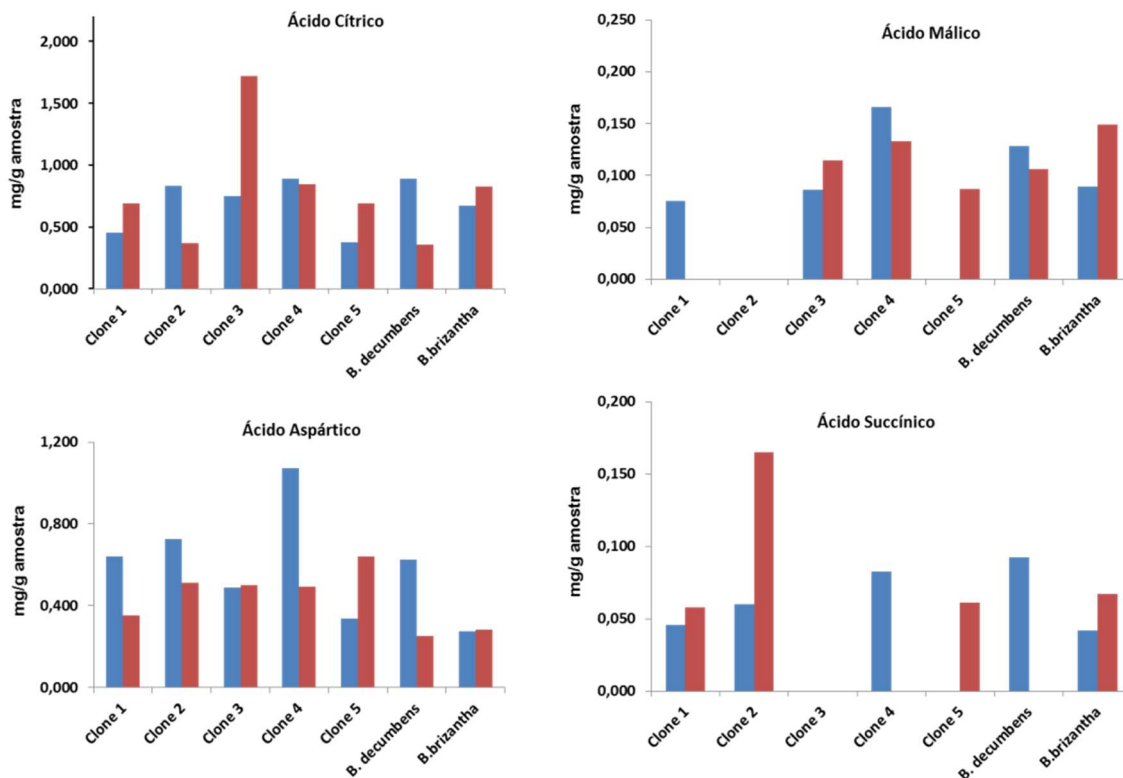
As amostras foram injetadas e quantificadas utilizando os fatores de resposta dos ácidos correspondentes de acordo com a Equação 18, onde se determinou a quantidade de ácido orgânico expresso em mg por 1 grama de amostra pesada.

$$m(\text{mg}) = \frac{A_{AO} \cdot C_{PI} \cdot V \cdot MM}{A_{PI} \cdot F_r} \quad (18)$$

Onde: A_{AO} é a área de cada AO em questão, A_{PI} é a área do ácido propiônico, C_{PI} é a concentração do ácido propiônico fixada em $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$, F_r é o coeficiente angular do modelo obtido para cada AO, V é o volume do estoque em litros e MM é a massa molecular de cada ácido orgânico correspondente.

Foi possível a identificação e quantificação de quatro ácidos orgânicos sendo eles: os ácidos cítrico, málico, aspártico e succínico. Os eletroferogramas estão representados nas figuras 23 e 24, sendo as amostras antes do ataque dos insetos identificadas como tempo zero e as amostras identificadas como 8º dia são as que ficaram na permanência dos insetos por 8 dias. Os resultados foram exibidos em forma de gráficos de barras representados na figura 25, sendo que alguns ácidos ficaram abaixo do limite de detecção do método e não puderam ser quantificados.

Figura 25 - Representação da variação da concentração dos ácidos quantificados onde a barra azul representa a planta no “tempo zero” e barra vermelha a planta na presença do inseto por 8 dias



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

As braquiárias *B.brizantha* e *B.decumbens* apresentaram comportamentos opostos, em relação aos AO identificados, como demonstram os gráficos de barras da 25, onde a barra de cor azul representa a concentração dos ácidos presentes nas forragens que não tiveram contato com os insetos (tempo zero) e a barra de cor vermelha representa a concentração dos ácidos presentes nas forragens na presença da cigarrinhas por 8 dias (8ª Dia). Na *B.brizantha* a concentração de todos os ácidos orgânicos aumentaram com a presença do inseto e na *B. decumbens* essas concentrações diminuíram com a presença das cigarrinhas. Como essas espécies de forrageiras apresentam um comportamentos opostos quanto a resistência ao estresse causado pela presença das cigarrinhas, sendo a *B.brizantha* resistente e a *B.decumbens* suscetível.

Conclui-se que essa resistência está relacionada com a alteração desses AO nas plantas. Assim, foi realizada uma comparação com a alteração na concentração dos AO dos clones a fim de verificar qual clone estava mais próximo da *B.brizantha* e da *B. decumbens*.

O clone 5 apresentou um comportamento similar ao da *B.brizantha*, uma vez que, a concentração do ácido cítrico aumentou com a presença do inseto; a concentração do ácido málico aumentou, sendo que, antes da presença do inseto a concentração era abaixo do limite de detecção e com a presença do inseto ocorreu um grande aumento; a concentração de ácido aspártico teve um grande aumento com a presença do inseto e com a concentração do ácido succínico ocorreu um grande aumento, porém, antes da presença do inseto a concentração era abaixo do limite de detecção e com a presença do inseto aumentou.

O comportamento do clone 4 foi similar ao da *B.decumbens*, pois a concentração do ácido cítrico diminuiu com a presença do inseto; a concentração do ácido málico diminuiu com a presença do inseto, a concentração de ácido aspártico teve um grande diminuição e o ácido succínico que antes da presença do inseto estava presente na forragem, com a presença da cigarrinha esse ácido ficou abaixo do limite de detecção do método, ou seja, sua redução foi tão acentuada que não foi possível detectar pelo método CZE.

Esses dois clones de *B. ruzizensis* foram selecionados dentro do programa de melhoramento genético desta espécie como resistentes e suscetíveis, respectivamente, às cigarrinhas. Esse resultado reforça a possibilidade de associação do padrão de alteração da concentração dos ácidos orgânicos na presença dos insetos a resistência ou suscetibilidade das plantas de braquiária.

Nos clones 1, 2 e 3 não foi possível a comparação com as plantas referências, uma vez que, ainda não se pode relacionar qual ou quais ácidos realmente expressam seu comportamento, diante da presença do inseto.

5 - CONCLUSÃO

Um estudo para a otimização da análise simultânea dos AG precursores do CLA C18:2 9 cis-9 cis-12 e C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 foi realizada e, através de avaliações estatística em um estudo de otimização, chegou-se a uma condição ótima, onde se é possível analisar os dois precursores de CLA por CZE em um tempo menor que 4 minutos. Os componentes do eletrólito capaz de realizar a separação simultânea desses ácidos corresponde: **17% de metanol, 33% de ACN, 12 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, 12 mmol L⁻¹ de Brij 35. O capilar TSU de 34 cm de comprimento total, sendo 25,5 cm de comprimento efetivo e 8,5 cm até a janela de detecção, 4 segundos de injeção a 25 mbar e a voltagem de +26 kV.**

Após a etapa de otimização do eletrólito, a quantificação dos precursores de CLA foi realizada em 80 clones de *B.ruzizensis*. Para isso, foi utilizado o cálculo de um fator de resposta (F_R) para cada AG utilizando C18:1 trans-9 como padrão interno (PI). Após verificada a linearidade dos modelos matemáticos de quantificação propostos, a metodologia foi aplicada em amostras reais, onde se verificou uma variabilidade na concentração desses ácidos entre os clones, assim, a possibilidade de seleção dos materiais que apresentaram uma maior concentração dos precursores e, portanto, com maior potencial para aumentar o teor de CLA no leite e nos produtos lácteos.

A metodologia por CZE otimizada neste trabalho foi aplicada satisfatoriamente nas amostras de interesse, uma vez que os resultados obtidos foram comparados com a metodologia oficial (cromatografia à gás) e nenhuma evidência de diferença significativa entre as duas metodologias foi observada dentro do intervalo de 95% de confiança. Além dos resultados compatíveis com a metodologia oficial, o método por CZE apresentou outras vantagens consideráveis como: rápido preparo das amostras, um alto ganho em frequência analítica, uma vez que, pode-se determinar os dois AG em menos de 4 minutos e a obtenção de eletroferogramas mais lípidos, uma vez que, apenas os picos dos ácidos graxos são observados nessas condições.

Outro estudo realizado neste trabalho mostrou-se bem promissor no que tange análise dos AO (ácido cítrico ácido málico, ácido aspártico e ácido succínico) em amostras de braquiárias submetidas ao estresse por cigarrinhas, através de avaliações estatística em um estudo de otimização, chegou-se a uma condição ótima para os

componentes do eletrólito capaz de realizar a separação simultânea desses ácidos consistindo de: **19 mmol L⁻¹ de ácido ftálico, 16 mmol L⁻¹ de TRIS e 0,8 mmol L⁻¹ de CTAB.**

Essa ferramenta tornou-se essencial para uma análise de forma rápida e confiável para concentração desses ácidos, permitindo uma avaliação de grande número de materiais genéticos em curto espaço de tempo, uma vez que, a análise desses ácidos ocorrem em torno de 5 minutos.

Para análise dos AO, o processo de extração é simples, assim tornou a análise em um curto intervalo de tempo, permitindo analisar um grande número de amostras em um mesmo dia. Esta técnica, portanto, apresenta grande potencial para uso em programas de seleção de forrageiras voltadas à produção de espécies/cultivares mais resistentes às cigarrinhas.

A metodologia empregada neste trabalho, para a análise de AG e AO em forragens, servirá como uma ferramenta analítica para o programa de melhoramento genético vegetal que, normalmente, visa a identificação e a seleção de materiais superiores. Sendo um dos principais pontos, a necessidade de analisar um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo.

REFERÊNCIAS

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: Wiley-Interscience, 1995.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: Wiley-Interscience, 1995.

BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, n. 9, p. 203-227, 2003.

BOUFAÏED, H. et al. Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 501 - 511 2003.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, n. Series B, p. 1-45, 1951.

CARDONA, C. et al. Antibiosis and tolerance to five species of spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: implications for breeding for resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, p. 635-645, 2004. Acesso em: 13. mar. 2014.

CASTRO, R. J. C. et al. Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursor (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in *Brachiaria Ruzizienses* by capillary zone electrophoresis. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, p. 286-296, 2013.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 31-48, 2001.

COLLOMB, M. et al. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1347-1361, 2006.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. **Annual Review of Plant and Molecular Biology**, v. 48, p. 355-381, 1997.

CURI, R. et al. 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 Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993 - 1014, 1998.

DE CASTRO, P. M. et al. Total Trans Fatty Acid Analysis in Spreadable Cheese by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1403-1409, Feb 10 2010. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274269000005 >.

DEWHURST, R. J. 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.

DEWHURST, R. J. 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.

EIFERT, E. C. et al. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linoléico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de carboidratos na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1829-1837, 2006.

ELGERSMA, A.; TAMMINGAB, S.; ELLENC, G. Modifying milk composition through forage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 207–225, 2006.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Ácidos Orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. **Química Nova na Escola**, v. 15, p. 6-10, maio 2002. Disponível em: < <http://www.qnesc.sbq.org.br/online/qnesc15/v15a02.pdf> >. Acesso em: 24, jul, 2013.

FRENCH, P. et al. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. **American Society of Animal Science**, v. 78, p. 2849-2855 MAY 2000.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. . **Plant & Soil Science**, v. 205, n. 25-44, p. 1125-1129, Jun 1998.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil. **Embrapa Cerrados**, v. Documento 163, 2006.

KARSTEN, H. D.; BAER, D. J. Grass and human nutrition. **American Society of Agronomy**, v. In: Wedin, W., Fales, S.L., editors. Grassland Quietness and Strength for a New American Agriculture. Madison., p. 189 - 204, 2009.

KAY, J. K. et al. Endogenous synthesis of cis-9 trans-11 CLA in dairy cows fed fresh pasture. **Dairy Science**, v. 87, p. 369-378, 2004.

KHANAL, R. C.; DHIMAN, T. R.; BOMAN, R. L. Changes in fatty acid composition of milk from lactating dairy cows during transition to and from pasture. **Livestock Science**, v. 114, p. 164–175, 2008.

KLAMPFL, C. W.; BUCHBERGER, W.; HADDAD, P. R. Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 357-364, Jun 9 2000a. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087787000031 >.

KLAMPFL, C. W.; BUCHBERGER, W.; HADDAD, P. R. Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 357-364, 2000b.

KUZDZAL-SAVOIE, S.; KUZDZAL, W. Influence de la mise à l'herbe des vaches laitières sur les indices de la matière grasse du beurre et sur les teneurs en différents acides gras polyinsaturés. **Annales de Biologie Animale**, v. 41, n. 407, p. 369-398, 1961. Disponível em: < http://lait.dairy-journal.org/articles/lait/abs/1961/407/lait_41_1961_407_12/lait_41_1961_407_12.html >. Acesso em: 23. fev. 2012.

LIMA JÚNIOR, D. M. et al. Fatores Anti-Nutricionais para Ruminantes. **In: Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, p. 132-143, 2010.

MA, J. F. Role of Organic Acids in Detoxification of Aluminum in Higher Plants. **Plant & Cell Physiology**, v. 41 (4), p. 383 - 390, 2000.

MA, J. F. Role of Organic Acids in Detoxification of Aluminum in Higher Plants. **Plant & Cell Physiology**, v. 41, p. 383-390, 2000.

MARTIN, B. et al. Effects of grass-based diets on the content of micronutrients and fatty acids in bovine and caprine dairy products. In: Land use systems in grassland dominated regions. **Grassland Science in Europe**, v. 9, n. Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation, Luzern, Switzerland, p. 876-886, 2004.

MARTINS, C. E. et al. Seleção de genótipos de *Brachiaria Ruziziensis* quanto à tolerância ao alumínio em solução nutritiva I: Resposta a diferentes concentrados de alumínio. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 34, n. , p. 154 - 162, 2011.

MARTINS, C. E. et al. Tolerância à toxidez por alumínio em capim-elefante. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 1, p. 21 - 28, 2010.

MASSART, D. L. et al. Handbook of chemometrics and qualimetrics. **Elsevier**, v. Part A., Feb 1997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288645200054 >.

MIGUEL, P. S. B. et al. Seleção de genótipos de *Brachiaria Ruziziensis* quanto ao alumínio em solução nutritiva II: Avaliação da tolerância ao alumínio. **Ciências Agrárias**, v. 34, p. 163 - 172, 2011.

MILLER, J. M.; MCNAIR, H. M. **Basic Gas Chromatography**. New Jersey: Wiley-Interscience: 2009.

MOORE, L. A. **Dairy cattle must have good forage**. U.S. Gov., 1948. Disponível em: < <http://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=IND43894885&content=PDF> >. Acesso em: 21. jan. 2011.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. Organic Chemistry. **Upper Saddle River, New Jersey Prentice Hall**, v. 6th Edition, 1992.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. **Campinas: Unicamp**, v. 3rd edição., 2007.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Challenges with fats and fatty acid methods. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 3250-3254, 2003.

PASSOS, L. P. et al. Autoclave-assisted acidic extraction of water-soluble carbohydrates in forage grasses. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, p. 1731-1746, 2006. Acesso em: 23. Jan. 2013.

PEREIRA, A. V. Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras. **In: Simpósio sobre atualização em genética e melhoramento de plantas**, v. 2, p. 135 - 162, 1998.

PORTO, B. L. S.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of Omega 3 Fatty Acid in Natural and Enriched Chicken Eggs by Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 541-546, May 2011. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291181700015 >.

RULE, D. C. et al. Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk and chicken **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1202-1211, 2002.

SEHAT, N. et al. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 34, p. 407-413, 1999.

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; PASQUINI, C. **Princípios de Química Analítica**. 6ª. Porto Alegre: 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 2002. 620-640.

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

SNYDER, C. H. **The extraordinary chemistry of ordinary things**. Nova Iorque: 1995. 242-245, 574-575.

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. **Forragicultura e Pastagens : Temas em evidências**, v. 1, p. 65 - 120, 2005.

SOUZA SOBRINHO, F.; AUAD, A. M.; LÉDO, F. J. S. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. **Brazilian Society of Plant Breeding**, v. 10, p. 89 - 94, 2010.

SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. S.; KOPP, M. M. Estacionalidade e estabilidade de produção de forragem de progênies de *Brachiaria ruziziensis*. . **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, p. 684-691, 2011.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Seleção de clones de *Brachiaria ruziziensis* tolerantes ao alumínio em solução nutritiva. **Inovação Científica e Tecnológica em Zootecnia.**, v. 46, 2009.

SUKHIJA, P. S.; PALMQUIST, D. L. Rapid Method for Determination of Total Fatty Acid Content and Composition of Feedstuffs and Feces **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 1202 - 1206., 1988.

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. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 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.

VALÉRIO, J. R. Insetos-praga em pastagens tropicais. **Informe Agropecuário**, v. 26, p. 98-110, 2005.

VALÉRIO, J. R.; JELLER, H.; PEIXER, J. Seleção de introduções do gênero *Brachiaria* (Griseb) resistentes à cigarrinha *Zulia entreciana* (Berg) (Homoptera):

Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26 (2), p. 383 - 387, 1997.

VAZ, F. A. S. et al. Optimisation of a Capillary Zone Electrophoresis Methodology for Simultaneous Analysis of Organic Aliphatic Acids in Extracts of *Brachiaria brizantha*. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 569-575, Nov-Dec 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309915800002 >.

WANG, M. et al. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 989, n. 2, p. 285-292, Mar 14 2003.

ANEXO

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1 - Artigo publicado na *Central European Journal of Chemistry*:

Castro, R. J. C., Souza Sobrinho, F., Gama, M. A. S., Barra, P. M. C., Antoniassi, R., Oliveira, M. A. L. Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursors (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in *Brachiaria ruziziensis* by capillary zone electrophoresis. 11 (2013) 1286-1296.

2 - Trabalho em colaboração no artigo publicado na *Food Research International*:

Barra, P. M. C., **Castro, R. J. C.**, Oliveira, P. L., Aued-Pimentel, S., Silva, S.A., Oliveira, M. A. L. A rapid method for quantitative analysis of usual cis-trans long fatty acids by capillary zone electrophoresis. 52 (2013) 33-41.

3 - Trabalho em colaboração no artigo publicado pela *Phytochemical Analysis*:

Sato, R. T., **Castro, R. J. C.**, Barra, P. M. C., Oliveira, M. A. L. Rapid separation of free fatty acids (FFA) in vegetable oils by capillary zone electrophoresis (CZE). (2014).

4 - Trabalho em colaboração no artigo publicado pela *Experimental Agriculture*:

Leite, M. V.; Auad, A. M. ; Resende, T. T. ; Frias, M. P. ; Fonseca, M. G. ; **Castro, R. J. C.** Do Salicylic Acid, Nitric Oxide and Feeding by *Mahanarva Spectabilis* Nymphs Induce a Resistance Response in Elephant Grass. (2013) 1-7.

5 - Artigo publicado na revista *Molecules*

Oliveira, M. A. L., Porto, B. L. S., Faria, I. D. L., Oliveira, P. L., Barra, P. M. C., **Castro, R. J. C.** and Sato, R. T. Review: 20 Years of Fatty Acid Analysis by Capillary Electrophoresis. *Molecules*, v. 19, p. 14094-14113, 2014.

6 - Artigo publicado na revista *The Journal of AOAC INTERNATIONAL*

Castro, R. J. C., Sato, R. T., Souza Sobrinho, F., Gama, M. A. S., Oliveira, M. A. L. A Rapid Method for Determination of Main CLA Precursors (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in Forage by CZE-UV using GC-FID as a comparative method. *The Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. n, p. n, 2015.

7 - Trabalho em colaboração no artigo publicado na revista *The Journal of AOAC INTERNATIONAL*

Oliveira, L. N., **Castro, R. J. C.**, Oliveira, L. F. C., Oliveira, M. A. L. **Lipid Characterization of White, Dark and milk Chocolates by Raman Spectroscopy Associated to the Major FA Determination by Capillary Zone Electrophoresis.** *The Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. n, p. n, 2015.

8 - Trabalho em colaboração no capítulo de livro a convite da *Nova Science Publishers, Inc.*

Barra P.M. C., **Castro, R. J. C.**, Oliveira, M. A. L., Pereira, J. P. F., Silva, P. H. F. Analysis of Fatty Acids in Cheese by Capillary Electrophoresis. In: Henrique Castelli; Luiz du Vale. (Org.). Handbook on Cheese: Production, Chemistry and Sensory Properties. New York: Nova Science Publishers, 2013.